Université du Québec
Institut Nationale de la Recherche Scientifique-Institut Armand Frappier
(INRS-IAF)

LES CATÉNINES PRÉSENTES DANS L'ÉPIDIDYME ET LEUR IMPLICATION LORS DE LA FORMATION DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ÉPIDIDYMAIRE

Par
Sophie de Bellefeuille

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences Expérimentales de la Santé

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Dr. Denis Girard INRS-Institut Armand-Frappier Centre de Recherche en Santé Humaine
Examinateur externe	Dr. Robert Viger Ontogénie et Reproduction Centre de Recherche, CHUL
Directeur de recherche	Dr. Daniel G. Cyr INRS-Institut Armand-Frappier Centre de Recherche en Santé Humaine

©Droits réservés de Sophie de Bellefeuille, 2002

RÉSUMÉ

L'épididyme est un organe dans lequel les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant et leur mobilité. Ils sont emmagasinés dans la queue de l'épididyme jusqu'au moment de l'éjaculation. Les jonctions serrées formant la barrière hémato-épididymaire maintiennent les caractéristiques spécifiques de la lumière de l'épididyme, afin que puissent se dérouler le processus de maturation. Les facteurs impliqués dans la régulation de cette barrière sont cependant, encore inconnus. Cependant, les jonctions d'adhérence participent au maintient des jonctions serrées par des cascades de signalisation impliquant les protéines cytoplasmiques, β- , α-caténine et/ou $p120^{ctn}$.

L'objectif principal de ce projet de recherche était de trouver les facteurs pouvant être impliqués dans la régulation de la barrière. Afin de réaliser cet objectif, il fallait d'abord localiser les protéines cytoplasmiques des jonctions d'adhérence et vérifier si les androgènes régulent ces protéines dans l'épididyme de rat adulte. L'expression de ces caténines durant le développement a aussi été étudiée. Le deuxième objectif était de vérifier si β-caténine est impliquée dans la régulation de la barrière en s'associant avec une protéine des jonctions serrées, ZO-1.

Par immunohistochimie, la localisation des trois caténines étudiées (β-, α- caténine et $p120^{ctn}$) se retrouve le long des membranes plasmiques entre deux cellules épithéliales formant l'épididyme chez le rat adulte. Chez les animaux orchidectomisés, la localisation de deux caténines soit, β- et α-caténine devient cytoplasmique tandis que $p120^{ctn}$ demeure le long de la membrane. Chez les animaux orchidectomisés avec un implant de testostérone, la localisation de β- et α-caténine est identique à celle des animaux contrôles suggérant une régulation par les androgènes pour β- et α-caténine.

Par immunoprécipitation, l'association entre les différentes caténines et E-cadhérine a été démontrée et les résultats suggèrent que ces protéines font partie des jonctions d'adhérence dans l'épididyme. De plus, l'association entre ZO-1 et β-caténine a aussi été démontrée et l'intensité de l'association varie durant la formation de la barrière suggérant que β-caténine puissent influencer la formation de la barrière.

Étudiante

Directeur de Recherche

REMERCIEMENTS

Je veux d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr. Daniel G. Cyr pour son appui et son dévouement tout le long de ce projet.

Un merci tout spécial à tous ceux et celles avec qui j'ai passé des moments inoubliables au laboratoire, Isabelle, Johanna, Jean-Marc, Stéphane, Guylaine, Claudine, et plus particulièrement, Julie Dufresne et Mary Grégory pour votre patience, votre aide et vos bonnes idées.

Je voudrais également remercier tout le personnel de l'INRS, Francine Teasdale, Francine Leclair, Josée Labonne, Louis Sénécal, Jacques Lussier ainsi que Anne Philippon qui forment une équipe exceptionnelle.

Je tiens à remercier ma mère, Yolande, Robert et ma famille pour leur confiance, leur amour et leurs encouragements tout au long de ce projet qui leur paraissait interminable.

Merci à mon amour, Patrick, pour ta grande patience, ta joie de vivre, tes attentions si appréciées, ton temps, tes connaissances et tes encouragements. Avec toi, je réalise deux rêves du cœur; une belle famille et une carrière passionnante.

Finalement merci à mes deux petits "poussins", qui m'ont apporté courage et énergie et qui ont partagé, bien malgré eux, les moments difficiles, mais aussi les moments heureux de cette grande aventure.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ I

REMERCIEMENTS III

LISTE DES ABRÉVIATIONS VII

LISTE DES FIGURES IX

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITÉRATURE 5

1. LE SYSTÈME REPRODUCTEUR MÂLE 5

1.1 ORGANOGENÈSE DU SYSTÈME REPRODUCTEUR 5

1.2 LES COMPOSANTES DU SYSTÈME DE REPRODUCTION MÂLE 6

1.3 L'ÉPIDIDYME 7

1.3.1 Anatomie 7

1.3.2 Histologie 9

1.3.3 Développement et différenciation cellulaire 10

1.3.4 Fonctions de l'épididyme 12

1.3.4.1 L'absorption 12

1.3.4.2 Sécrétion 14

1.3.4.3 Maturation et storage des spermatozoïdes 15

1.4 LES HORMONES ET L'ÉPIDIDYME 17

1.4.1 Le métabolisme de la testostérone dans l'épididyme 17

1.4.2 Les fonctions de l'épididyme sous le contrôle des androgènes 18

2. LA JONCTION D'ADHÉRENCE 20

2.1 LE RÔLE DE LA JONCTION D'ADHÉRENCE LORS DE L'EMBRYOGENÈSE 21

2.2 LES COMPOSANTES DE LA JONCTION D'ADHÉRENCE 22

2.2.1 Les cadhérines 22

2.2.2 Les caténines 24

2.2.2.1 α-caténines 25

2.2.2.2 La famille Armadillo 25

2.3 LES MÉCANISMES DE LA RÉGULATION DES JONCTIONS D'ADHÉRENCE 28

2.4 LA RÉGULATION DES CADHÉRINES DANS L'ÉPIDIDYME 30

3. LES JONCTIONS SERRÉES 31

3.1 LES CELLULES ÉPITHÉLIALES 31

3.2 ANATOMIE 32

3.2.1 Rôles et fonctions des jonctions serrées 35

3.2.2 Le rôle des jonctions serrées dans l'épididyme *36*
3.3 LES PROTÉINES TRANSMEMBRANAIRES DES JONCTIONS SERRÉES 38
3.3.1 L'Occludine *38*
3.3.2 Les claudines *40*
3.3.3 JAM (Molécules de jonctions adhérentes) *41*
3.4 LA FAMILLE MAGUK (MEMBRANE ASSOCIATED GUANYLATE KINASE) 42
3.4.1 ZO-1 ..... *43*
3.4.1.1 ZO-1 et la jonction d'adhérence 44
3.4.2 ZO-2 ..... *45*
3.4.3 ZO-3 ..... *45*
3.5 LES INTERACTIONS ENTRE LES PROTÉINES MAGUK 46
3.6 LES INTERACTIONS ENTRE LES PROTÉINES TRANSMEMBRANAIRES DES JONCTIONS SERRÉES ET LES PROTÉINES MAGUK 46
3.7 MAGUK ET SIGNAL DE TRANSDUCTION 48
3.8 LE DÉVELOPPEMENT DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ÉPIDIDYMAIRE 49

4. RÉGULATION DES JONCTIONS SERRÉES PAR LES PROTÉINES DE LA JONCTION D'ADHÉRENCE 50

HYPOTHÈSES DE RECHERCHE 53

CHAPITRE 2 : ARTICLE 55
RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE 55
ABSTRACT 57
INTRODUCTION 58
MATERIALS AND METHODS 61
RESULTS 66
DISCUSSION 70
REFERENCES 75
FIGURE LEGENDS 79
FIGURES 81

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS 87

BIBLIOGRAPHIE 93

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3α-dio :	5α-androstan-3α,17β-ol
3α-HSD :	3α-hydrxystéroïde déhydrogénase
5α-R :	5α-réductase
ADN :	acide désoxiribonucléique
ARNm :	messager d'acide ribonucléique
Asp :	acide aspartique
ATP (ase) :	Adénosine triphosphate
Ca :	cauda
Cs :	corpus
Ct :	caput
DHT :	dihydrotestostérone
Dsh :	dishevelled
E-cadhérine :	Epithéliale-cadhérine
ERα :	récepteur d'estrogène alpha
ERβ :	récepteur d'estrogène bêta
Fz :	Frizzled
Glu :	acide glutamique
GMP :	guanosine 5'-monophosphate
GUK :	guanylate kinase-like
GSK3β :	glycogène syntase kinase 3 bêta
GTP :	guanosine 5'-triphosphate
hrs :	Heures
Is :	segment initial
MAGUK :	membrane-associated guanylate kinase homologues
MDCK :	Madin-Darby Canine Kidney
Na+ :	ion sodium
OPN :	ostéopontine
Ser :	sérine
SGP-2 :	sulfated glygoprotein-2
TAD :	domaine de tansactivation
TCF	T-cell factor

TER :	Résistance transépithéliale électrique (Transepithelial electric resistance)
Thr :	Thréonine
TJ :	Jonction serrée (Tight junction)
Val :	valine
Wnt :	Wint
WG :	Wingless
ZW3 :	Zeste White 3

LISTE DES FIGURES

FIGURE NO.1 : SCHÉMA DU SYSTÈME REPRODUCTEUR MÂLE 7
FIGURE NO.2 : MÉTABOLISME DE LA TESTOSTÉRONE DANS L'ÉPIDIDYME 18
FIGURE NO.3 : LE COMPLEXE JONCTIONNEL DES CELLULES ÉPITHÉLIALES 21
FIGURE NO. 4 : LE COMPLEXE CADHÉRINE/CATÉNINES 24
FIGURE NO.5 : LES DEUX MODÈLES DE JONCTIONS SERRÉES 32
FIGURE NO.6 : LA JONCTION SERRÉE ET SES FONCTIONS 35
FIGURE NO. 7 : PROTÉINES TRANSMEMBRANAIRES DES JONCTIONS SERRÉES 39

INTRODUCTION

L'épididyme est un organe dans lequel les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité et leur pouvoir fécondant. Ces deux fonctions sont essentielles afin que les spermatozoïdes puissent féconder l'ovule. Ces acquisitions sont dues à de multiples modifications chimiques et physiologiques des spermatozoïdes comme par exemple, des interactions entre les protéines sécrétées par l'épididyme et les spermatozoïdes, la glycosylation de certaines protéines par les saccules de Golgie présents dans la goutte lipidique résiduelle (Oko et al., 1993; Olson et al., 2002). Toutes ces transformations se produisent lors du transit à travers le tubule de l'épididyme. Le microenvironnement retrouvé dans la lumière de l'épididyme procure aux spermatozoïdes les conditions favorables à leur maturation; c'est-à-dire, un milieu au pH variable selon le segment et des concentrations et/ou composition en protéines, en ions qui diffèrent du milieu interstitiel (Robaire et Hermo, 1988). Ces conditions sont maintenues grâce aux jonctions serrées retrouvées du côté apical, entre deux cellules formant l'épithélium de l'épididyme. Ces jonctions serrées sont ainsi responsables de la barrière hémato-épididymaire et protègent les spermatozoïdes du milieu extracellulaire et du système immunitaire (Cyr et al., 1995; Cyr et al., 2002).

Au Canada, on estime que 300 000 couples sont infertiles. Dans 40% des cas, l'infertilité est due à une dysfonction masculine et la moitié de ces cas sont de cause inconnue (Commission, 1993). Dans les cas d'infertilité inconnue, il est probable que la maturation des spermatozoïdes soit en cause car ce processus est complexe, difficile à déceler et demeure encore peu connu. De plus, les facteurs régulant la formation et le maintien de la barrière hémato-épididymaire sont aussi encore inconnus. L'étude de la barrière hémato-épididymaire est donc cruciale afin d'approfondir nos connaissances sur le développement et la régulation de cette structure essentielle à la maturation adéquate des spermatozoïdes.

Un fait important est que, le développement des jonctions serrées nécessite d'abord l'assemblage d'un autre type de jonction, soit les jonctions d'adhérences (Denker and Nigam, 1998; Cyr et al., 2002). En effet, des études ont démontré un rôle fonctionnel des protéines de la jonction d'adhérence sur l'assemblage des jonctions serrées dans

divers types cellulaires (Behrens et al., 1985; Gumbiner et Simons, 1986; Balda et al., 1993; Rajasekaran al., 1996). Cependant, aucune information sur les facteurs responsable de la régulation de la barrière dans l'épididyme n'a encore été trouvée.

Les cadhérines et les caténines sont les protéines formant la jonction d'adhérence. Les caténines se lient à l'extrémité COOH des cadhérines et aux filaments d'actine. Ainsi, les caténines forment un pont entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette de la cellule. En se liant aux cadhérines présentes à la surface d'une cellule voisine, les cadhérines et les caténines assurent ainsi l'adhésion entre deux cellules. De plus, les caténines sont impliquées dans des cascades intracellulaires et influencent divers processus cellulaires en modifiant la transcription de gènes.

Les jonctions serrées sont aussi formées de protéines transmembranaires et de protéines cytoplasmiques. Les protéines transmembranaires sont les claudines et l'occludine et ces dernières sont attachées aux filaments d'actine par les protéines de la famille MAGUK (membrane-associated guanylate kinase homologues), soit, ZO-1(zonula-occluden 1), ZO-2 (zonula-occluden 2), et ZO-3 (zonula-occluden 3). Ensemble, elles polarisent la cellule en formant un coté apical et un côté basolatéral et empêchent la diffusion paracellulaire de grosses molécules.

Ainsi, notre principal objectif était de vérifier si les protéines de la jonction d'adhérence sont impliquées directement ou indirectement dans la régulation de la barrière hémato-épididymaire chez le rat. Afin de réaliser cet objectif, nous avons d'abord localisé par immunohistochimie les protéines cytoplasmiques, les caténines, formant la jonction d'adhérence dans l'épididyme de rat adulte. Dans un deuxième temps, nous avons vérifié quel était le patron d'expression de ces protéines lors du développement et si elles étaient régulées par les androgènes ou des facteurs testiculaires en utilisant des tissus de rats orchidectomisés. Finalement, par immunoprécipitation, nous avons aussi vérifié si l'association entre β-caténine et ZO-1 était présente dans l'épididyme et si elle se modifiait lors du développement de la barrière hémato-épididymaire.

La première partie de ce mémoire comporte une revue de littérature complète sur les trois sujets de mon projet, soit l'épididyme, les jonctions serrées et les jonctions d'adhérence. Ainsi la revue sur l'épididyme débute par l'organogenèse du système de

reproduction mâle et l'énumération des composantes du système. Ensuite, les explications de l'anatomie générale, de l'histologie et des fonctions particulières de l'épididyme permettent une bonne compréhension du rôle essentiel de ce tissu. Les sections sur les jonctions serrées et d'adhérence permettent de bien connaître les différentes protéines formant ces jonctions, leurs interactions et leur régulation dans différents types cellulaires. Les recherches faites sur ces protéines dans l'épididyme sont aussi clairement expliquées.

Cette revue de littérature permettra de mieux comprendre la structure, le développement et la régulation de ces jonctions dans différents types cellulaire ainsi que leurs rôles dans l'épididyme. Les hypothèses et les objectifs de notre recherche seront clairement exposées et formeront la conclusion de cette revue de littérature.

La deuxième partie est formée d'un article soumis à la revue « Biology of Reproduction ».

Finalement, la dernière partie de ce mémoire est formée d'une discussion générale ainsi que des conclusions et hypothèses possibles suite à l'analyse des résultats. Ces conclusions contribuent à l'ajout de connaissances pertinentes au milieu scientifique.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITÉRATURE

1. Le système reproducteur mâle

1.1 Organogenèse du système reproducteur

Les différents groupes zoologiques utilisent différentes stratégies de segmentation, puis de gastrulation pour arriver à la mise en place des trois feuillets fondamentaux des métazoaires: endoderme, mésoderme, ectoderme à partir desquels seront formés les organes et systèmes (Cabana, 1997). Chez l'animal adulte, les organes et systèmes sont composés de l'un ou généralement plusieurs des quatre tissus de base: épithélial, conjonctif, musculaire et nerveux. Les organes dérivent de plus d'un feuillet fondamental, néanmoins le parenchyme d'un organe, c'est-à-dire, le tissu qui le caractérise de façon propre, provient d'un seul des trois feuillets. Ainsi l'organogenèse est la période durant laquelle les feuillets germinaux s'assemblent pour former les organes.

Les gonades proviennent d'un épaississement de la région supérieure du mésoderme viscéral, au niveau du mésonéphros : la crête génitale ou germinale (Upadhyay, Luciani, Zamboni, 1981). La crête génitale fait saillie dans le coelome, rattachée au mésoderme viscéral par un court mésentère. Initialement composé de cellules du mésoderme viscéral, la crête devient colonisée par un second type cellulaire : les cellules germinales primordiales (gonies), qui s'insèrent parmi les cellules mésodermiques (Byskov et Hoyer,1988). Les cellules germinales ne sont pas considérées comme appartenant à l'un ou l'autre des trois feuillets primordiaux de l'embryon, elles constituent une lignée propre, la ligné germinale (Cabana, 1997) Des cellules du cordon mésonéphrétique qui ne participent pas à la formation du rein migrent jusque dans la crête génitale, où elles entourent les cellules germinales primordiales. Les deux types de cellules forment ensemble les cordons sexuels primitifs. La crête génitale ainsi constituée prend le nom de gonades indifférenciées.

Chez le mâle, les cordons sexuels se creusent d'une cavité devenant tubulaire: les tubules séminifères. Leur paroi est constituée de cellules provenant du cordon mésonéphrétique : les cellules de Sertoli et les cellules germinales primordiales : les spermatogonies. A la sortie du testicule, les tubules séminifères deviennent les tubules efférents qui se réunissent en un tubule unique, le tubule de l'épididyme qui se jettent ensuite dans le canal mésonéphrétique. Celui-ci devient le canal déférent (Cabana, 1997).

1.2 Les composantes du système de reproduction mâle

Le système reproducteur mâle est composé de deux testicules, deux épididymes, lesquels sont suivis par les canaux déférents qui peuvent se contracter et pousser les spermatozoïdes jusqu'à l'urètre. Les spermatozoïdes se mêlent ensuite aux sécrétions combinées des vésicules séminales, de la prostate et des glandes bulbo-urétrales (Setchell et Brooks, 1988). Ces glandes accessoires ne sont cependant pas présentes chez toutes les espèces de l'ordre des mammifères et plusieurs variations ont été constatées (Nalbandov, 1976). Ensemble, tous ces organes fournissent les sécrétions nécessaires pour produire des spermatozöides viables.

Le testicule est l'organe producteur de cellules germinales haploïdes par le processus de spermatogenèse et il est un important producteur d'androgènes et plusieurs autres hormones, comme l'estrogène, l'estradiole, la prolactine et la vitamine D. La régulation de la production des androgènes est sous le contrôle d'une autre hormone, la LH (luteinizing hormone) sécrétée par l'adénohypophyse. Les testicules se développent dans l'abdomen mais doivent descendre dans le scrotum afin de se retrouver dans un environnement où la température est inférieure à 37°C pour produire les spermatozoïdes. Les spermatozoïdes quittant les testicules ne sont ni mobiles et ne peuvent reconnaître ou fertiliser l'ovule. En traversant le tubule de l'épididyme, ils acquièrent ces deux habiletés (Turner et Miller, 1997). Il a longtemps été pensé que l'épididyme n'avait d'autre fonction que d'entreposer les spermatozoïdes et leur permettre de vieillir et qu'il n'influençait pas la maturation (Robaire et Hermo, 1988). Ainsi on croyait que les spermatozöides possédaient les capacités intrinsèques pour assurer leur maturation et que celle-ci dépendait principalement du temps. Puisque les spermatozoïdes traversent l'épididyme en 1 à 14 jours selon l'espèce, la théorie du

vieillissement était plausible. Toutefois, il est maintenant clair que l'épididyme excerce un rôle essentiel et est impliqué activement dans le processus de maturation des spermatozoïdes en leur procurant leur motilité et pouvoir fécondant (Orebin-Crist, 1967; Yeung, Weinbauer et Cooper, 1999; Belmonte, Romano et Sosa, 2002).

1.3 L'épididyme

1.3.1 Anatomie

L'épididyme est relié au testicule par les canaux efférents et il se termine par le vas déférent. Les canaux efférents sont nombreux et ils se combinent en pénétrant dans la tête de l'épididyme pour ne former qu'un seul et unique tubule (figure no.1). Le tubule de l'épididyme mesure 3 m chez l'humain et peut aller jusqu'à 80 m chez le cheval (Maneely, 1959).

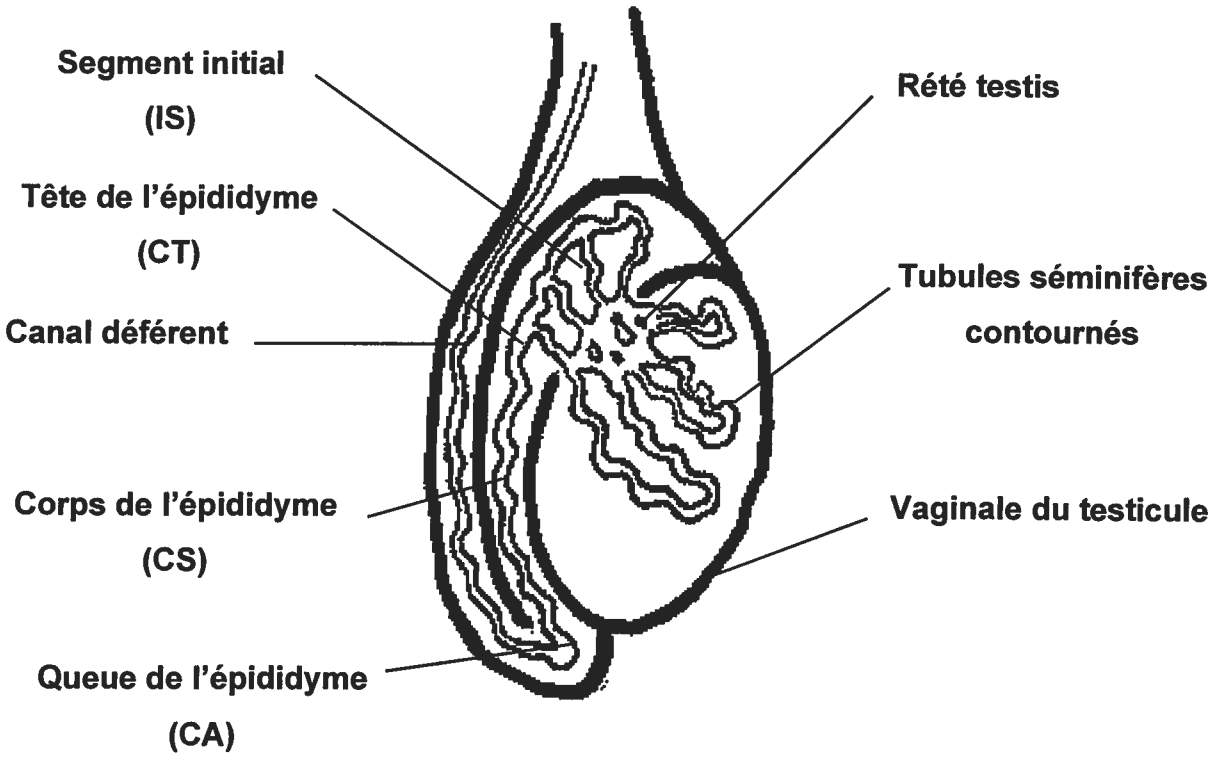


Figure no.1 : Schéma du système reproducteur mâle

* figure inspirée de E.N. Marieb, 1999

Les différentes caractéristiques structurelles et fonctionnelles des cellules formant l'épididyme ont suggéré la division de l'épididyme en plusieurs régions ou segments. Benoît (1926) a été le premier à décrire la région du segment initial suite à l'observation des caractéristiques des cellules principales formant cette région. Plusieurs années plus tard, l'épididyme se retrouvait subdivisé arbitrairement en deux autres segments, soit en région corpus ou corps et cauda ou queue (Reid and Cleland, 1957; Reid, 1959; Robaire et Hermo, 1988). Cependant, dû à la forme tortueuse et entremêlée du tubule de l'épididyme, les régions sont difficiles à distinguer, et par conséquent plusieurs régions ont subi des divisions supplémentaires basées sur des caractéristiques fonctionnelles et structurelles (Hermo et al., 1991a; 1992a; Hermo, 1995).

Aujourd'hui, l'épididyme est généralement divisé en quatre segments distincts selon le type de cellules qui composent l'épithélium, ce sont; le segment initial (IS), la tête ou caput (CT) le corps ou corpus (CS) et la queue ou cauda (CA) (Figure no.1). Cependant, Hermo, (1995) a démontré que certaines cellules forment un autre segment, appelé zone intermédiaire, car elles possèdent des caractéristiques structurales et fonctionnelles qui diffèrent des autres segments. En effet, la présence de vacuoles dans la partie apicale de la cellule est la caractéristique principale des cellules principales (définies à la section 1.3.2) de la zone intermédiaire. Ces vacuoles sont probablement des endosomes géants car ces cellules sécrètent et endocytent SGP-2 et l'immobiline (Hermo, 1995). Cette zone intermédiaire est localisée entre le segment initial et la tête de l'épididyme, près de la surface opposée au testicule.

L'épididyme est formé d'un tubule et d'un espace intertubulaire. Le tubule est composé de différents types de cellules épithéliales côte à côte ce qui permet la création d'un espace circulaire appelé lumière de l'épididyme. La lumière de l'épididyme est formée durant le développement embryonnaire (jour 19) chez le rat et les spermatozoïdes arrivent environ au jour 39-40 postnatal, et le diamètre de la lumière varie selon le segment. Il augmente tout le long de l'épididyme et devient de forme irrégulière au niveau de la queue de l'épididyme (Reid et Cleland, 1957).

L'espace intertubulaire est composé de tissus conjonctifs lâches. On y retrouve également plusieurs vaisseaux sanguins et lymphatiques, des fibres nerveuses ainsi que plusieurs fibroblastes et macrophages.

1.3.2 Histologie

Cinq types cellulaires composent l'épithélium de l'épididyme, ce sont les cellules principales, claires, étroites, halo et basales. Chaque type de cellules a un rôle qui lui est spécifique ce qui permet de maintenir les caractéristiques particulières du fluide selon les segments par la sécrétion ou l'endocytose de molécules. C'est pourquoi on retrouve une distribution et une composition spécifique de cellules selon le segment.

Une étude effectuée avec des épididymes de rats a dénombré les quantités relatives des différents types de cellules selon le segment. Ainsi Trasler et al., (1988), ont dénombré dans le segment initial : 80% des cellules principales, 12% de cellules basales, environ 5% de cellules halo et 3% de cellules étroites. Les cellules principales se distinguent par leur noyau situé à des niveaux différents et possèdent sur leur surface apicale une bordure en brosse. Les cellules dont le noyau se retrouve dans la partie supérieure sont nommées les cellules apicales. Les cellules étroites sont trouvées exclusivement dans le segment initial et se distingue par leur noyau dense localisé dans la partie supérieure de la cellule. Selon une autre étude, on retrouverait aussi des cellules apicales exclusivement dans le segment initial et la zone intermédiaire. En effet, selon Adamali et Hermo (1996), les cellules étroites et apicales sont des cellules distinctes dans leur distribution, leur structure ainsi que leur fonction. Ils ont dénombré une quantité relative de cellules apicales évaluée à ~10.7% dans le segment initial et de ~1.3 % dans la zone intermédiaire. Les cellules étroites forment ~3% du segment initial et ~6.3% de la zone intermédiaire.

Dans la tête de l'épididyme on retrouve la même distribution des cellules principales et basales, par contre on ne trouve aucune cellule étroite mais plutôt 5% de cellules claires et de 6.5% de cellules halo (Trasler et al., 1988). Les cellules claires ont plusieurs vacuoles dans leur région apicale et plusieurs granules denses au-dessus et dessous le noyau. Elles sont reconnaissables par leur noyau très rond, pâle, avec un nucléole proéminent. Les cellules claires se retrouvent dans la tête, le corps et la queue de l'épididyme. Les cellules principales ont, quant à elles, un noyau de forme irrégulière avec un nucléole bien visible et sont plus courtes que dans le segment initial.

Le corps de l'épididyme est formé de 69% de cellules principales et de 21% de cellules basales. Quelques granules sont retrouvés dans la partie basale de toutes les cellules principales de l'épididyme, par contre dans le corps de l'épididyme une plus grande quantité de granules se retrouve dans cette même région. L'augmentation relative des cellules claires est de 30% dans le corps et on y retrouve 3.8% de cellules halo (Trasler et al., 1988). Ces dernières sont dans tous les segments de l'épididyme et sont différenciées par leur noyau dense entouré de cytoplasme plus pâle.

La queue de l'épididyme est, quant à elle, formée de beaucoup moins de cellules principales. La diminution de ces dernières est remplacée par l'augmentation de cellules claires. Ces cellules ont une région apicale remplie de vacuoles et de granules denses au-dessus et en dessous de leur noyau. La région basale est remplie de corps denses et pâles qui sont en fait des gouttes de lipides détachées des spermatozoïdes. On retrouve aussi les cellules basales, ces cellules sont dans tous les segments de l'épididyme et se retrouvent en périphérie du tubule à la base des autres types de cellules. Elles ont une forme allongée ainsi que leur noyau. Chez la souris, l'apparition des cellules basales se produit de façon ascendante, c'est-à-dire qu'elles apparaissent d'abord dans la queue, et est suivie du corps et de la tête de l'épididyme (Seiler et al., 1998). Récemment, les résultats obtenus sur l'origine des cellules basales suggèrent qu'elles sont d'origine extratubulaire (Holschbach et Cooper, 2002). Il est important de noter que la hauteur des cellules principales est plus importante dans le segment initial et diminue dans la tête et le corps pour finalement être de forme cuboïdale dans la queue de l'épididyme.

1.3.3 Développement et différenciation cellulaire

Selon Sun et Flickinger, (1982), le développement de l'épididyme chez le rat après la naissance peut être divisé en trois phases distinctes. La première est la phase de prolifération, qui est caractérisée par une activité mitotique importante des cellules (0-15 jours) et la présence de cellules en colonne du jour 14 à 21. Cette période est aussi caractérisée par la présence de cellules halo dès le jour 14 qui sont probablement des leucocytes qui ont migré. La deuxième phase est appelée la période de différentiation

alors que la barrière hémato-épididymaire est formée et les cellules en forme de colonnes se différencient en cellules principales (16-44 jours). Les cellules étroites sont présentes dans les trois segments dès le 16^{iem} jour, mais chez l'adulte, elles ne sont présentes que dans le segment initial. Elles disparaissent des autres segments au jour 35. Les cellules principales et basales apparaissent, quant à elles, au jour 28. C'est d'ailleurs à ce moment qu'une distinction peut se faire dans la hauteur des cellules selon le segment. Ces résultats suggèrent donc que les cellules en colonnes sont les précurseurs des cellules étroites, principales et basales (Sun et Flickinger, 1982). Les cellules claires apparaissent au jour 35 dans les segments central et terminal ce qui correspond avec la disparition des cellules étroites dans ces mêmes segments, suggérant que les cellules étroites sont les précurseurs des cellules claires dans ces segments. Finalement, on note une phase d'expansion résultant de l'entrée de spermatozoïdes dans l'épididyme et le storage de ces derniers dans la queue de l'épididyme (jours 44 à 91).

Beaucoup d'études ont été faites sur l'origine des cellules basales et les résultats ont démontré que l'activité mitotique très lente dans l'épididyme rendait presque impossible l'idée que les cellules en colonnes soient les précurseurs des cellules basales (Clermont et Flannery, 1970; Sujarit et Jones, 1991). Une explication alternative a été développée suite à l'observation des qualités macrophagiennes des cellules basales dans différentes espèces (Yeung et al., 1994; Seiler et al., 1998) et qui suggèrent que l'origine des cellules basales pourrait être circulatoire (Nemiloff, 1926). Plusieurs indices ont été constatés en ce sens, par exemple, les cellules basales humaines expriment CD44 à leur surface (Terpe et al., 1994). Holschbach et Cooper, (2002) suggèrent, suite à plusieurs observations, que les cellules basales ont une origine extratubulaire.

1.3.4 Fonctions de l'épididyme

L'épididyme doit remplir plusieurs fonctions afin de s'assurer de la maturation des spermatozoïdes, c'est-à-dire procurer aux spermatozoïdes la capacité de se rendre jusqu'à l'ovule et le féconder. La sécrétion et l'absorption d'ions, de macromolécules, de protéines ainsi que la synthèse et le métabolisme de stéroïdes et autres substances (Bagnis et al., 2001; Leung et al., 2001; Badran et Hermo, 2002) produisent le microenvironnement essentiel à une maturation adéquate. L'épididyme est aussi le site de storage des spermatozoïdes (Amann, 1981). Les jonctions serrées responsables de la barrière hémato-épididymaire maintiennent les caractéristiques du fluide épididymaire et protègent les spermatozoïdes du système immunitaire (Cyr et al., 2002; Turner, 1991).

1.3.4.1 L'absorption

Les canaux efférents sont petits et tortueux et forment la région proximale de la tête (Ilio et Hess, 1994) de l'épididyme et conduisent les spermatozoïdes du rété testis vers le tubule de l'épididyme. Les cellules non ciliées des canaux efférents peuvent réabsorber jusqu'à 90% du fluide quittant le testicule (Clulow et al., 1998) et par conséquent elles augmentent la concentration des spermatozoïdes entrant dans l'épididyme. L'épididyme réabsorbe aussi du fluide testiculaire. La réabsorption du fluide dans l'épididyme est un processus passif secondé par le transport actif du sodium (Na+) (Wong et Yeung, 1978). La composition ionique du fluide épididymaire change énormément entre les différents segments (Setchell et Brooks, 1988).

La localisation basolatérale de Na^+/K^+-adénosine triphosphate (ATPase) dans les canaux efférents et l'épididyme crée un gradient de concentration qui provoque la diffusion de l'eau de la lumière vers le milieu interstitiel (Ilio et Hess, 1992). Chez le rat, l'eau diffuse librement (Wong, Au et Ngai, 1978; Pastor-Soler, 2001) à travers des canaux formés par des protéines transmembranaires nommées, aquaporin. Ces protéines sont essentielles pour la régulation de l'homéostasie de l'eau permettant le passage rapide de l'eau à travers les épithéliums possédant des jonctions serrées

(Brown, Katsura et Gustafson, 1998). Il a été démontré que aquaporin-9 est présente dans les cellules principales de l'épididyme (Elkjaer et al., 2000) et ce dans toutes les régions (Badran et Hermo, 2002). De plus, Badran et Hermo (2002) ont démontré que l'expression de aquaporin-9 est régulée par des facteurs testiculaires dans le segment initial et dans les cellules claires de la queue de l'épididyme. Cette régulation spécifique pourrait expliquer en partie les différentes concentrations du fluides tout le long de l'épididyme. Il a été récemment proposé que les protéines transmembranaires de la famille des claudines pouvaient aussi être responsable de la diffusion paracellulaire (figure 4) (Tsukita et Furuse, 2000)

Un milieu en pH acide, dans l'épididyme, aide à garder les spermatozoïdes matures immobiles alors qu'ils sont en storage dans la queue de l'épididyme. L'acidification du fluide dépend du sodium dans les régions proximales. Des protéines cotransporteuses Na^+/H^+ sont localisées dans le pôle apicale des cellules principales, mais aucun marquage n'a été constaté dans la queue (Bagnis et al., 2001). Le retirement du sodium luminal dans le segment initial réduit le pH de 52%. Ces résultats suggèrent que les protéines cotransporteuses Na^+/H^+ participent, avec H^+-ATPase à l'acidification du fluide (Bagnis et al., 2001).

Les ions calcium sont des composantes du fluide de l'épididyme. À une concentration appropriée ils sont essentiels à l'acquisition optimale de la mobilité (Chinoy, Verma et Patel, 1983; Hong, Chiang et Turner, 1984). L'ostéopontine (OPN) est une glycoprotéine simple-chaîne phosphorylée avec plusieurs isoformes et fonctions (Denhardt et Gou, 1993). Il a été démontré que OPN peut lier le calcium dans les os (Chen, Bal et Gorski, 1992) et peut se lier et favoriser l'internalisation du calcium dans les cellules rénales en culture (Lieske, Toback et Deganello, 1996; Lieske et al., 1997). Dans l'épididyme, cette protéine a été localisée dans tous les segments sauf dans la queue (Siteri et al., 1995). Cependant tout récemment, Luedtke et al., (2002) ont démontré que OPN est présente à la surface apicale dans les cellules principales, étroites et claires de rat adulte et ce, dans la plupart des segments. Le patron de réaction diffère entre les régions et entre les cellules (Luedtke et al., 2002). Ainsi, dans les conditions normales, l'OPN enlève possiblement les cristaux de calcium du fluide, qui se dissolvent à faible pH dans les endosomes (Lieske et al., 1994) s'assurant ainsi qu'il n'y ait pas de formation de roche calcique dans l'épididyme résultant en une baisse de la fertilité des spermatozoïdes. Ces

résultats suggèrent donc l'existance d'un processus permettant à l'épididyme afin de réguler ses ions calcium.

1.3.4.2 Sécrétion

La sécrétion est un processus complexe qui se produit de deux façons; soit par la fabrication de nouvelles molécules par les cellules de l'épithélium, comme la glycerylphosphorylcholine et d'autres glycoprotéines ou par l'absorption de molécules du sang qui sont ensuite sécrétées dans la lumière de l'épididyme comme la cartinine et l'inositol. Ainsi, l'épididyme peut sécréter une variété d'ions, de petites molécules organiques et des glycoprotéines dans la lumière (Robaire et Hermo, 1988).

La concentration des ions retrouvés dans les différents segments suggère que le potassium et le phosphore sont les deux ions qui sont le plus activement sécrétés (Brooks,1983). Les mécanismes responsables de la sécrétion sont inconnus. Toutefois il a été proposé que les hormones parathyroïdes pouvaient réguler ces ions dans l'épididyme (Robaire et Hermo, 1988).

Trois petites molécules organiques sont sécrétées dans l'épididyme. Ce sont la cartinine, l'inositol et la glycerylphosphorylcholine. Dans les années 70 il a été établi que la cartinine n'était pas sécrétée par l'épididyme à partir de précurseurs, pas plus qu'elle ne pénétrait dans la lumière par les testicules (Casillas et Erickson, 1975). Il a donc été proposé qu'elle était prise de la circulation contre un gradient de concentration, pour ensuite être sécrétée dans la lumière de l'épididyme. La région distale de la tête possède la plus grande affinité pour cette molécule (Hinton et Setchell, 1980). L'inositol est aussi très concentré dans l'épididyme et trois mécanismes sont responsables de cette forte concentration. En effet, il a été démontré que l'inositol entre dans l'épididyme 1) par les voies qui relient l'épididyme et le testicule (Tuck et al., 1970) 2) par sa synthèse à partir du glycérol (Robinson et Fritz, 1979) et 3) par la prise dans la circulation (Cooper, 1982). Finalement, glycerylphosphorylcholine est synthétisé directement dans les cellules de la tête de l'épididyme à partir de la lécithine du sang (Hammerstedt et Rowan, 1979).

Plusieurs études ont démontré que les acides aminés marqués peuvent être incorporés aux protéines par les cellules principales (Kanka et Kopecny, 1977; Flinckinger, 1981). Le parcours qu'empruntent ces acides aminés suite à leur synthèse dans le réticulum endoplasmique rugueux est suivi de l'appareil de Golgi, de la face apicale des cellules et finalement la lumière. Flinkinger, (1981) a conclu qu'il fallait environ 2 heures afin que la protéine soit synthétisée et sécrétée dans la lumière par les cellules principales et que cette synthèse et ce transport intracellulaire étaient plus rapide dans la tête et le corps que dans la queue de l'épididyme. Les mécanismes impliqués dans la sécrétion ne sont pas tout à fait compris et sont des sujets controversés. La présence de larges vésicules à surface lisse près de la face trans (mature) de l'appareil de Golgi et dans la région supranucléaire et apicale des cellules principales suggèrent que ces vésicules sont probablement des granules de sécrétion (Robaire et Hermo, 1988). Une alternative a cependant été proposée, suggérant que ces granules seraient de petit puits (coated pits) (Flickinger, 1981).

1.3.4.3 Maturation et storage des spermatozoïdes

Lorsque les spermatozoïdes quittent les testicules, ils sont immatures. C'est en traversant les différents segments de l'épididyme et en s'exposant aux changements de la composition du fluide tout au long du tubule qu'ils acquièrent leur pouvoir fécondant et leur motilité (Bedford, 1979). Le temps nécessaire afin de parcourir ce long tubule est d'environ 10 jours chez les différents mammifères (Robaire et Hermo, 1988) et d'environ 2 à 6 jours chez l'humain (Amann et Howards, 1980).

Les spermatozoïdes des mammifères sont entourés d'une membrane plasmatique qui subit des modifications importantes. Ces processus confèrent aux gamètes une mobilité vigoureuse et la capacité de fertiliser l'ovule (Cooper, 1998). Ces modifications sont très diverses et incluent l'endocytose de glycoprotéines sécrétées par les cellules de l'épididyme (Liu et al., 2000), la glycosylation de certaines protéines membranaires (Tulsiani et al., 1993) ainsi que leur phosphorylation par des protéines kinases (Nath et Majumder, 1999). Des protéines à la surface des spermatozoïdes peuvent être ajoutées ou modifiées durant la traverse de l'épididyme (Légaré et al., 2001). Ainsi, la protéine P34H est impliquée dans la réaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide

(Boue, Blais et Sullivan, 1996). Les spermatozoïdes qui possèdent une concentration plus faible de cette protéine de surface ne peuvent réagir avec la zone pellucide (Boue et Sullivan, 1996). Chez les singes *cynomologus*, les spermatozoïdes de la région du corps pénètrent la zone pellucide avec beaucoup moins d'efficacité que les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme, dans les mêmes conditions (Mahony et al., 1996) suggérant ainsi qu'un processus important de maturation se produit dans le corps de l'épididyme.

Dans les spermatozoïdes, on peut observer la migration d'une goutte cytoplasmique de la région du cou du flagelle jusqu'à la queue pour finalement disparaître. Ce changement morphologique est le plus répandu entre les espèces. Dans la tête de l'épididyme, la goutte cytoplasmique se retrouve à la jonction entre la pièce du milieu et la pièce principale du flagelle du spermatozoïde. Dans le corps, cette goutte est localisée latéralement suggérant son détachement éventuel. Finalement, la plupart des spermatozoïdes n'ont plus cette goutte attachée à leur flagelle dans la queue de l'épididyme. Le contenu de cette goutte est retrouvé dans le fluide épididymaire ainsi que dans le cytoplasme des cellules claires de la queue de l'épididyme. (Robaire et Hermo, 1988). De plus, il y a une augmentation des ponts disulfure à l'intérieur du noyau des spermatozoïdes au fur et à mesure qu'ils rejoignent la queue de l'épididyme. Tous ces changements morphologiques et biologiques contribuent collectivement à la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme.

Le lieu principal de storage du système reproducteur mâle est la queue de l'épididyme. Il a été démontré, dans quelques espèces de mammifères, que 50 à 80% des spermatozoïdes sont localisés dans la queue de l'épididyme (Amann, 1981). Après une semaine sans éjaculation, les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme sont deux à trois fois plus nombreux. Des éjaculations fréquentes ne changent pas le taux de production journalier, mais diminuent le nombre de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme (Amann, 1981). Les mécanismes responsables du storage des spermatozoïdes sont inconnus. Cependant, les différences de morphologie et la concentration des solutés dans ce segment sont peut-être des éléments importants dans ce processus.

1.4 Les hormones et l'épididyme

La régulation des fonctions de l'épithélium et de la lumière de l'épididyme est sous un contrôle hormonal complexe. Ainsi, les androgènes et plus particulièrement 5α-dihydrotestostérone et 5α-androstan-3α,17β-ol (3α-diol) sont considérés comme les modulateurs principaux des différentes fonctions de l'épididyme (Viger et Robaire 1996; Robaire et Viger, 1995). Plusieurs évidences indiquent, pour certaines fonctions de l'épididyme, qu'il y aurait, en plus de la régulation endocrine des hormones circulantes, une régulation paracrine, c'est-à-dire une régulation par des facteurs entrant dans la lumière de l'épididyme directement par les canaux efférents. Ces facteurs incluent les androgènes luminals, les protéines de liaison des androgènes, l'oestrogène, les rétinoïdes, les facteurs de croissance et d'autre molécules organiques (Ibrahim, Young et Fröhlich, 2001). Jusqu'au jour 21, les niveaux d'androgènes circulant sont encore très bas, c'est au jour 42 que les niveaux d'androgènes augmentent et atteignent la plus forte concentration au jour 49 chez le rat.

1.4.1 Le métabolisme de la testostérone dans l'épididyme

Lorsque la testostérone radioactive est administrée de façon périphérique, le stéroïde radioactif retrouvé dans l'épididyme est la dihydrotestostérone (DHT) (Back, 1975). La 5α-réductase (5α-R) est l'enzyme responsable de la conversion de la testostérone en DHT et 3α-hydrxystéroïde déhydrogénase (3α-HSD) convertit cette dernière en 5α-androstan-3α,17β-ol (3α-diol) (figure 2). Deux isoformes de la 5α-réductase, soit type 1 et type 2, sont retrouvés dans l'épididyme, mais leur distribution ainsi que leur régulation sont très différentes (Viger et Robaire,1996) . L'activité des ces enzymes a été mesurée par plusieurs laboratoires durant le développement et chez l'animal âgé (Viger et Robaire, 1995; De Larminat, Cuasnicu et Blanquier, 1980; Scheer et Robaire, 1983). Chez le rat, l'activité de 5α-R est indétectable durant les deux premières semaines de vie, mais l'enzyme est présente dans l'épididyme bien avant l'arrivée des spermatozoïdes soit, au 49ième jour dans la tête et 56ième jour dans la queue de l'épididyme (Scheer et Robaire, 1980). Un fait intéressant est que l'activité nucléaire de 5α-R atteint un sommet à 7 semaines et décline de façon constante jusqu'à 3 mois. La

coïncidence entre l'arrivée des spermatozoïdes dans l'épididyme et la grande activité de 5α-R au jour 49 ne peut être purement accidentelle, mais aucune explication n'a pu être formulée jusqu'à maintenant.

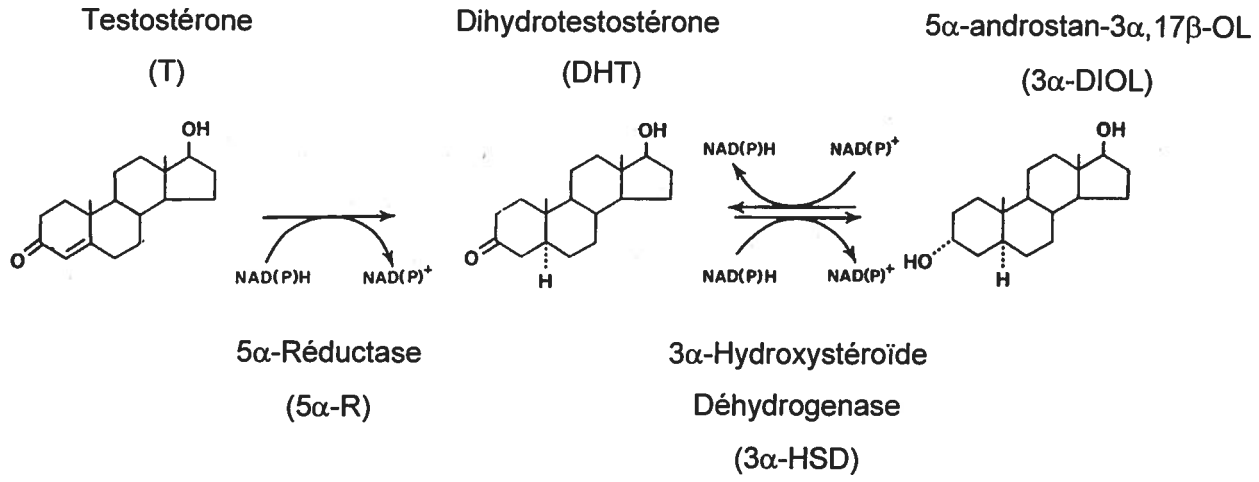


Figure no.2 : Métabolisme de la testostérone dans l'épididyme

L'enzyme 5α-R est responsable de la conversion de la testostérone pour la dihydrotestostérone. L'enzyme 3α-HSD convertit la dihydrotestostérone en 5α-androstan-3α,17β-OL. Ces deux métabolites sont les plus actifs dans l'épididyme.

* figure inspirée de Robaire et Hermo, 1988

1.4.2 Les fonctions de l'épididyme sous le contrôle des androgènes

Presque toutes les fonctions prenant place dans l'épithélium ou dans la lumière de l'épididyme dépendent de la présence des androgènes; la seule fonction à ne pas être directement reliée aux androgènes est la spermiophagie (Hoffman, Jahad et Orgebin-Crist, 1976, Rajalakshmi et al. 1990).

Le métabolisme intermédiaire, le transport d'ions, la synthèse et la sécrétion de plusieurs glycoprotéines, l'activité enzymatique retrouvée dans l'épididyme ainsi que l'acquisition

du pouvoir fécondant sont tous des exemples des fonctions de l'épididyme qui sont dépendantes des androgènes (Viger et Robaire, 1995; Nixon et al., 2002; Pastor-Soler, 2001; Wong et Uchendu, 1990).

L'étude de la régulation de l'expression de Aquaporin 9 semble donner des résultats contradictoires. Cette protéine est localisée sur la membrane apicale des cellules principales et les cellules responsables de la réabsortion et de la sécrétion (Pastor-Soler et al., 2001). Deux groupes ont cependant trouvé des résultats différents sur la régulation de cette protéine. En effet, chez les animaux castrés, une baisse de l'expression de cette protéine a été signalée et retourne au niveau des animaux témoins lorsque les animaux sont traités avec la testostérone (Pastor-Soler et al., 2002). Cependant une autre équipe conclut que l'expression d'aquaporine 9 n'est pas régulée par les androgènes (Badran et Hermo, 2002).

La sécrétion de plusieurs protéines épididymaires impliquées dans le processus de maturation des spermatozoïdes semble être dépendante des androgènes (Nixon et al., 2002). Par exemple, la sécrétion de quatre protéines épididymaires (M_r 38, 20,15,13 Kda) sont contrôlés par les androgènes puisque chez l'animal orchidectomisé avec remplacement de la testostérone, leur sécrétion revient à la normale (Nixon et al., 2002).

En plus de l'action démontrée par les androgènes sur le système reproducteur, des récepteurs de l'oestrogène de type α et β (ERα, ERβ) ont aussi été identifiés dans l'épididyme (Hess et al., 2000; Atanassova et al., 2001). L'expression du ERα est retrouvée dans les cellules épithéliales de la région de la tête, du corps et dans la partie proximale de la queue. Cependant, cette expression est apparente qu'au jour 18 et disparaît vers les jours 25-35. Aucune réactivité de ERα n'est visible chez l'adulte cependant, ERβ est présent dans l'épididyme à tous les âges. On retrouve dans l'épididyme des cellules apicales, étroites et claires anormales dans certaines régions et cette étude suggère que l'oestrogène influence le développement péripubertal de l'épididyme (Atanassova, 2001). Des changements morphologiques importants de l'anatomie ont aussi été retrouvés chez les souris déficientes en ERα (Hess et al., 2000).

Ainsi, ces différentes études démontrent bien la complexité de l'épididyme, autant anatomique que physiologique. Les fonctions de l'épididyme dépendent de divers

mécanismes qui maintiennent les caractéristiques du fluide et s'assurent du développement normal des spermatozoïdes par une maturation adéquate. Il est important de mentionner que l'épididyme ne pourrait remplir correctement ses fonctions sans la présence d'une structure essentielle, soit la barrière hémato-épididymaire, qui est formée par les jonctions serrées, ces dernières sont retrouvées entre les cellules formant l'épithélium du tubule.

2. La jonction d'adhérence

Les jonctions d'ancrage sont présentes dans tous les tissus épithéliaux des animaux. Elles permettent à des groupes de cellules, d'agir comme des unités structurales solides en associant le cytosquelette d'une cellule au cytosquelette d'une autre cellule ou à la matrice extracellulaire. Elles existent sous trois formes structurellement et fonctionnellement différentes : les jonctions d'adhérence, les desmosomes et les hémidesmosomes. Les jonctions d'adhérence sont liées aux filaments d'actine et les desmosomes et les hémidesmosomes sont liés aux filaments intermédiaires (Alberts et al. 1994)

Dans de nombreux tissus non épithéliaux, elles prennent la forme de petites ponctuations qui relient les filaments d'actine dans le cytoplasme cortical de cellules adjacentes. Dans les cellules épithéliales, elles forment un cordon adhésif, localisé à la périphérie des cellules, situé près de l'apex de chaque cellule, tout juste sous la jonction serrée. Elle a comme fonction de maintenir l'intégrité du tissu en assurant une bonne adhésion entre les cellules adjacentes (figure no.3).

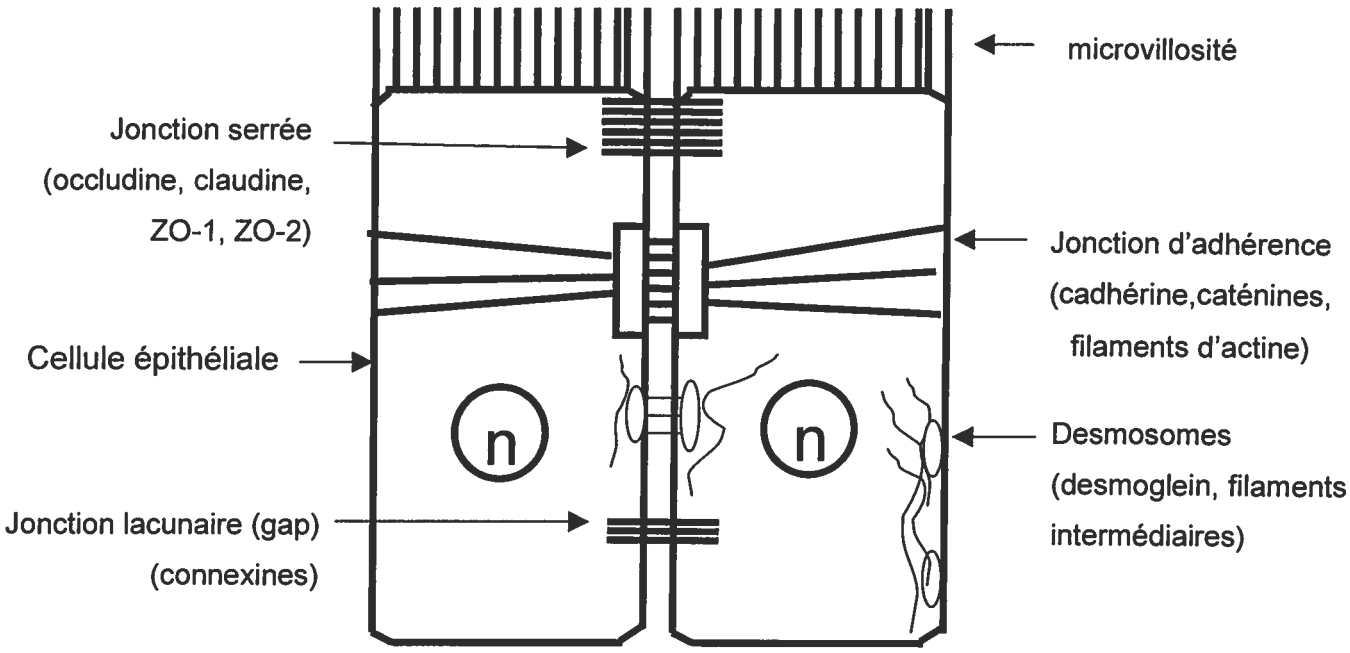


Figure no.3 : Le complexe jonctionnel des cellules épithéliales
Schéma de deux cellules épithéliales et les différents types de jonctions retrouvées.

2.1 Le rôle de la jonction d'adhérence lors de l'embryogenèse

Jusqu'au stade huit cellules, chacune des cellules de l'embryon de mammifère peut former n'importe quelle partie de l'embryon plus âgé ou de l'adulte. Après ce stade, les mouvements tissulaires dans l'embryon s'accompagnent de changements des propriétés chimiques des cellules. En activant la production des protéines du cytosquelette, par exemple, une cellule pourrait modifier sa forme et sa mobilité. En modifiant le type de molécule d'adhérence qui couvre leur surface, elles peuvent rompre d'anciens liens et en créer de nouveaux. Les domaines extracellulaires des cadhérines sont des régions très conservées et forment des liaisons homophiliques et spécifiques, ainsi, deux cellules exprimant le même type de cadhérine se lient ensemble (Albert et al., 1994). Les effets de l'adhérence intercellulaire sélective sont si puissants qu'ils peuvent conduire à une reconstitution approximative de la structure normale, même après une dissociation artificielle des cellules en un mélange au hasard (Townes et Holtfreter,

1955). Ce comportement dépend, en partie, des protéines de la famille des cadhérines. Les changements dans les profils d'expression des différentes cadhérines sont étroitement corrélés avec ceux dans les profils d'association entre les cellules durant la gastrulation, la neurulation et la formation des somites. Les cellules exprimant le même type de cadhérines tendent à adhérer les unes aux autres et à se ségréger à d'autres cellules (Albert et al. 1994). Le patron d'expression influence la destinée des cellules et contribue à l'établissement des tissus et de leur fonction par leur interaction de type homophilique (Larue et al., 1996, Vleminckx et Kemler, 1999). Selon Kintner (1992) le domaine cytoplasmique des cadhérines contribuerait également à réguler l'adhésion intercellulaire lors de la morphogénèse en modifiant les liaisons avec les caténines. La régulation des cadhérines dans de vrais tissus ou organismes est assez bien documentée. Par exemple, l'élongation de l'embryon Xénopus, conduisant à la gastrulation résulte en un réarrangement cellulaire local, qui implique que la cellule brise et refasse continuellement des contacts intercellulaires en organisant les cadhérines exprimées en surface (Gerhart and Keller, 1986). L'élongation de Xénopus peut être induite par un facteur induisant la formation de mésoderme, nommé activin, et les cellules perdent alors leur adhésion par une diminution de l'expression des cadhérines en surface (Brieher et Gumbiner, 1994). Ces expériences démontrent bien que la régulation de l'adhésion est essentielle afin que la morphogénèse normale se produise.

2.2 Les composantes de la jonction d'adhérence

2.2.1 Les cadhérines

Les cadhérines constituent les protéines transmembranaires essentielles des jonctions d'adhérence, en présence de Ca^{2+} (figure no. 4). Leurs domaines extracellulaires interagissent de façon homophiliques (Nose et al., 1990) avec les cadhérines des cellules voisines. Leur domaine intracellulaire interagit avec les filaments d'actine, organisés en cable, par l'intermédiaire des protéines adaptatrices appelées caténines. À la fin des années quatre-vingt, trois cadhérines classiques ont été identifiées: **E**pithéliale-cadhérine (E-Cad), **P**lacentaire-cadhérine (P-Cad) (Nose, Nagafuchi et Takeichi, 1987) et **N**eurale-cadhérine (N-Cad) (Hatta et Takeichi, 1986) nommés ainsi selon le tissu dans

lequel elles ont été découvertes. Depuis, plusieurs autres cadhérines ont été identifiées et on compte aujourd'hui plus de cinquante cadhérines. Basé sur leur séquence en acides aminés les cadhérines forment cinq groupes soient, les cadhérines classiques de type I et II, cadhérines desmosomales, les protocadhérines et les autres plus distantes (Pötter, Clemens et Brabant, 1999).

2.2.2 Les caténines

Contrairement au grand nombre de cadhérines retrouvé, la famille des caténines ne compte que quatre membres classiques, ce sont α-, β-, γ-caténine et $p120^{ctn}$. Les caténines sont les protéines cytoplasmiques de la jonction d'adhérence. Ces protéines (α- β- γ- caténine) permettent l'ancrage des cadhérines au cytosquelette et $p120^{ctn}$ modulerait la force de la liaison des cadhérines (figure 4).

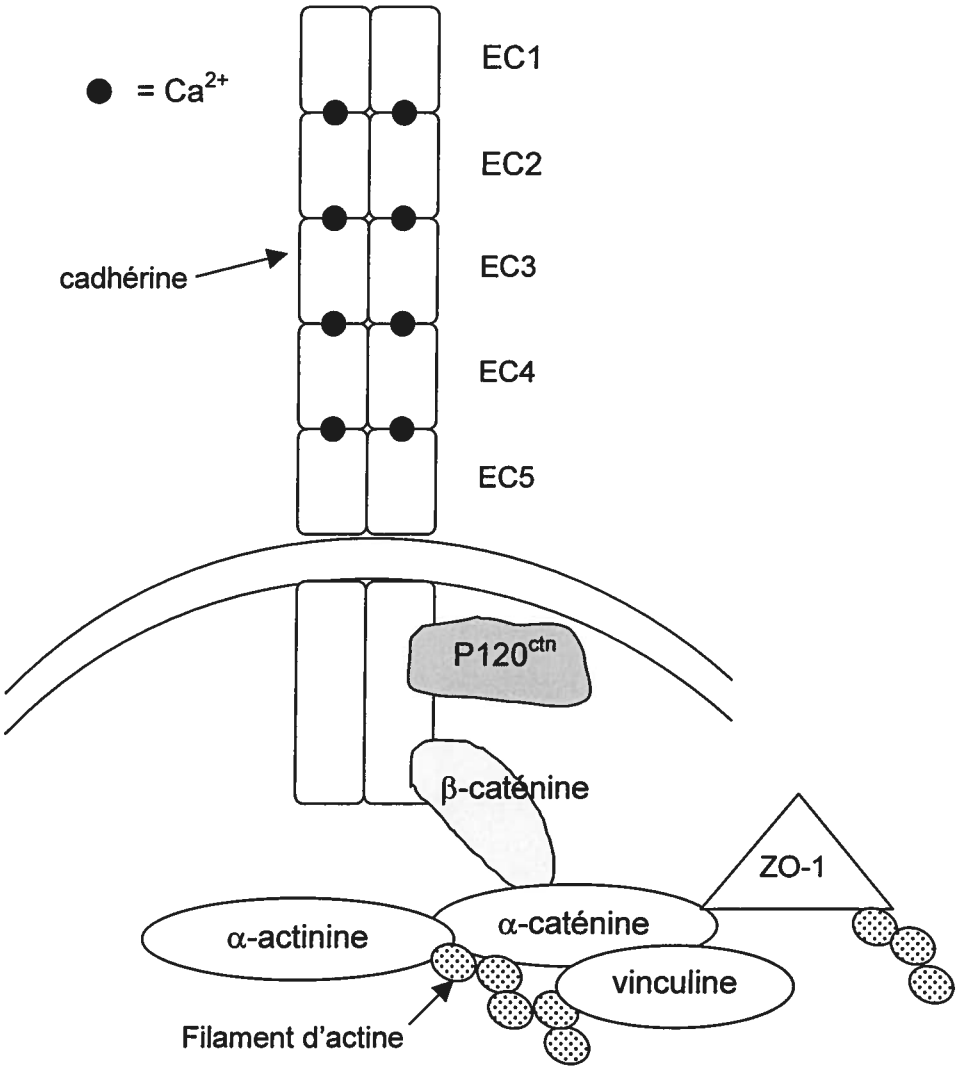


Figure no. 4 : Le complexe cadhérine/caténines

Schéma représentant les interactions entre les protéines de la jonction d'adhérence et le cytosquelette.

* figure inspirée de Gumbiner (2000)

2.2.2.1 α-caténines

Il existe deux α-caténines codées par deux différents gènes, soit la neurale αN-caténine et épithéliale αE-caténine. La protéine αN-caténine compte 945 acides aminés, a un poids moléculaire de 104 kDA et se situe sur le chromosome 2p11.1-p12 (Claverie et al., 1993). Le gène de la protéine humaine αE-caténine qui contient seize exons, est localisé sur le chromosome 5q31 et forme une protéine de 906 acides aminés avec un poids moléculaire de 102kDa.

De récentes études ont démontré que αE-caténine est responsable de la liaison entre les cadhérines et les filaments d'actine soit directement ou par l'intermédiaire de α-actinine (Nagafuchi, Ishihara et Tsukita, 1994, Nieset et al, 1997). L'interaction entre le complexe cadhérine-caténine et le cytosquelette par l'intermédiaire de α-caténine est indispensable pour l'adhésion intercellulaire. Trois domaines fonctionnels ont été identifiés chez α-caténine; un domaine de liaison pour vinculine/α-actinine, un domaine pour ZO-1, protéine de la jonction serrée, et un domaine modulateur de l'adhésion (Imamura et al.,1999). Le domaine le liaison ZO-1 est nécessaire pour une forte adhésion entre E-cadhérine et le cytosquelette dans les cellules nonépitheliales, mais n'est pas nécessaire dans les cellules épithéliales (Imamura et al.,1999). Dans les cellules épithéliales cancéreuses du colon, une équipe a démontré en transfectant une série de mutants αE-caténine, que l'interaction entre αE-caténine et vinculine participe à la formation des jonctions serrées (Watabe-Uchida et al., 1998).

2.2.2.2 La famille Armadillo

β-caténine, γ-caténine ou plakoglobine et $p120^{cnt}$ appartiennent à la grande famille Armadillo. Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence d'un motif de plusieurs copies de 42 acides amides appelés "répétition Armadillo". Ces protéines sont impliquées dans divers processus cellulaires comme l'adhésion cellulaire, le transport nucléaire et la régulation de la croissance cellulaire (Gottardi et Gumbiner, 2001; Lisovsky, Itoh et Sokol, 2002; Anastasiadis et Reynolds, 2000).

Le site de liaison des caténines sur les cadhérines se retrouve dans une région de 72 acides aminés à l'extrémité carboxyl de E-cadhérine (Kemler et al., 1994). Dans cette région se retrouve un site de trente acides aminés essentiels pour la liaison des caténines. Cette région contient un domaine de huit résidus sérine très bien conservés et fortement phosphorylés (Kemler et al., 1994). Ces résidus sérine phosphorylés sont essentiels pour la liaison des caténines à E-cadhérine. Toujours selon Kemler (1994), caséine kinase II est la kinase naturelle responsable de la phosphorylation de E-cadhérine.

2.2.2.2.1 β-caténine

Cette caténine est présente dans les trois compartiments cellulaires, soit au niveau de la membrane, dans le cytplasme et dans le noyau. Elle est donc impliquée dans divers processus cellulaires selon sa localisation.

β-caténine se trouve sur le chromosome humain 3p21-p22 (Nollet, 1996). Armadillo est la caténine retrouvée chez Drosophile et les invertébrés, β-caténine son homologue, est retrouvée chez les vertébrés.

β-caténine et plakoglobine se lient aux 25 résidus d'acides aminés à l'extrémité carboxyl-terminal de E-cadhérine. Il y a donc une liaison de type compétitive entre ces deux caténines (Hinck et al., 1994). Ces deux protéines peuvent lier des facteurs de transcription nucléaire et sont souvent régulées par la phosphorylation (Müller et al, 1999; Fuchs et al, 1996). En effet, une étude a démontré que β-caténine était phosphorylée par le récepteur EGF (epidermal growth factor) et que cette interaction était médiée par la région conservée « core » de β-caténine (Hoschuetzky, Aberle et Kemler, 1994).

La dégradation de β-caténine se produit par une cascade qui ubiquitine la protéine. L'ubiquitine est une protéine présente dans toutes les cellules eukaryotes et se lient aux lysines des autres protéines. La liaison marque la protéine pour sa destruction par les

protéasomes. Ce processus se produit suite à la phosphorylation de β-caténine par GSK3β (Aberle et al.,1997).

Le promoteur de E-cadhérine possède aussi un site de liaison pour lymphoid enhancer factor/ β-catenin (LEF-1/β-caténine). Il a été démontré in vitro que le complexe se lie au promoteur suggérant que E-cadhérin peut être régulée par le signal de transduction wnt et par conséquent β-caténine.

2.2.2.2.2 p120^{ctn}

Cette caténine a d'abord été identifiée comme substrat de l'oncoprotéine Src. Le clonage de son ADNc a révélé que p120^{ctn} contient le domaine de répétition Armadillo et possède 22% d'identité avec les caténines Armadillo/ β-caténine. Le chromosome où l'on retrouve p120^{ctn} est le 11q11 (Reynolds et al.,1996). Contrairement àβ-caténine et plakoglobine, p120^{ctn} n'interagit pas avec α-caténine, APC ou LEF-1 ce qui suggère qu'il a ses propres facteurs de liaison et qu'il joue un rôle distinct dans le complexe cadhérine-caténine. Il peut y avoir jusqu'à 32 isoformes de la protéine chez l'humain dépendant de l'épissage alternatif (Keirsebilck et al., 1998). Les premières évidences de la fonction de p120^{ctn} ont émergé tout récemment et son rôle est très controversé. Néanmoins, il est maintenant clair que p120^{ctn} affecte l'adhésion cellulaire en se liant au domaine juxtamembranaire des cadhérines classiques et pourrait avoir un rôle dans le noyau (Anastasiadis et Reynolds, 2000). En effet, certains isoformes ont été retrouvés dans le noyau des cellules cancéreuses et l'expression de E-cadhérine dans ces mêmes cellules dirige p120^{ctn} hors du noyau (van Hengel et al., 1999).

Tout récemment, p120^{ctn} a été identifié, lié à une protéine nommée KAISO. KAISO serait un facteur de transcription nouvellement identifié de la famille POZ-ZF (Daniel et Reynolds, 1999) qui comprend Tramtrak (régulateur de transcription) et Bric à brac (protéine nucléaire régulatrice) et les oncoprotéines humaines BCL-6 et PLZF. KAISO est une protéine BTB/POZ (pour Broad-Complex, Tramtrack, and Bric à brac/poxviruses et zinc finger) qui comprend deux groupes soient, lié à l'actine ou lié à l'ADN. Tout récemment, l'isolation et la caractérisation de Kaiso chez *Xenopus* (Xkaiso) a démontré

que cette protéine localise dans le cerveau, les yeux, les oreilles, les arcs brachiaux et la corde spinale (Kim et al., 2002). Par co-immunoprécipitation, ils ont démontré l'interaction entre ces deux protéines et démontré que XKaiso est un suppresseur de transcription de gènes (Kim et al., 2002) . Il pourrait ainsi s'agir d'une cascade de signalisation spécifique à $p120^{ctn}$ ce qui lui confère un rôle en tant que transducteur de signal de la jonction d'adhérence jusqu'au noyau.

2.3 Les mécanismes de la régulation des jonctions d'adhérence

Plusieurs mécanismes de régulation sont proposés et ceux-ci dépendent des divers processus cellulaires enclenchés par les cellules. On peut diviser en trois, les divers processus enclenchés par la cellule et affectant l'adhésion. Premièrement, durant certains changements morphogénétiques, la force de l'adhésion cellulaire est modifiée en réponse à des facteurs de croissance ou autres sans qu'il ne se produise de très grands changements au niveau de la structure même de la jonction. Dans un deuxième temps, les transformations des cellules épithéliales pour des cellules mésenchymales et vice versa affectent directement ou indirectement le complexe jonctionnel de façon très complexe. Finalement, l'assemblage normal et le renouvellement continu des jonctions sont aussi sous un contrôle cellulaire complexe. La demie-vie de E-cadhérine, étant d'environ 5-10 heures dans les cellules épithéliales confluentes (Mc Crea et Gumbiner, 1991; Shore et Nelson, 1991), amène les contacts cellulaires ainsi que les jonctions à se modifier rapidement par de nombreux mécanismes incluant des changements dans l'expression de gènes. Ces différents mécanismes affectent l'adhésion cellulaire à différents niveaux et par conséquent, plusieurs mécanismes peuvent être en cause.

Puisque les caténines sont essentielles pour obtenir une force d'adhésion importante, ils ont été la cible de plusieurs études afin de démontrer leur implication dans la régulation de l'adhésion cellulaire. Des changements dans la composition du complexe, la phosphorylation des composantes du complexe et les altérations de l'interaction entre le complexe et le cytosquelette ont tous été proposés pour jouer un rôle important dans la régulation de l'adhésion. Les niveaux cytoplasmiques de β-caténine peuvent varier sous l'activation de la cascade wnt provoquant une augmentation de l'adhésion cellulaire dans

certaines lignées cellulaires (Bradley et al., 1993; Hinck et al., 1994). Cependant son rôle dans la régulation physiologique de l'adhésion demeure incertain.

L'interaction entre α-caténine et les filaments d'actine est une importante voie de régulation. α-caténine interagit directement avec les filaments d'actine mais aussi par l'intermédiaire de plusieurs autres protéines comme par exemple, α-actinine, vinculine et ZO-1 (Knudsen et al., 1995; Watabe-Uchida et al., 1998; Imamura et al.,1999). Le rôle de ces différentes interactions dans la régulation de l'adhésion commence à peine à être étudié. Vinculine semble être importante pour l'organisation de E-cadhérine en une jonction adhérente typique des cellules épithéliales mais ne semble pas essentielle pour l'adhésion dans les cellules non-épithéliales (Watabe-Uchida et al., 1998).

La protéine $p120^{ctn}$ est aussi un bon candidat pour la régulation de l'adhésion par les cadhérines. Elle se lie au domaine juxtamembranaire des cadhérines qui est un domaine distinct des sites de liaison des caténines classiques (Reynolds et al., 1994; Thoreson et al., 2000). Son rôle est par contre controversé ayant tantôt un effet positif ou un effet négatif selon le type cellulaire (Yap et al., 1998; Aono et al., 1999; Ohkubo et Ozawa, 1999). Le mécanisme par lequel $p120^{ctn}$ et le domaine juxtamembranaire influencent la fonction des cadhérines est inconnu. Tout récemment $p120^{ctn}$ a été retrouvé lié à un répresseur de transcription et le complexe pourrait avoir un rôle dans le contrôle de l'expression de gènes (Kim et al., 2002).

Plusieurs études faites dans le passé démontrent que Cdc42, Rac1 et Rho, membres de la famille GTPase Rho sont aussi impliqués dans la régulation de l'adhésion cellulaire impliquant les cadhérines (Kaibuchi et al., 1999). Les effets qu'ont Rho et Rac1 sur la localisation des cadhérines sont dépendants du type cellulaire; Rac1 et Rho sont nécessaires pour la localisation de E-cadhérine au point de contact entre deux cellules dans les kératinocytes (Braga et al., 1997) tandis qu'ils ne le sont pas pour la localisation de VE-cadhérine dans les cellules endothéliales du cordon ombilical. Par contre, il a été démontré que Cdc42 et Rac1 sont nécessaires pour la régulation de l'adhésion cellulaire dans les cellules MDCK (Kuroda et al., 1997). Parmi les effecteurs de Cdc42 et de Rac1, IQGAP1 est celui qui s'accumule aux jonctions adhérentes et cette accumulation est dépendante de la présence de E-cadhérine et β-caténine. IQGAP1 interagit avec β-caténine et avec le domaine cytoplasmique de E-cadhérine *in vitro* et *in vivo* (Kuroda et

al., 1998). Cdc42 et Rac1 régulent l'activité du complexe E-cadhérine/caténines. Lorsque Cdc42 et Rac1 sont liés au GTP, leur forme active, Cdc42 et Rac1 interagit avec IQGAP1 et empêche IQGAP1 de se lier à β-caténine (Fukata et al., 1999). Il en résulte une stabilisation du complexe cadhérine/β-caténine. Quand Cdc42 et Rac1 sont liés au GDP, leur forme inactive, ils ne peuvent se lier à IQGAP1 et IQGAP1 interagit avec β-caténine ce qui dissocie α-caténine du complexe cadhérine/caténine et par conséquent détruit l'adhésion cellulaire (Kuroda et al.,1998).

Un modèle a été proposé et démontre que lorsqu'il y a une interaction entre IQGAP1 et β-caténine la jonction adhérente est beaucoup moins forte. Tandis que, lorsque IQGAP1 n'est pas activé, β-caténine se lie au complexe E-cadhérine/caténine et forme une jonction adhérente plus efficace (Fukata et Kaibuchi, 2001). Cdc42 et Rac1 agissent positivement sur l'adhésion cellulaire en empêchant IQGAP1 de réagir avec β-caténine. β-caténine est la caténine utilisée dans la cascade pour permettre l'effet de Cdc42 et de Rac1 sur la jonction adhérente .

2.4 La régulation des cadhérines dans l'épididyme

Dans l'épididyme, E-cadhérine est localisée dans les cellules principales dans toutes les régions. Les niveaux de protéines sont cependant plus importants dans le corps suivi de la tête, de la queue et du segment initial (Cyr et al., 1992b). Suite à une orchidectomie bilatérale, les niveaux d'ARNm de E-cadhérine ont diminué de 75% dans la tête de l'épididyme (Cyr et al., 1992b). Lors du développement postnatal de l'épididyme, les niveaux d'ARNm de E-cad, dans la tête et le corps de l'épididyme, augmentent jusqu'à l'âge de 42 jours (Cyr et al., 1993) ce qui correspond bien avec les changements de l'activité de l'enzyme 4-ene 5α-réductase (Robaire et Hermo, 1988). Cette enzyme convertit la testostérone en sa forme active, la dihydrotestostérone. Ces résultats suggèrent que la distribution de la protéine est différente selon le segment et que la transcription du gène est dépendant des androgènes dans ce tissu. Aucun messager de E-cadhérine n'a été détecté dans le vas déférent et aucun ARNm de N-cadhérine n'a pu être détecté dans l'épididyme (Cyr et al., 1992b). Cyr et al., 1992a, ont identifié l'ARNm

de E-cadhérine et P-cadhérine (Cyr et Robaire, 1991) dans l'épididyme de rat. P-cadhérine atteint son maximum dans les 7 premiers jours suivant la naissance. Tandis que l'ARNm de E-cadhérine atteint son maximum à la puberté. Par microscopie électronique, E-cadhérine se retouvait dans l'espace extracellulaire entre les membranes plasmiques de deux cellules principales adjacentes au niveau du complexe jonctionnel (Cyr et al., 1993; Cyr et al., 1995; Levy et Robaire, 1999). Dans le testicule, deux autres cadhérines, soit N-cadhérine et P-cadhérine ont été identifiées, mais aucuns transcrit pour E-cadhérine n'a été détecté (Cyr, Blaschuk et Robaire, 1992). Cependant, une équipe utilisant le clonage par PCR dégénéré a démontré la présence de plus de 20 cadhérines dans les testicules de rats incluant E-cadhérine (Johnson, Patel, et Boekelheide, 2000), mais aucune information sur les cadhérines dans l'épididyme n'est disponible.

3. Les jonctions serrées

3.1 Les cellules épithéliales

Les épithéliums peuvent être divisés en deux groupes selon le nombre de couches cellulaires qui les compose, c'est-à-dire en épithélium simple ou stratifié (Tsukita, Furuse et Itoh, 2001). L'épithélium simple est formé d'une seule couche de cellules polarisées, tandis que l'épithélium stratifié, comme l'épiderme, est caractérisé par de multiples couches de cellules moins polarisées. Dans l'épithélium simple, comme l'intestin, et l'épididyme, les cellules tissulaires ont deux domaines de membrane plasmique distincts (figure no.4). Une cellule épithéliale typique possède un domaine apical qui fait face à la lumière et possède souvent des caractéristiques particulières telles que des cils ou une bordure en brosse, des microvillosités et un domaine basolatéral qui recouvre le reste de la cellule. Les deux domaines sont séparés par un anneau de jonctions serrées (Albert et al., 1994).

3.2 Anatomie

Par microscopie électronique sur cryosections, les jonctions serrées apparaissent comme un réseau de chaînes anastomosé qui ceinture complètement l'extrémité apicale de chaque cellule dans le feuillet épithélial (Staehelin, 1974). Pendant plusieurs années, ces chaînes anastomosées ont été identifiées comme étant des "cordes" ou des "ponts" de protéines transmembranaires ou encore des ponts de structures lipidiques non conventionnelles (figure no.5). Ces deux modèles ont été proposés afin d'expliquer la nature chimique des ponts formant les jonctions serrées. L'identification récente de protéines transmembranaires formant les jonctions serrées procure de bonnes évidences pour le modèle "protéique". Toutefois, on ne peut exclure la possibilité que des structures lipidiques sont également impliquées dans la formation de ces ponts (Tsukita, Furuse et Itoh, 2001).

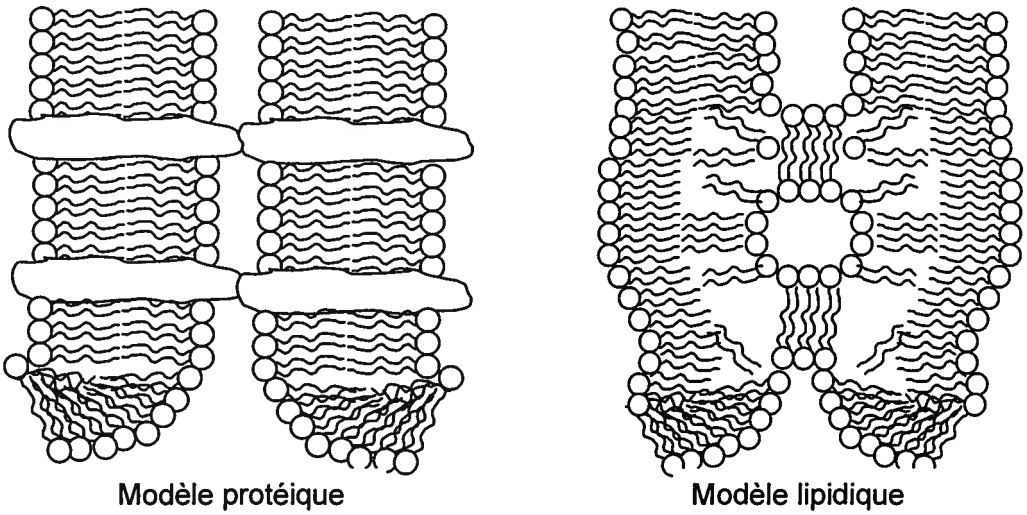


Figure no.5 : Les deux modèles de jonctions serrées

Dans le modèle protéique, les ponts sont formés par des protéines transmembranaires alors que dans le modèle lipidique des micelles de lipide inversées forment ces ponts.

*figure inspirée par Tsukita et al. 2001

Le nombre de ponts et leur ramifications varient considérablement selon le type cellulaire produisant une très grande variation morphologique du réseau formant les jonctions serrées (Tsukita, Furuse et Itoh, 2001). Les ponts sont ainsi l'unité structurale formant les jonctions serrées. La force de liaison des jonctions serrées est dépendante de la structure, du nombre de ponts et du type de protéines formant ces ponts (Gumbiner, 1993) et elle peut être mesurée directement par la "résistance électrique transépithéliale" (TER). Le nombre de ponts est un facteur important pour la détermination des propriétés des jonctions formant une barrière. Il a été démontré dans plusieurs tissus qu'il existe une relation entre le nombre de ponts et la valeur de TER (Claude et Goodenough, 1973; Claude, 1978). Cependant quelques exceptions dans cette corrélation ont été signalées (Mollgard et al., 1976).

Afin de former les barrières cellulaires semi-perméables entre les compartiments, les cellules épithéliales se polarisent et se joignent les unes aux autres en formant différents types de jonctions (serrée, adhérente, gap, desmosome). Les jonctions serrées sont les jonctions qui se retrouvent le plus apicalement et relient le feuillet externe des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes (figure no.5). Les jonctions serrées possèdent plusieurs caractéristiques particulières. Comme les autres types de jonctions (adhérente ou gap), les jonctions serrées sont formées de protéines transmembranaires qui interagissent avec les protéines transmembranaires des cellules voisines. Cependant, elles sont particulières car elles forment des "pores" qui ne laissent pas passer les molécules d'une cellule à l'autre comme les jonctions gap, mais plutôt entre deux compartiments de l'espace extracellulaire (Lapierre, 2000; Tsukita et Furuse, 2000). Deux types de protéines avec quatre domaines transmembranaires, les claudines et l'occludine, ainsi qu'une protéine avec un simple domaine transmembranaire, JAM, sont associées avec les ponts formant les jonctions serrées (Balda et Matter, 2000; Tsukita, Furuse et Itoh, 2001). Tout juste sous la membrane, au niveau des jonctions serrées se trouve une région nommée plaque jonctionnelle. Durant les 5 dernières années, plusieurs protéines périphériques ont été localisées au niveau de la plaque. Ceci inclut des protéines impliquées dans la signalisation, la modulation du cytosquelette et des protéines impliquées dans le transport de vésicules (Lapierre, 2000). Les protéines de la famille MAGUK (Membrane Associated Guanine Kinase) ont été identifiées dans cette région et les membres sont ZO-1, ZO-2, ZO-3. Ces protéines

sont responsables de la liaison entre les filaments d'actine et les protéines transmembranaires. D'autres protéines ont aussi été identifiées, ce sont cinguline, l'antigène 7H6 et symplekine. Certaines de ces protéines localisées au niveau des jonctions serrées, comme cingulin et 7H6 (Citi et Denisenko,1995; Satoh et al., 1996) tandis que symplekine a aussi été retrouvée au niveau du noyau dans les cellules ne formant pas de jonctions serrées (Keon et al., 1996).

3.2.1 Rôles et fonctions des jonctions serrées

En dépit des différences structurales et biochimiques importantes parmi les divers types d'épithéliums, tous les épithéliums ont au moins une fonction importante en commun : ils servent de barrières de perméabilité sélective entre deux compartiments qui possèdent un fluide de compositions chimiques différentes. Cette barrière est essentielle à plusieurs fonctions cellulaires et dépend de la présence des jonctions serrées (figure no.6).

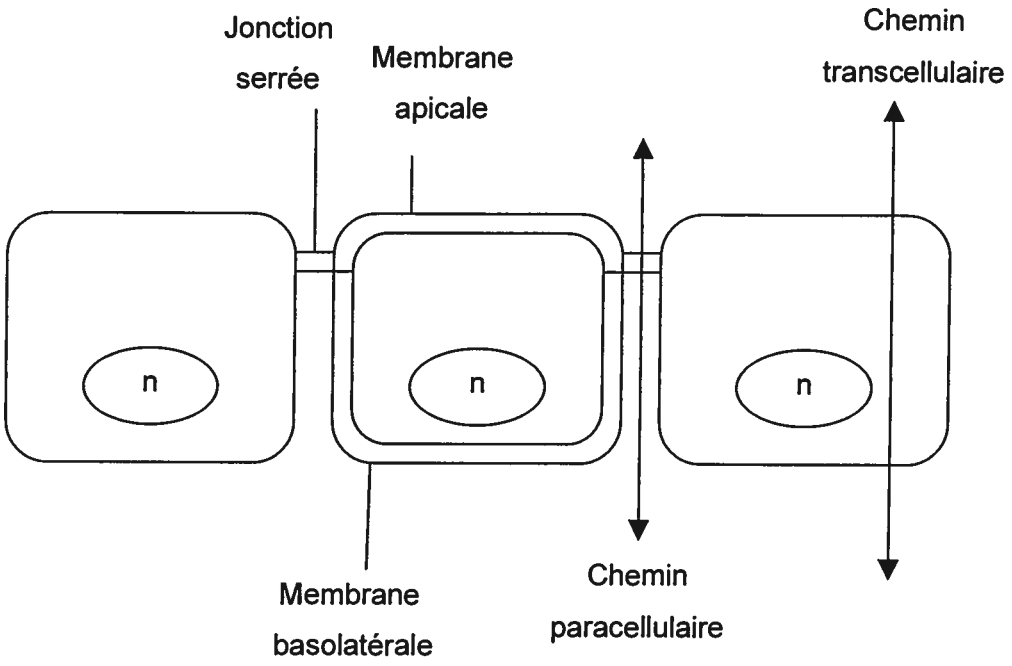


Figure no.6 : La jonction serrée et ses fonctions

Il y a deux chemins par lesquels les diverses molécules traversent les cellules épithéliales : le chemin paracellulaire et le chemin transcellulaire. De plus, les jonctions serrées polarisent les cellules en créant un coté apical et un coté basolatéral.
*figure inspirée Tsukita et al. 2001

En effet, pour créer ces différents environnements, la cellule doit sélectivement éliminer ou ajouter des substances au milieu (Albert et al., 1994; Leung et al., 2001). Ce transport transcellulaire dépend de deux groupes de protéines porteuses liées à la membrane: les unes sont limitées à la surface apicale des cellules épithéliales (tourné vers la lumière) et transportent activement des molécules choisies vers l'intérieur de la cellule; les autres sont limités à la surface basolatérale et permettent aux mêmes molécules de quitter la cellule vers le milieu extracellulaire. Cependant, les cellules doivent pomper simultanément des substances choisies à travers le feuillet cellulaire du fluide extracellulaire vers la lumière. Pour maintenir ce pompage bidirectionnel, il ne faut pas que les protéines porteuses de la surface apicale migrent vers la surface basolatérale et vice versa. Les jonctions serrées polarisent les cellules en empêchant les protéines transmembranaires de la surface apicale de diffuser vers la surface basale (Cereijido et al., 1998; Yap et al., 1998). De plus, les espaces situés entre les cellules épithéliales doivent être étanches pour certaines molécules afin qu'elles ne puissent rediffuser vers la lumière à travers l'espace intercellulaire (Yap et al., 1998; Spring, 1998). Les jonctions serrées bloquent ces deux types de diffusion. Cependant, l'étanchéité des jonctions n'est pas absolue et varie selon le tissu (Kniesel et Wolburg, 2000). Bien que toutes les jonctions serrées soient imperméables aux macromolécules, leur perméabilité aux petites molécules varie considérablement d'un épithélium à l'autre.

3.2.2 Le rôle des jonctions serrées dans l'épididyme

Les différences de concentration en ions et en protéines entre le fluide épididymaire et le plasma sanguin suggèrent qu'il y a bien la présence d'une barrière dans l'épididyme. Hoffer et Hinton (1984) ont démontré pour la première fois l'évidence de la présence de cette structure dans l'épididyme. Par des études de microponction et par microscopie électronique ils ont démontré que la diffusion du lanthanum était arrêtée au niveau de la zonula occluden ou les jonctions serrées et qu'elles sont les seules composantes de la barrière hémato-épididymaire. Les jonctions serrées dans l'épididyme se trouvent du côté apical entre deux cellules principales de l'épithélium (Cyr, Robaire et Hermo, 1995; Cyr et al., 2001).

Il est possible de retirer un échantillon du fluide épididymaire pendant l'injection intraveineuse de certains marqueurs et de comparer les concentrations entre le fluide épididymaire et le plasma sanguin. Ainsi, il a été démontré par des études de microponction, que l'eau marquée pénètre la lumière de l'épididyme rapidement, l'urée pénètre un peu plus lentement tandis que l'inuline, le glycole polyéthylène et l'albumine iodinée de sérum de bovin sont complètement exclus du milieu (Howards, Jessse et Johnson, 1976; Hinton et Howards, 1981). Il a aussi été démontré que les molécules de faible poids moléculaire comme l'H_2O et l'urée diffusent librement à travers la barrière hémato-épididymaire (Turner et Howards, 1985) suggérant la présence de "pores" au niveau des jonctions serrées (Tsukita et Furuse, 2000). De plus, des molécules comme inositol et cartinine peuvent être de 10 à 100 fois plus concentrées dans la lumière au niveau de la queue comparativement au plasma sanguin (Robaire et Hermo, 1988).

En plus de leur rôle de diffusion paracellulaire semi-perméable, les jonctions serrées doivent aussi assurer la polarisation des cellules afin que les molécules particulières soient absorbées ou sécrétées du fluide épididymaire par les protéines transmembranaires. Ainsi la localisation dans la partie basale ou apicale de certaines protéines transmembranaires assure le maintien des caractéristiques du milieu (Luedtke et al., 2002; Badran et Hermo, 2002; Bagnis et al., 2001; Ilio et Hess, 1992). Il a été démontré que les cellules épithéliales principales de l'épididyme incorporent des acides aminés radioactifs et des sucres avant de les relâcher vers la lumière (Flickinger et al., 1983). Ainsi on retrouve dans la lumière de l'épididyme des concentrations en protéines, en ions et un pH qui diffèrent du plasma sanguin et qui est spécifique à l'épididyme. Le microenvironnement que procure la barrière hémato-épididymaire est essentiel pour la maturation des spermatozoïdes qui traversent le canal de l'épididyme.

3.3 Les protéines transmembranaires des jonctions serrées

3.3.1 L'Occludine

L'occludine, avec une masse moléculaire de 60-65 kDa a été la première composante transmembranaire identifiée formant les jonctions serrées (Furuse et al., 1993; Ando-Akatsuka et al., 1996). Cette protéine a quatre domaines transmembranaires avec ses deux extrémités, NH_2 et COOH, dans le cytoplasme (figure7a). L'extrémité C-terminal se lie à plusieurs protéines associées à la face cytosolique des jonctions membranaires, c'est-à-dire ZO-1, ZO-2 , ZO-3 et cingulin mais aussi aux filaments d'actine (Furuse et al., 1994; Fanning et al., 1998; Cordenonsi et al., 1999). L'extrémité N-terminal influence peut-être la distribution de l'occludine au niveau des jonctions en se liant à des protéines de la plaque jonctionnelle. Cependant aucune protéine n'a été jusqu'ici identifiée mais une étude faite sur un isoforme d'occludine (occludine–1B) possédant une terminaison-N avec différents acides aminés suggère un rôle fonctionnel et structurel à cette extrémité (Muresan, Paul et Goodenough, 2000).

L'occludine est impliqué dans la transport paracellulaire sélectif. Les évidences viennent d'expériences faites avec les cellules MDCK. Une surexpression de la protéine occludine "sauvage" résulte en une surrégulation de la perméabilité paracellulaire (Balde et al., 1996a; McCarthy et al., 1996). De plus, l'expression de l'occludine sans domaine cytosolique C-terminal provoque ce phénotype, suggérant ainsi que les interactions faites par ce domaine sont importantes pour la régulation de la perméabilité paracellulaire (Balda et al., 1996a). Cependant il n'est pas clairement démontré si l'occludine sert de régulateur de la perméabilité ou est impliqué directement dans ce processus.

Dans les tubules séminifères des testicules de rat et de souris, l'occludine a été localisé au niveau de la jonction serrée, entre deux cellules de Sertoli (Moroi et al., 1998). L'occludin est présent dans le testicule de souris, à la base des tubules dès l'âge de 14 jours après la naissance, ce qui correspond à l'établissement de la barrière hémato-

testiculaire (Cyr et al., 1999). Lors du développement de l'épididyme, l'occludine est localisée apicalement chez la souris dès le jour 18.5 embryonnaire (Cyr et al., 1999).

Néanmois, l'occludine n'est pas essentielle à la formation de la barrière paracellulaire (Saitou et al.,1998) pas plus qu'elle n'affecte son intégrité lorsque la distribution continue de l'occludine est perturbée (Balda et al., 1996a). Ainsi, occludine influence peut-être la diffusion paracellulaire et l'expression d'une forme mutée peut influencer la formation des barrières, mais occludine n'est pas une composante essentielle des jonctions serrées (Balda et Matter, 2000). En effet, Saitou et al. (1998) ont démontré que occludine n'est probablement pas la seule protéine transmembranaire formant les jonctions serrées puisque des cellules embryonnaires déficientes en occludine pouvaient se différencier en épithélium polarisé et former des jonctions serrées.

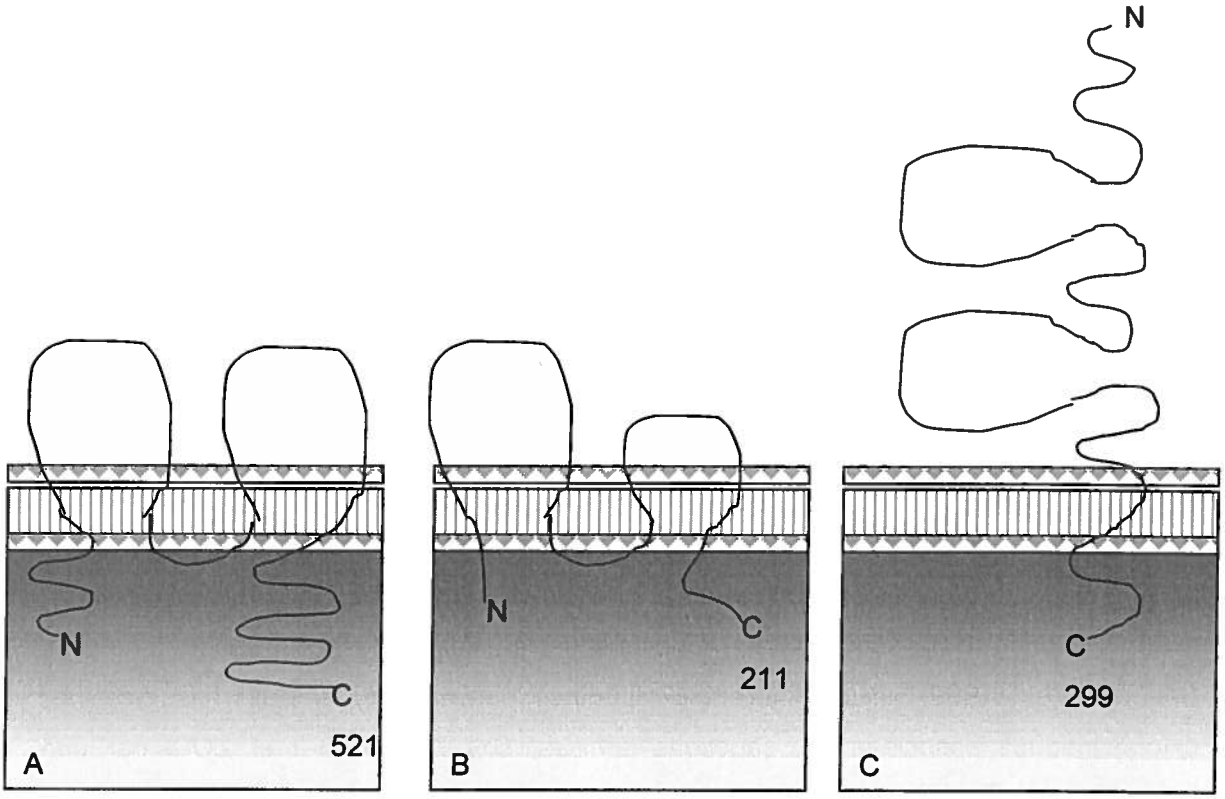


Figure no. 7 : Protéines transmembranaires des jonctions serrées

A) Schéma de la protéine occludine avec quatre domaines transmembranaires

B) Schéma de claudine-1 avec quatre domaines transmembranaires, mais aucune séquence similaire à l'occludine

C) Schéma de la protéine JAM avec un seul domaine transmembranaire

*figure inspirée de Tsukita et al. 2001

3.3.2 Les claudines

Les claudines forment une autre famille de gènes dans laquelle on dénombre au moins 18 membres (Morita et al., 1999) et ont un poids moléculaire d'environ 22-24kDa. Les claudines, contenant aussi quatres domaines transmembranaires ont été identifiées comme étant des constituantes du squelette des jonctions serrées (Furuse et al., 1998a; Furuse et al., 1998b) et les deux terminaisons (N et C) se retrouvent dans le cytoplasme (figure 7b). Les différentes claudines ont une distribution qui varie selon le tissu, par exemple, claudine-5 est distribuée de façon très répandue et se retrouve dans les cellules endothéliales, tandis que claudine-4 est retrouvée principalement dans les poumons et le rein (Lapierre, 2000). La grande diversité des claudines est due à des différences dans leur troisième et quatrième domaines transmembranaires et à leur queue C-terminale (Morita et al., 1999). Toutes les queues C-terminale des claudines se terminent par un motif Y-V.

Claudine-1 et claudine-2 ont été retrouvées avec l'occludine dans la fraction jonctionnelle (Furuse et al., 1998a). Cependant, aucune évidence d'une interaction directe avec l'occludine n'a été démontrée et les claudines ne se copurifient pas avec l'occludine. Plusieurs claudines ont été clonées et séquencées avant l'identification de claudine-1 et –2 sans être asssociées aux jonctions serrées. Par exemple, claudine-11/protéine spécifique des oligodentrocytes (OSP) est aussi associée avec les cellules de Sertoli et les jonctions serrées de la myéline du système nerveux central (Gow et al., 1999), claudine-5/protéine transmembranaire délétée du syndrôme velo-cardio-facial (TMVCF) lequel est associé à des jonctions serrées dans des cellules endothéliales (Morita et al., 1999). Huit différentes claudines peuvent se lier aux trois protéines cytoplasmiques associées aux jonctions serrées, soit ZO-1, ZO-2 et ZO-3 par une interaction impliquant l'extrémité C-terminale des claudines et le domaine PDZ des protéines de la plaque jonctionnelle (Itoh et al., 1999).

Les claudines sont directement impliquées dans les ponts formant les jonctions serrées (Furuse et al., 1998a). De plus, pour certaines jonctions serrées, la présence de membres de la famille des claudines est essentielle pour la formation des jonctions serrées : les souris déficientes en OSP/ claudine-11 ne peuvent assembler les jonctions

serrées dans les cellules de Sertoli et dans la myéline du système nerveux central (Gow et al., 1999). De plus, une étude faite sur des souris déficientes en claudine-1 a démontré que la présence de cette claudine au niveau des jonctions serrées est essentielle afin qu'elles puissent remplir leur rôle de barrière dans la peau de mammifères (Furuse et al., 2002).

Paracellin-1 (claudine –16) est le seul membre de la famille à être impliqué dans la perméabilité sélective de la diffusion paracellulaire. Paracellin-1 fait parti des jonctions serrées du système rénal au niveau du tubule ascendant de l'anse de Henle et est nécessaire pour la réabsortion paracellulaire du Mg^{2+} (Simon et al., 1999). Comme l'occludine, il n'est cependant pas connu si paracellin-1 fonctionne en tant que régulateur ou s'il est directement impliqué dans la diffusion sélective du Mg^{2+} dans le rein.

Dans l'épididyme, la protéine ainsi que l'ARNm de claudine-1 sont présents dans tous les segments, et ce, dès que l'animal atteint l'âge de 7 jours (Gregory et al., 2001). Par contre, la localisation de claudine-1 ne semble pas limitée au niveau des jonctions serrées et se retrouve le long de la membrane plasmatique des cellules principales ainsi qu'entre les cellules basales et principales et ce dans tous les segments. Ceci suggère que claudine-1 en plus de faire partie des jonctions serrées est probablement impliquée dans d'autres interactions cellulaires. Dans une étude de régulation, utilisant des rats orchidectomisés et des rats orchidectomisés avec remplacement de la testostérone, la localisation de claudine-1 est indépendante des androgènes et des facteurs testiculaires seulement dans le segment initial de l'épididyme. Dans les autres régions de l'épididyme, claudine-1 ne semble pas régulée par les facteurs testiculaires (Gregory et al., 2001).

3.3.3 JAM (Molécules de jonctions adhérentes)

JAM est une protéine transmembranaire de 36-41 kDa identifiée chez la souris comme étant une composante des jonctions serrées (Martin–Padura et al.,1998) (figure 7c). Elle est membre de la superfamille des Ig et influence la transmigration paracellulaire des cellules immunitaires (Fanning, Mitic, et Anderson, 1999). En effet, les jonctions serrées doivent s'ouvrir et se refermer afin de permettre aux leucocytes de se rendre aux

sites inflammatoires. Cette transmigration se produit par la route paracellulaire. Par immunofluorescence, JAM a été localisée dans des cellules de l'intestin, des poumons et du rein principalement au niveau des jonctions serrées, mais aussi le long de la membrane plasmique sous les jonctions serrées (Liu et al., 2000). Par une double immunofluorescence, les résultats obtenus démontrent qu'il y a une colocalisation au niveau des jonctions serrées entre occludine et JAM (Liu et al., 2000). Par des études fonctionnelles, ils ont aussi démontré que JAM a un rôle important dans la régulation de l'assemblage des jonctions serrées dans l'épithélium (Liu et al., 2000). Utilisant la lignée cellulaire T84, qui sont des cellules épithéliales polarisées qui contiennent des jonctions serrées et forment une excellente barrière, la résistance transépithéliale a été calculée suite à la destruction des jonctions serrées par le rétirement du calcium. Le rétablissement de la résistance transépithéliale était significativement diminuée en présence de l'anticorps monoclonal anti-JAM. De plus, toujours en présence de l'anticorps, la relocalisation de l'occludine au niveau des jonctions serrées était aussi perturbée. Cependant, ZO-1 et E-cadhérine n'étaient pas affectées par la présence de l'anticorps et rejoignait leur localisation respective (TJ et AJ). Ainsi Jam, semble être un joueur important durant l'assemblage des jonctions serrées, plus spécifiquement dans la relocalisation de l'occludine (Liu et al., 2000).

3.4 La famille MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase)

Les protéines de la famille MAGUK jouent un rôle important dans la création et le maintien de domaines spécialisés de la membrane dans différents types de cellules (Anderson, 1996). Ces protéines localisent dans la région sousmembranaire au niveau des jonctions serrées et agissent comme ligant entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette de filaments d'actine. La description de cette molécule a été faite pour la première fois par Daniel Goodenough (1986), qui a identifié cette protéine de 225 kDa exclusivement localisée au niveau des jonctions serrées (Stevenson et al., 1986).

Tous les membres de la famille sont formés de trois domaines PDZ, un domaine SH3, un domaine guanylate kinase (GUK) ainsi qu'une région carboxyle. Les domaines PDZ sont ainsi nommés à cause des protéines originellement identifiées : **P**SD-95, une protéine post-synaptique (postsynaptic density protein), **D**lg-A, un suppresseur de

tumeur chez *Drosophila,* et ZO-1, une protéine des jonctions serrées. Les domaines PDZ peuvent former des dimères en se liant à un domaine PDZ retrouvé sur une autre protéine (Gonzalez-Mariscal et al., 2000). Il a été d'abord suggéré que ces domaines se liaient spécifiquement aux extrémités C-terminale Glu-Ser/Thr-Asp-Val, mais il est maintenant connu qu'ils reconnaissent plusieurs séquences de quatre acides aminés qui se terminent le plus souvent par une valine (Val) (Tsukita, Furuse et Itoh, 2001). Le domaine SH3 (Src homology region 3) est composé de 55-70 acides aminés. Les ligants pour SH3 ont, au minimum, 7 résidus de long et contiennent des séquences PXXP. Le domaine GUK est homologue aux enzymes catalytiques qui convertissent GMP en GDP en présence d'ATP (Gonzalez-Mariscal et al., 2000). Les protéines MAGUK des jonctions serrées sont cependant inactives (Haskins et al., 1998). La région C-terminale commence à la fin du module GUK et inclue un domaine acidique et quelquefois un domaine riche en proline. La longueur et les composantes de ce domaine sont très variables selon la protéine. Ainsi, ZO-1 possède une extrémité C-terminale trois fois et dix fois plus longue que ZO-2 et ZO-3, respectivement (Beatch et al., 1996; Gonzalez-Mariscal et al., 1999).

Jusqu'à maintenant, trois protéines MAGUK sont associées aux jonctions intercellulaires. Les membres de la famille sont ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (Stevenson et al., 1986, Gumbiner et al., 1991, Haskins et al., 1998).

3.4.1 ZO-1

ZO-1 a un poids moléculaire entre 210 et 225 kDa et est concentré au niveau de la jonction serrée dans les cellules épithéliales (Stevenson et al., 1986). Cependant , il est aussi retrouvé dans des cellules non-épithéliales comme les astrocytes, les cellules de Schawnn et les fibroblastes (Howarth, Hughes et Stevenson, 1992).

ZO-1 possède une queue riche en proline, une région acidique juste après son domaine GUK et deux domaines d'épissage. Le premier domaine d'épissage, α, est formé de 80 acides aminés et est situé tout juste sous le domaine acidique. Il existe deux isoformes de la protéine, un possédant le domaine α (α+), et l'autre en étant dépourvu (α-). Les cellules peuvent exprimer l'un ou l'autre des isoformes ou les deux. Il y a quelques

évidences que l'isoforme α+ est associé avec des jonctions plus serrées tandis que l'isoforme α- est associé avec des jonctions plus perméables (Willot et al., 1993). Le second domaine d'épissage, β, se situe près de l'extrémité C-terminale de ZO-1. Présentement, il n'y a aucune corrélation entre ce domaine et la localisation ou les fonctions de ZO-1 (Willott et al., 1993).

3.4.1.1 ZO-1 et la jonction d'adhérence

ZO-1 est aussi localisé avec les cadhérines dans les cellules non-épithéliales et n'ayant pas de jonctions serrées, comme le muscle cardiaque et les fibroblastes (Itoh et al., 1991). Son rôle dans les jonctions d'adhérence est cependant moins bien connu, mais il a été démontré que ZO-1 lie E-cadhérine indirectement au cytosquelette par l'intermédiaire de α-caténine et le complexe nectin-afadin (Cadigan et Nusse, 1997, Itoh et al., 1997; Yokoyama et al., 2001). De plus, une étude faite avec des cellules cancéreuses du sein a démontré que ZO-1 s'associe avec le complexe E-cadhérine et que son expression (ARNm et protéine) augmentait suite à une stimulation par IGF-IR (insulin-like growth factor I receptor) (Mauro et al., 2001). Il a aussi été démontré que ZO-1 se lie à une protéine des jonctions de type gap, la connexine-43 suggérant que ZO-1 pourrrait être impliqué dans la régulation de la formation des jonctions gap (Toyofuku et al., 1998).

Lors de la phase initiale de la formation des jonctions cellulaires dans les cellules épithéliales, ZO-1 est précisement localisé avec les cadhérines alors que les jonctions serrées ne sont pas encore formées. Lors d'un stade de développement plus avancé, ZO-1 est transféré de la jonction d'adhérence vers la jonction serrée (Yonemura, et al., 1995; Ando-Akatsuka, 1999). De plus, au début de la formation des jonctions serrées, une interaction entre ZO-1 et les caténines a été démontrée et cette interaction est perdue lorsque la formation des jonctions serrées est terminée (Rajasekaran et al., 1996).

Dans l'épididyme de rat, la distribution de ZO-1 varie en fonction du segment et de l'âge de l'animal (Levy et Robaire, 1999). En effet, une étude faite sur des rats agés de 3-18 et 24 mois a démontré que la localisation de ZO-1, mais aussi E-cadhérine et occludine

changeait selon le segment et l'âge des animaux et ces résultats corrélaient avec la pénétration du nitrate de lanthanum. Dans les cellules de Sertoli, Moroi et al (1998) ont démontré que ZO-1 se retrouve au niveau des jonctions serrées dans des cellules sans occludine.

Plusieurs autres protéines ont été suggérées pour interagir avec ZO-1, mais les domaines impliqués et les raisons physiologiques sont encore inconnus.

3.4.2 ZO-2

ZO-2 a une masse moléculaire de 160 kDa et contient aussi trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine GUK suivi d'un court domaine riche en proline à son extrémité carboxyle. Initialement, ZO-2 a été identifié comme une protéine spécifique de la jonction serrée (Jesaitis et Goodenough, 1994), mais de plus récentes recherches ont démontré la présence de ZO-2 au niveau de la jonction d'adhérence dans les cellules non-épithéliales et que cette protéine a une affinité pour occludine et α-caténine (Itoh, Morita et Tsukita, 1999).

Dans les cellules pancréatiques, deux transcrits, A et C, existent et diffèrent seulement à leur extrémité 5'. Tandis que l'ARNm de la forme A possède le codon initiateur à son extrémité 5' formé de 189 paires de base, l'extrémité 5' de l'isoforme C n'est pas transcrit. Contrairement aux cellules normales, les cellules adenocarcinoma du pancréas expriment seulement la forme C, suggérant ainsi que les 23 acides aminés de l'isoforme A contiennent un motif important pour la régulation de la croissance cellulaire (Chlenski et al., 1999).

3.4.3 ZO-3

ZO-3 a d'abord été identifié comme une protéine phosphorylée de 130 kDa nommée p130 qui précipite avec le ZO-1 (Balda et al., 1993). Il a ensuite été démontré que cette protéine est localisée au niveau des jonctions serrées avec ZO-1 et ZO-2 et est un membre de la famille MAGUK, de là, l'appellation ZO-3 a été proposée (Haskins et

al.,1998). Cette molécule possède les mêmes caractéristiques structurales que ses sœurs, ZO-1 et ZO-2, mais un domaine riche en proline a été trouvé entre le deuxième et troisième domaine PDZ et contient trois motifs de liaison pour SH3. Aucune région d'épissage alternative n'a été retrouvé sur ZO-3 jusqu'à maintenant (Haskin et al. , 1998).

3.5 Les interactions entre les protéines MAGUK

Afin de bien comprendre la physiologie des différentes barrières, il est d'abord essentiel de définir les interactions entre les constituants des jonctions serrées. ZO-1, ZO-2 et ZO-3 forment des complexes très stables qui sont détectés malgré des conditions très rudes et dans des cellules sans jonctions serrées (Balda et al., 1993). Ces interactions très fortes sont possibles grâce à leur domaine PDZ2. Ainsi ZO-1 se lie ZO-2 et ZO-3 par des interactions entre leurs domaines PDZ2/PDZ2. Cependant ZO-2 et ZO-3 n'interagissent pas directement ensemble (Itoh, Morita et Tsukita, 1999; Itoh et al., 1999; Hankins et al., 1998). Ces recherches ont été effectuées avec des homogénats de cellules entières et ne peut donc confirmer que les interactions observées sont directes ou avec des intermédiaires. Une étude in vitro a été faite avec des protéines recombinantes purifiées et les résultats suggèrent que des complexes de deux protéines, soient entre ZO-1/ZO-2 et ZO-1/ZO-3 sont formés plutôt que le groupe trimérique ZO-1/ZO-2/ZO-3 (Wittchen, Haskins et Stevenson, 1999).

3.6 Les interactions entre les protéines transmembranaires des jonctions serrées et les protéines MAGUK

NH_2-ZO-1 (Furuse et al., 1994), NH_2-ZO-2 (Itoh, Morita et Tsukita, 1999) et toute la longueur de ZO-3 (Haskins et al., 1998) se lient directement au domaine cytoplasmique C-terminal de l'occludine. Des caractérisations supplémentaires ont permis d'identifier le domaine GUK et le domaine acidique de ZO-1 comme étant la région se liant à l'occludine (Fanning et al., 1998). Ainsi, l'occludine est liée aux filaments d'actine par ZO-1.

Une étude faite sur l'interaction entre les claudines et les protéines MAGUK a démontré que le domaine PDZ1 de ZO-1, ZO-2 et ZO-3 leur permet de se lier directement à la séquence YV de l'extrémité COOH-terminal des claudines (Itoh et al., 1999). En effet, la plupart des claudines ont une Val à leur terminaison carboxyle, sauf claudine-12, ce qui en font de bon candidats pour l'interaction avec les domaines PDZ (Itoh et al., 1999). Des fibroblastes L transfectés avec différentes claudines recrutent les protéines MAGUK au site des jonctions seulement si l'extrémité COOH des claudines est intacte (Itoh et al., 1999), suggèrent ainsi que les protéines MAGUK des jonctions serrées sont incapables de se localiser au niveau des jonctions serrées sans être liées avec les claudines.

De plus, la protéine transmembranaire Jam se termine aussi avec une valine, et il a été récemment démontré que cette protéine interagit avec ZO-1 (Bazzoni et al., 2000) et d'autres protéines contenant un domaine PDZ (Ebnet et al., 2000). JAM permet la localisation de ZO-1 au niveau des jonctions en établissant une interaction cellulaire fonctionnelle (Bazzoni et al., 2000). Cette association se produit aussi avec occludine et se retrouve dans la fraction insoluble de cellules Caco-2 traitées avec Triton X-100. Ils suggèrent ainsi que JAM influence l'architecture des jonctions serrées en interagissant avec ZO-1 et cinguline et stabilise occludine au niveau des jonctions serrées (Bazzoni et al., 2000).

3.7 Maguk et signal de transduction

Quelques observations suggèrent que les composantes de la jonction serrée pourrait, en plus de leur rôle structurel, être impliquées dans des signaux de transduction. ZO-1 est une protéine ressemblant au suppresseur de tumeur *Drosophila discs-large* (Dlg-A) qui est une composante des jonctions septates chez *Drosophila* et ce dernier, Dlg-A, est impliqué dans une cascade durant la mitose (Willott et al., 1993). ZO-1, lui-même a été retrouvé dans le noyau de cellules épithéliales en migration ou dans des cellules épithéliales forcées à migrer par l'ajout de HGF(hepatocyte grow factor) (Gottardi, et al., 1996). Afin d'explorer les possibilités que ZO-1 puissent avoir un rôle additionnel à celui qu'il a dans les jonctions serrées, une équipe a exprimé ZO-1 avec différentes délétions au niveau de l'extrémité C-terminale dans les cellules MDCK. Dans ces cellules, ZO-1 délété, mais possédant son extrémité N-terminal et ses domaines PDZ, ne se retrouve plus à la membrane et induit chez les cellules une perte du phénotype épithélial (Reichert, Muller et Hunziker, 2000). Ce changement de phénotype implique des changements de potentiel et de tumorigénicité chez les cellules en plus d'une répression des gènes de E-cadhérine et fibronectine. Fait intéressant, la cascade β-cat/Tcf/Lef (Wint/Wg) est aussi induite dans ces cellules (Reichert, Muller et Hunziker, 2000). Ces résultats suggèrent que la localisation cytosolique de ZO-1 transforme les cellules MDCK1 en modulant directement ou indirectement la cascade impliquant β-caténine.

Tout récemment, un facteur de transcription nommé ZONAB (ZO-1 associated nucleic acid-binding protein) a été identifié et se lie au domaine SH3 de ZO-1. ZONAB localise dans le noyau et au niveau des jonctions serrées et se lie à des séquences spécifiques de promoteurs contenant une boite CAAT. Ils ont aussi démontré que ZONAB et ZO-1 interagissent pour la régulation du promoteur ErbB-2. Encore une fois, ces résultats suggèrent clairement que les protéines des jonctions serrées, ZO-1 participent directement dans le contrôle de l'expression de gènes (Balda et Matter, 2000).

3.8 Le développement de la barrière hémato-épididymaire

Chez les souris, l'établissement d'une barrière hémato-testiculaire imperméable se produit entre les jours dix et seize après la naissance (Nagano et Suzuki, 1976) et durant les vingt premiers jours après la naissance chez le rat (Kormano et al., 1967). Dans l'épididyme de rat, Agarwal et Hoffer 1989 ont démontré que la barrière était perméable au jour 11 après la naissance. Par contre, au jour 14, les jonctions serrées au niveau de la tête de l'épididyme étaient imperméables et progressivement, les jonctions au niveau du corps et de la queue deviennent imperméables aux jours 18 et 21, respectivement. Les caractéristiques structurales du complexe jonctionnel entre les cellules principales chez le rat adulte varient selon le segment de l'épididyme (Cyr et al., 1995) et les facteurs régulant le développement de la barrière sont encore inconnus.

La formation des jonctions serrées entre deux cellules adjacentes requièrent que les cellules adhèrent d'abord, l'une à l'autre et forment des jonction d'adhérence (Denker et Nigam, 1998; Cyr et al., 2002). Les jonctions d'adhérence servent, non seulement à l'adhésion entre deux cellules, mais jouent aussi un rôle dans des cascades de signalisation intracellulaire et sont impliquées dans le positionnement et dans l'assemblage des protéines des jonctions serrées (Gumbiner et al. 1988; West et al. 2002)

4. Régulation des jonctions serrées par les protéines de la jonction d'adhérence

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer les étapes de l'assemblage et de la régulation des jonctions serrées. En effet, une multitude de cascades de signalisation a été proposée incluant les kinases (Balda et al., 1993) le Ca^+ (Stuart et al., 1996), les protéines G (Denker et al., 1996), calmoduline, AMPc et la phospholipase C (Balda et al., 1991). Des techniques par retrait de calcium «calcium Switch» ou par le blocage de l'ATP «ATP Depletion» sont très utilisées pour l'étude de la régulation des jonctions serrées. Toutefois des résultats différents ont été signalés suggérant que les mécanismes d'assemblage peuvent différer significativement en fonction de la cause du désassemblage.

Depuis peu, plusieurs recherches ont démontré que les composantes de la jonction d'ahérence jouent d'autres rôles en plus de l'adhésion cellulaire (Gumbiner 2000, Berx et Van Roy, 2001). L'implication de β-caténine dans la cascade de Wnt/Wg comme activateur de la transcription de gènes est un bon exemple (Taipale et Beachy, 2001). E-cadhérine pourrait aussi avoir un rôle en tant que suppresseur de gène tumoral (Perl et al., 1998), mais plusieurs études sur le rôle fonctionnel des cadhérines lors de la formation des jonctions serrées suggèrent qu'elles peuvent être impliquées directement ou indirectement dans ce processus. Gumbiner et Simons (1986), ont démontré qu'un anticorps dirigé contre E-cadhérine inhibe la formation des jonctions serrées dans les cellules MDCK. Dans le rein, E-cadhérine et ZO-1 colocalisent au niveau des jonctions serrées (Itoh et al., 1993). Balda et al. (1993), ont démontré que le diacylglycérol (DAG) peut stimuler la formation des jonctions serrées en présence d'un anticorps dirigé contre E-cadhérine. Cette dernière recherche suggère que E-cadhérine peut-être impliqué dans une cascade de signalisation impliquant DAG et la protéine kinase C. Cependant, des observations faites sur des blastocystes de souris E-cadhérine-null forment des jonctions serrées normales (Ohsugi et al., 1997) ce qui indique que E-cadhérine n'est probablement pas la seule protéine intégrale à contribuer à l'assemblage et la stabilisation des jonctions serrées.

En plus de E-cadhérine, il est maintenant fréquent d'observer des interactions directes entre les caténines et les protéines des jonctions serrées, ce qui pourrait suggérer une certaine régulation des jonctions serrées par les protéines de la jonction d'adhérence. Au début de la formation des jonctions serrées, une interaction entre ZO-1 et les caténines a été démontrée. Cette interaction est perdue lorsque la formation des jonctions est terminée (Rajasekaran et al., 1996). En effet, par un double marquage en microscopie électronique, la colocalisation de β-caténine et ZO-1 était visible 2hrs après avoir ajouté le calcium. Par contre, 48 hrs plus tard cette association était perdue et le marquage de ZO-1 se retrouvait plutôt apicalement tandis que β-caténine était située plus bas le long de la membrane, sous le signal de ZO-1 (Rajasekaran et al., 1996). Ces résultats suggèrent que β-caténine influence la formation des jonctions serrées en se liant à ZO-1.

Une autre étude démontre que, lors de la phase initiale de la formation des jonctions intercellulaires entre les cellules épithéliales, ZO-1 est précisement localisé avec les cadhérines lorsque les jonctions serrées ne sont pas encore formées. Lors d'un stade de développement plus avancé, ZO-1 est transféré de la jonction d'adhérence vers la jonction serrée (Yonemura, et al., 1995). Le site de liaison pour ZO-1 retrouvé sur α-caténine semble influencer la force de l'adhésion dans les cellules non-épithéliales, mais ZO-1 ne semble pas être important pour que E-cadhérine puisse jouer son rôle dans les cellules épithéliales (Imamura et al., 1999).

Récemment, un nouveau complexe protéique, nectin-afadin, localisé au niveau des jonctions adhérentes a démontré la capacité de recruter ZO-1 au niveau de ce complexe. Le complexe semble être impliqué dans la localisation de ZO-1 durant la formation des jonctions d'adhérence. Nectin, est une protéine Ca^{2+}-indépendante qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. On compte au moins trois membres qui ont un motif très conservé à leur extrémité C-terminale et comprenant quatre acides aminés (E/A-X-Y-V) qui interagissent avec le domaine PDZ de afadin (Satoh-Horikawa et al., 2000). Afadin est une protéine formée d'un domaine PDZ et trois domaines riches en proline et relie nectin au cytosquelette de filaments d'actine. Ainsi, nectine recrute non seulement α-caténine, mais aussi ZO-1 au site d'adhésion formé par nectine (Yokoyama et al., 2001).

Beaucoup plus d'informations sont nécessaires afin de bien comprendre la fonction de ces importantes interactions. La complexité des jonctions serrées pour la régulation de la diffusion paracellulaire et la polarisation des cellules est bien évidente. Bien qu'il y ait eu un progrès important dans l'identification des protéines formant les jonctions serrées, une meilleure compréhension de la régulation, de l'assemblage et de la maintenance des jonctions demeurent un réel défi. Dans plusieurs types cellulaires, cette structure dynamique est essentielle à plusieurs fonctions cellulaires importantes. En ce sens, il n'est pas surprenant que les jonctions serrées soient formées d'un complexe de protéines régulées de façon différente, ce qui leur permet de s'adapter à diverses situations biologiques. La compréhension des mécanismes d'assemblage des jonctions serrées sera d'un intérêt tout particulier dans l'avenir puisqu'il pourrait rendre possible l'intervention thérapeutique dans des cas de déficiences rénale et intestinale et peut-être expliquer certaines causes de l'infertilité jusqu'à maintenant inconnues.

L'avancement des connaissances des jonctions intercellulaires présentes dans l'épididyme est essentiel pour approfondir les connaissances de la physiologie de la barrière hémato-épididymaire. Ainsi l'identification et la régulation des composantes de la jonction d'adhérence dans l'épididyme et les interactions entre ces protéines et les protéines des jonctions serrées sont essentielles afin de mieux comprendre et éventuellement expliquer la régulation de cette barrière. Le principal objectif de la section << article >> se veut un avancement dans ce sens et offre des informations importantes sur les protéines des jonctions d'adhérence dans l'épididyme et l'interaction entre β-caténine et ZO-1 durant l'établissement de la barrière.

HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Cette revue de littérature se voulait d'abord une recherche sur les différents sujets traités lors de ce projet de maîtrise. L'étude de l'épididyme démontre l'importance dece tissus pour la maturation des spermatozoïdes et le rôle que tient la barrière hémato-épididymaire afin que puisse se produire tous les changements morphologiques. Il était aussi important de démontrer la relation qui existe entre les jonctions serrées et les jonctions d'adhérence. Il est clair que cette dernière est essentielle au bon fonctionnement des jonctions serrées responsable des barrières. Plusieurs études ont démontré un lien direct entre les jonctions d'adhérence et les jonctions serrées. Par conséquent, l'étude des jonctions d'adhérence dans l'épididyme peut apporter des informations importantes sur la régulation de la barrière hémato-épididymaire.

L'objectif principal de ce projet de recherche était de trouver les facteurs pouvant être impliqués dans la régulation de la barrière hémato-épididymaire. Sachant que la jonction d'adhérence est impliquée, via des cascades de signalisation, avec les jonctions serrées, l'étude de la jonction d'adhérence dans l'épididyme constituait l'objectif principal de ce projet de recherche.

Une première hypothèse a été formulée à l'effet que, comme E-cadhérine, les protéines cytoplasmiques de la jonction d'adhérence étaient régulées par les androgènes. La deuxième hypothèse était que l'association entre β-caténine et ZO-1 variait pendant le développement de la barrière démontrant ainsi l'implication de β-caténine lors de la formation de la barrière.

Par immunohistochimie, la localisation et la régulation des protéines cytoplasmiques, β-, α- caténine et $p120^{ctn}$ ont été étudiées. De plus, par immunoprécipitation, l'association entre les différentes protéines de la jonction d'adhérence et l'association entre β-caténine et ZO-1 ont procuré des informations importantes sur les interactions entre ces différentes protéines.

Les résultats de cette recherche se retrouvent dans le deuxième chapitre de ce mémoire intitulé << article >> (statut : acceptation sous condition).

CHAPITRE 2 : ARTICLE

CATENINS IN THE RAT EPIDIDYMIS : THEIR EXPRESSION AND REGULATION IN ADULTHOOD AND DURING POSTNATAL DEVELOPMENT

Résumé français de l'article

Les jonctions serrées forment la barrière hémato-épididymaire et permettent la maturation, le storage des spermatozoïdes et procurent une protection contre le système immunitaire. Les jonctions d'adhérence doivent être préalablement formée pour que les jonctions serrées puissent s'assembler. Les jonctions d'adhérence sont formées de protéines transmembranaires, les cadhérines et de protéines cytoplasmiques, les caténines. Les caténines ont plusieurs fonctions structurales et/ou sont impliquées dans diverses cascades de signalisation. Dans l'épididyme, l'interaction entre les protéines des jonctions serrées et les caténines reste à démontrer.

Chez l'animal adulte normal, l'immunoréaction des trois caténines se retrouve le long de la membrane plasmique entre deux cellules épithéliales voisines. L'immunoréaction pour β-caténine est plus importante dans le segment initial, tandis que le signal pour $p120^{ctn}$ est plus important dans la tête et pour α-caténine elle est plus importante dans le corps de l'épididyme. Une orchidectomie bilatérale chez les rats adulte, d'une duré de 14 jours, affecte la localisation de β- et α-caténine, devenant cytoplasmique. Chez les animaux orchidectomisés avec traitement de testostérone, la localisation de ces deux caténines demeure le long des membranes plasmiques suggérant que la localisation de ces protéines est régulée par les androgènes dans ce tissu. Des expériences d'immunobuvardage des différentes régions de l'épididyme chez les rats adultes démontrent que les caténines et de ZO-1 sont présents dans ces différents segments. L'immunoprécipitation de β-caténine démontre que α-caténine et $p120^{ctn}$ sont lié à β-caténine dans l'épididyme et font parti des jonctions d'adhérence dans ce tissu. De plus, l'immunoprécipitation de ZO-1 démontre que cette protéine est liée à β-caténine durant la formation de la barrière hémato-épididymaire suggérant l'implicationde β-caténine durant l'établissement de la barrière.

CATENINS IN THE RAT EPIDIDIYMIS: THEIR EXPRESSION AND REGULATION IN ADULTHOOD AND DURING POSTNATAL DEVELOPMENT

Sophie DeBellefeuille, Louis Hermo, and Daniel G. Cyr

INRS-Institut Armand Frappier (SD, DC), Université du Québec, Pointe Claire, Québec and the Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University (LH, DC), Montreal, Québec, Canada.

Running Title : Catenins in the Epididymis

Key Words : Adhering junction, blood-epididymal barrier, cell adhesion, development

Address for Correspondence:

Dr. Daniel G. Cyr
INRS-Institut Armand Frappier
Université du Québec
245 Hymus boulevard
Pointe Claire, Québec, H9R 1G6.
Tel. (514) 630-8833
Fax. (514) 630-8850
e-mail. daniel.cyr@INRS-sante.uquebec.ca

ABSTRACT

Tight and adhering junctions play important roles in maintaining the integrity of the epididymal epithelial cells and blood epididymal barrier, and this is crucial for sperm maturation, viability and storage. The composition of the catenin-adhering junctional family of proteins and their relationship with tight junctions remains, however, to be established in the epididymis. In the normal adult epididymis, immunostaining for all three catenins was noted along the lateral plasma membranes (LPM) between the adjacent epithelial cells, with β-catenin being maximally expressed in the initial segment, $p120^{ctn}$ in the caput, corpus and cauda regions, and α-catenin in the corpus region. Bilateral orchidectomy of adult rats sampled 14 days later indicated that the expression of $p120^{ctn}$ at the LPM was not altered as compared to control animals. Conversely, while also reduced at the LPM for α- and β-catenin, an intense cytoplasmic reaction was observed in each epididymal region. Since the staining pattern for these catenins returned to control levels after testosterone supplementation, and was high at postnatal day 49, when androgens levels are adult-like, it is suggested that expression of the α- and β-catenin at the LPM is regulated by androgens. Furthermore, the cytoplasmic staining seen for α- and β-catenin in orchidectomized rats suggests that targeting to the LPM for both of these proteins is under the control of androgens. Immunoprecipitation of epididymal homogenates of the head region of the epididymis from 7, 18 and 91 day old rats also indicate that ZO-1 is an integral part of the adhering junctional complex at all ages and co-precipitates with each of the β-catenin. Taken together, the data indicate that the three catenins show variable levels of expression in the different epididymal regions, are

regulation in their expression and targeting to the LPM by androgens and are integrally related with each other as well as with ZO-1.

INTRODUCTION

The formation of mature spermatozoa involves not only their development in the testis but also their maturation in the epididymis, where they acquire progressive motility and fertilizing ability. The maturation of spermatozoa in the epididymis is dependent on a number of factors, including the interaction of spermatozoa with proteins secreted from the epididymis, the glycosylation of proteins by Golgi bodies present in the residual lipid droplet, as well as the specific microenvironment of the lumen of the epididymis, which is necessary for spermatozoal maturation (Robaire and Hermo, 1986; Oko et al., 1993; Olson et al., 2002). The formation and maintenance of a luminal microenvironment necessary for sperm maturation is formed by the blood-epididymal barrier, comprised of tight junctions between adjacent principal cells that line the lumen of the epididymis (Cyr et al., 1995; Cyr et al 2002).

The formation of tight junctions between adjacent cells requires that cells first adhere to one another and form adhering junctions (Denker and Nigam, 1998; Cyr et al., 2002;). Adhering junctions serve not only to enable the cells to stick to one another, but also play a role in intracellular signalling, and they appear to be involved in the positioning and assembly of tight junctions. Adhering junctions are composed of single pass transmembrane proteins (cadherins) and cytoplasmic proteins (catenins) that link cadherins to the cytoskeleton and are themselves involved in intracellular signalling (Gumbiner, 2000).

The binding of catenins to the cytoplasmic domain of cadherins is important not only for linking cadherins to the cell cytoskeleton, but also for intracellular signalling (Takeichi, 1991, Steinberg and McNutt, 1999, Gumbiner, 2000; Fukata and Kaibuchi, 2001). Both β- and γ-catenin, or plakoglobulin, have a high degree of homology with the Armadillo family of proteins which encodes components of a signal transduction pathway in *Drosophila* (Peifer et al., 1994).

In the rat epididymis, Cyr et al (1992) and Cyr and Robaire (1991) first reported the presence of both E-cadherin and P-cadherin. E-cadherin is localized to the lateral plasma membranes of adjacent epithelial principal cells (Cyr et al., 1993). Postnatal developmental studies demonstrated that mRNA levels for E-cadherin were well-correlated with the formation of the blood-epididymal barrier. Furthermore, it was shown that E-cadherin mRNA levels were androgen-dependant in all segments of the epididymis (Cyr et al., 1992). The cytoplasmic domain of cadherins forms a tight complex with several proteins which either link cadherins to the cytoskeleton or are involved in signal transduction pathways (Kintner 1992). These include catenins, actinin, vinculin and zonula occludens-1 (ZO-1) (Gumbiner 2000; Berx and Van Roy, 2001; Hajra and Fearon, 2002;).

It has been proposed that the formation of tight junctions first involves the formation of cadherin-based cell adhesion (Gumbiner et al., 1988; Denker and Nigam, 1998). This is followed by the recruitment of the tight junctional cytoplasmic protein ZO-1 to the lateral plasma membrane of the cells via direct interaction with the catenins (α and β) of the adhering junction. As cells become polarized, ZO-1 is sorted out of the adhering junction and becomes part of the tight junctional complex where it is bound to

the cytoplasmic tail of occludin and claudins (Furuse et al., 1994; Itoh et al., 1997, 1999a; Ando-Akatsuka, 1999). Recent studies suggest that ZO-2 may follow a similar path (Itoh et al., 1999b). In cells treated with anti-E-cadherin antibody the translocation of ZO-1 is blocked, but can be overcome with PKC agonists, suggesting that signalling components of adhering junctions regulate this process (Denker and Nigam, 1998;West et al., 2002). There is at present no information regarding the presence of catenin in the epididymis and its regulation.

The objective of the present study was to establish that catenins were present in adhering junctions, to determine if they are regulated by androgens, and to assess whether or not these associate with ZO-1 during the formation of the blood-epididymal barrier in the rat.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Canada (St. Constant, QC). Rats were maintained under a photoperiod of 12 hrs light 12 hours of darkness and received food and water *ad libitum.* All protocols used in this study were approved by the University Animal Care Committee.

Androgen Regulation

To assess whether or not epididymal catenins were regulated by testicular factors or androgens, adult rats (Sprague Dawley, 350-400g), obtained from Charles River Canada were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (50:10 mg/kg). Four sham operated rats were used as controls. Four rats were bilaterally orchidectomized via an abdominal incision and killed 14 days later. Eight other orchidectomized rats were implanted with either an empty 2.5 cm capsule (4 rats) or 18.6 cm capsules (3 measuring 6.2 cm each) (4 rats) containing testosterone. Testosterone-filled polydimethylsiloxane capsules were prepared according to the method outlined by Stratton et al. (1973) and have well characterized steroid release rates (Brawer et al., 1983). The latter mimic epididymal (18.6 cm) testosterone levels, which are 10 times greater than blood levels. To ensure that the newly made capsules would have a constant testosterone release rate and that the initial surge of testosterone release would be complete at the time of implantation into orchidectomized rats, additional carrier rats were implanted with the testosterone implants prior to the start of the experiment. These

implants were removed from the carrier rats 3 days later, cleaned, and inserted subcutaneously on the backs of experimental animals at the time of orchidectomy. All of these rats were killed 14 days after surgery. At the completion of each experimental design, the epididymides were fixed by perfusion with Bouin's fixative, removed from the rats and subsequently processed as described below for immunocytochemical analyses.

Postnatal Development

To determine the postnatal developmental expression of α-, β- catenin, and $p120^{ctn}$ in the epididymis, timed gestation female rats were purchased from Charles River Canada Inc (St. Constant, QC). At the time of birth, pups were sexed and random litters of 10 male pups were placed with each lactating mother. Rats were weaned at 24 days of age. Rats were anesthetized with somnitol and the epididymides of 7-, 21-, 29-, 49-, 56- and 91-day old rats were then fixed by retrograde perfusion through the abdominal aorta with Bouin's fixative as previously described (Cyr et al., 1992). Fixed epididymides were then dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and mounted in paraffin for light microscope immunocytochemical analysis.

Immunocytochemical analysis

Immunoperoxidase staining of section was done according to previously published protocols (Oko and Clermont, 1989). Immunolocalization of catenins was done using goat polyclonal antisera raised against either α-, and β-catenin or a rabbit polyclonal anti-$p120^{ctn}$ (2.7, 2.7 and 2.0 μg/ml respectively; Santa Cruz Biotechnology Labs, Santa Cruz,

CA). Antibody binding to each catenin was detected using either an anti-goat or an anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (1:250; Sigma Chemicals, Mississauga, ON). Slides incubated with normal rabbit serum were used as a negative control, since immuno-absorption was not possible due to the lack of specific antigens.

ZO-1 immunocytochemistry in adult rat epididymis was done using frozen sections. Epididymidies were carefully dissected out and placed in OCT-Cryomatrix (Fisher Scientific, Ottawa, ON) and frozen on dry ice. Solidified blocks of tissues were then stored at –86°C until cut. Ten micron sections were cut and mounted onto glass slides and stored at -20°C until immunocytochemistry. Slides were fixed in methanol for 20 min at -20°C, allowed to air dry, and rehydrated with phosphate buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature and then blocked in buffer (PBS, 3% bovine serum albumin and 5% goat serum) for 20 min at room temperature. This was followed by three 5 minute washes in PBS. Immunocytochemical localization of ZO-1 was done using rabbit polyclonal ZO-1 antisera (5 μg/ml, Zymed Laboratories, South San Francisco, CA). Sections were incubated for 90 min in a hydrated chamber with the primary antibody at room temperature. The sections were then washed in PBS and incubated for 45 min with a FITC-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:250; Jackson Immunoresearch, West Grove PA). The sections were subsequently washed three times in PBS and mounted with Vectashield (Vectastain Laboratories Inc., Burlington, ON). Slides incubated with normal rabbit antiserum were used as a negative control, since immuno-absorption was not possible due to the lack of Cx antigen.

Immunoblotting

Proteins were isolated from frozen segments of four adult epididymides (IS, CT, CS, and CA) were crushed under liquid nitrogen using a mortar and pestle. The tissue was then homogenized with a polytron at 4°C in lysis buffer (1:3 w/vol; 60mM Tris-Cl, 2mM $CaCl_2$, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 40mM β-octylglucopyranoside, 20 μg/ml aprotinin, 20 μg/ml trypsin inhibitor, 20 μg/ml pepstatin A, 40 μg/ml antipain, and 20 μg/ml leupeptin, pH 6.8; Sigma Chemicals). Samples were transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged at 10,000xg for 10min at 4°C. The supernatant, containing the plasma membrane fraction, was then removed and used for immunoblotting. Protein concentrations were determined using the BioRad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON).

Membrane protein samples (50μg) were diluted in loading buffer (Laemmli buffer), boiled for 5 min and cooled at room temperature. The samples were loaded onto a 7% polyacrylamide gel (Cyr et al., 1992b). Electrophoresis was done at 75 V for 1.5-2 hrs until the dye front reached the end of the gel. Proteins were subsequently transferred onto a nitrocellulose membrane using a Bio-Rad Transblot apparatus at 100V for 1hr. Colored molecular weight markers were used to assess the efficiency of the transfer. The blots were blocked overnight in buffer (5% Carnation milk in TBS) and then incubated for 90 min at room temperature with the primary antibody (α-, β-catenin and $p120^{ctn}$, as described above and ZO-1, Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) in buffer (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 0.05% Tween20, pH 7.5). Following incubation, the membranes were washed 3x 5min with TBS-Tween 20. The presence of each catenin was

determined using the Bio-Rad Blotting Detection Kit, which uses a streptavidin-alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody.

Immunoprecipitation

Epididymal proteins were isolated from 7-, 18- and 91-day old rats (4 per age group) as described above and used to immunoprecipitate β-catenin and ZO-1. For the ZO-1 immunoprecitation, a rat monoclonal antibody to ZO-1 (American Tissue Type Culture, Washington DC) was used. Epididymal proteins (800 μg) were immunoprecipitated with 5 or 15μl of undiluted primary antiserum (β-catenin and ZO-1 respectively) in 1 ml of PBS. The proteins and antisera were incubated for 1h at 4°C in a rotating tube. At the end of the incubation, 20 μl of protein G plus-agarose conjugate (Santa Cruz Biotechnology) was added to the proteins and incubated overnight at 4°C in a rotating tube. Samples were then centrifuged at 1000xg for 5 min at 4°C in order to recover the agarose beads. The supernatant was discarded and the pellet of agarose beads was washed once in phosphate buffered saline, 3 times in wash buffer I (500 mM NaCl, 50nM Tris-HCl pH 7.5, 0.05% NP-40 and 0.2%BSA), and twice in wash buffer II (50mMTris-HCl pH 7.5). Agarose beads were recovered after each wash by centrifugation at 1000xg for 5 min at 4°C. The resulting pellets were then boiled in sample buffer for 5min and subjected to electrophoresis and immunoblotting as described above.

RESULTS

Localization of catenins in the adult rat epididymis

While the three isoforms of catenin were expressed in the adult rat epididymis, a variable degree of immunostaining was observed for each depending on the region of the epididymis in which they were expressed. With all three antibodies, a reaction was noted throughout the epididymis along the lateral plasma membranes of adjacent epithelial principal cells (Fig. 1A-C), suggesting their role as adhesion molecules. Furthermore, in the initial segment of the epididymis, these three proteins were also present at the lateral interface between adjacent principal, narrow and apical cells, while in the caput, corpus and cauda epididymidis, staining was observed between adjacent principal and clear cells (not shown). Qualitatively comparing the three antibodies, it was noted that the intensity of the reaction for both β-catenin and p120 was markedly enhanced overall as compared to that for α-catenin. Furthermore, in the case of β-catenin, the immunoreaction was most intense in the initial segment, with moderate staining in the other epididymal regions. In addition, while evenly distributed along the lateral plasma membranes in the caput, corpus and cauda epididymidis, it appeared to be most intense in the upper or apical part of the lateral plasma membrane in the initial segment of the epididymis (Fig.1 B). In the case of $p120^{ctn}$, the least intense reaction was observed in the initial segment with intense staining in all other epididymal regions, while the α-catenin antibody appeared most intense in the corpus region of the epididymis. Nevertheless, the fact that all three junctional proteins co-localized together in varying degrees suggests that they form

complex, interconnecting components of the adhering junctions between adjacent epithelial cells.

In the adult rat epididymis, ZO-1 was localized at the apical region of the epithelium in the reported area of the epididymal tight junctions (Fig 1D). ZO-1 was immunolocalized in the epididymis using cryosections since the antisera did not work in bouin's fixed sections. Clearly in the adult rat epididymis ZO-1 was not localized along the lateral plasma membrane of epithelial cells as in the case on the three catenins but its localization was restricted to the area of epididymal tight junctions.

Composition of epididymal adhering junctions

In order to corroborate the finding of each catenin in the different epididymal regions, Western blot analysis was performed on homogenized epididymides of adult rats (Fig 2). Western blot analysis for ZO-1 was also performed, as this protein has been shown in vitro to associate with adhering junctions during the assembly of tight junctions and be present in the adult epididymis. The results indicate that a single band of 95 kDa was obtained for β-catenin, with the most intense band being present in the corpus region. In comparison, a single protein band of 102 kDa was obtained for α- catenin, and that while noted in each epididymal region, the most conspicuous band was also present in the corpus epididymidis; a 208 kDa band was obtained for ZO-1. In the case of $p120^{ctn}$, several protein bands ranging from 115 to 125 kDa, which represent the multiple phosphorylated forms of $p120^{ctn}$, were obtained, with the bands showing similar intensities between the different epididymal regions.

Immunopreciptitation of β-catenin was performed to demonstrate whether or not all three catenins were associated with one another in the epididymis (Fig 3). Using the initial segment-caput region of the epididymis of adult rats, membrane enriched protein fractions were isolated and immunoprecipitated with the β-catenin antiserum. Western blots were subsequently done on electrophoretically separated immunoprecipitated proteins with α- catenin, and $p120^{ctn}$. To confirm that these proteins were part of the adhering junctions, E-cadherin was also measured in the immunoprecipitated proteins. Results from these experiments indicate that α-catenin and $p120^{ctn}$, as well as E-cadherin, all at their appropriate molecular weights, are all associated with β-catenin in the adult epididymis.

Regulation of catenins by androgens

Bilateral orchidectomy of adult rats sampled 14 days later indicated that the immunolocalization of α- and β-catenin was altered by orchidectomy. In the case of α- and β-catenin, the reaction along the lateral plasma membranes was markedly reduced as compared to control animals. In addition, an intense cytoplasmic reaction was observed in each epididymal region. Interestingly, the staining for $p120^{ctn}$ was not altered along the lateral plasma membranes and there was no conspicuous cytoplasmic reaction in any epididymal region. For rats that were given testosterone replacement at the time of surgery, the immunostaining for α- and β-catenin returned to that noted for control rats.

Modulation of catenin expression during postnatal development

Immunolocalization studies revealed that all three catenins were already expressed by postnatal day 7. At this age, localization was present along the lateral plasma membranes between the adjacent undifferentiated epithelial cells, and differences in immunostaining between each catenin were not apparent, nor were differences between the various epididymal regions for a given catenin. However, the intensity of the immunoreaction appeared to increase as a function age, and was similar to that of adults by postnatal day 49, when circulating androgen levels become elevated (Scheer and Robaire, 1980).

Association of β-Catenin and ZO-1 during the formation of the blood-epididymal barrier

It has been shown using in vitro cell cultures that ZO-1, a tight junctional cytoplasmic protein, may associate with adhering junctions during the assembly of tight junctions. To determine if ZO-1 and β-catenin (adhering junction) associate during the formation of the blood-epididymal barrier, immunoprecipitation of epididymal extracted proteins was performed with ZO-1 and β-catenin (Fig 6). The results demonstrate that ZO-1 is associated with β-catenin in the epididymis. This association appears to be more extensive in young rats (7- and 18-day old) than in adult rats during the formation of the blood-epididymal barrier, suggesting that ZO-1 and components of the adhering junction associate while epididymal tight junctions are assembled.

DISCUSSION

The formation of the blood-epididymal barrier is essential in creating a microenvironment necessary for spermatozoal maturation as well as for protecting the spermatozoa from the immune system, as sperm are antigenic. The formation of epididymal tight junctions is likely to involve both adhering junctions, which are necessary for cell adhesion and intercellular signalling, as well as tight junctions, which form the seal between adjacent epithelial principal cells. Therefore, the composition and regulation of the components of the adhering junction are essential for understanding the regulation of the blood-epididymal barrier.

All three catenins (α-, β-catenin and $p120^{ctn}$) were present in all regions of the epididymis and were localized along the basolateral membrane of all epithelial cells that line the lumen of the epididymis. This is consistent with previous observations by Cyr et al. (1992) which demonstrated the localization of E-cadherin between neighboring principal cells that line the lumen of the epididymis. Immunoprecipation data indicate that all three catenins, as well as E-cadherin, are part of the junctional complex responsible for the formation of adhering junctions in the epididymis. Previous studies have reported that in epithelial cells, catenins may play different roles either in linking cadherins to the cytoskeleton or in intracellular signalling pathways. The interaction of the cadherin-catenin complex with the actin-based cytoskeleton through α-catenin is necessary for cadherin-based cell adhesion activity. α-catenin associates with the COOH-terminal end of the cadherin cytoplasmic tail via β-catenin. Imamura et al (1999) have demonstrated that there are three functional domains of α-catenin required for strong

adhesion. These are a vinculin/α-actinin-binding domain, an adhesion-modulation domain and a ZO-1 binding site.

$p120^{ctn}$ contains an armadillo repeat domain protein which shares structural similarities to β-catenin and plakoglobin. The role of $p120^{ctn}$ in mediating juxtamembrane domain function is controversial. While studies have suggested that $p120^{ctn}$ is necessary for strong intercellular adhesion (Yap et al. 1998, Thoreson et al. 2000) others have suggested that $p120^{ctn}$ may inhibit intercellular adhesion (Aono et al. 1999, Ohkubo and Ozawa 1999). In any case, it is clear that $p120^{ctn}$ is a regulatory catenin that can directly modulate cadherin-cadherin interaction. Furthermore, the large number of phosphorylated isoforms of $p120^{ctn}$ suggests that this protein may be highly regulated (Aho et al., 2002). It has been reported that the level of serine phosphorylation of $p120^{ctn}$ can be reduce by the kinase inhibitor staurosporine and by modulating the activity of protein kinase C (Aono et al. 1999). $p120^{ctn}$ has unique binding partners and play a distinct role in the cadherin-catenin complex. It was found that $p120^{ctn}$ coprecipitated with another transcription factor, Kaiso which suggests that $p120^{ctn}$ may take part in a unique signalling cascade that can influence adhering junctions or other junctional complexes (Daniel and Reynolds, 1999).

β-catenin has also been shown to have dual functions. It is necessary for cadherin-cadherin interaction as part of the adhering junctions, but β-catenin is also an important member of the WNT signalling pathway, which is involved in the cell cycle. The presence of all three catenins in the epididymis suggests the possibility that catenin signalling pathways may play a role in epididymal function.

Previous studies have shown that E-cadherin mRNA levels are androgen-dependent in the epididymis (Cyr et al., 1992). In the present study it was noted that orchidectomy resulted in increased cytoplasmic staining for both α- and β-catenin. It has previously been reported that during dissociation of the adhering junctions, catenins are no longer localized along the plasma membrane but are spread throughout the cytoplasm. Results from the present study would support the notion that androgens are necessary for maintaining the integrity of adhering junctions in the epididymis, since both α-, β-catenin were localized along the plasma membrane of principal cells in orchidectomized rats which received testosterone implants. Recent studies have shown that β-catenin and E-cadherin associate shortly after E-cadherin synthesis and that the complex is transported to the basal-lateral membrane of cells (Ozawa and Kemler, 1992; Hinck et al., 1994; Chen et al., 1999). In fact it has been proposed that β-catenin acts as a chauffer to facilitate the transport of E-cadherin (Chen et al., 1999). Therefore, a decrease in E-cadherin would likely result in a decrease in β-catenin binding to E-cadherin and being targeted to the basal-lateral membrane, thus resulting in an increase in cytoplasmic localization of β-catenin.

Interestingly, the intensity or localization of $p120^{ctn}$ was not altered by orchidectomy or by orchidectomy plus testosterone maintenance. This suggest that $p120^{ctn}$ is regulated differently from α- and β-catenin in the epididymis. Furthermore, it suggests that $p120^{ctn}$ may bind to other proteins which are not affected by orchidectomy. Papkoff (1997) showed using transfected L-cells that there are different pools of catenins in the cell and that $p120^{ctn}$ is regulated differently from α- and β-catenin. This difference appears to be in part because $p120^{ctn}$ does not bind as extensively to E-cadherin as the

other two catenins. Whether or not this is the case in epididymal cells is not known, however this may explain why p120^{ctn} is regulated differently from α- and β-catenin.

The development of epididymal tight junctions which form the blood-epididymal barrier are regulated in a segment-specific manner beginning at 18 days of age in the initial segment of the rat epididymis and is completely formed by 21 days of age in the cauda epididymidis (Agarwal and Hoffer, 1989). Previous studies by Cyr et al. (1993) reported that E-cadherin mRNA levels increase significantly during the formation of the blood-epididymal barrier. It has been suggested that ZO-1 first associates with the adhering junctions during the formation of tight junctions and that this protein can then dissociate from catenins and become localized to the area of the tight junctions, where it binds to the transmembrane tight junctional proteins claudins and occludin. While these associations have been shown to occur *in vitro*, we wanted to know whether this occurred *in vivo*, and if this process occurred during the formation of tight junctions involved in the formation of the blood-epididymal barrier. The present results indicate that ZO-1 and β-catenin are strongly associated during the formation of the blood-epididymal barrier and that this association is decreased in adults after the barrier is complete. This suggests that ZO-1 associates to β-catenin, during the formation of the epididymal tight junctions. This indicates that adhering junctions, or their components therein, are likely involved in the formation of epididymal tight junctions and that the regulation of the formation of the blood-epididymal barrier may encompass the regulation of adhering junctions. Previous studies by Rajaskaran et al (1996) reported that in MDCK cells in which tight junctional assembly was initiated by a calcium switch, ZO-1 bound to catenins during the formation of tight junctions. Furthermore, studies by Decanes and Cassio (2001) suggest that ZO-1

associates with catenins after the adherens junction is formed thereby emphasizing the importance of adherens junctions in the assemble of tight junctions. Further studies on catenin and ZO-1-signalling pathways and the formation of epididymal tight junctions may shed new information of the factors and mechanisms responsible for the formation of epididymal tight junctions.

These studies demonstrate that catenins (α-, β- and $p120^{ctn}$) are present throughout the epididymis and that these are part of epididymal adhering junctions. Furthermore, in adult rats, adhering junctions appear to be regulated, at least in part, by androgens, although of presence of adhering junctions in the prepubertal rat epididymis indicates that other factors also regulate the formation of adhering junctions. Finally, β-catenin and ZO-1 are strongly associated during the formation of the blood-epididymal barrier, indicating that ZO-1 associates with adhering junctions during the formation of the barrier.

ACKNOWLEDGEMENTS

M. Gregory is thanked for her helpful suggestions. This study was supported in part by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (DGC) and the Canadian Institutes for Health Research (LH).

REFERENCES

Aho S, Levansuo L, Montonen O, Kari C, Rodeck U, Uitto J. (2002) Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells. J Cell Sci. Apr 1;115(Pt 7):1391-402.

Agarwal, A., and Hoffer, A.P. (1989) Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. J. Androl., 10:425-431.

Ando-Akatsuka, Y., Yonemura, S., Itoh, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (1999). Differential behavior of E-cadherin and occludin in their colocalization with ZO-1 during the establishment of epithelial cell polarity. J. Cell Physiol. 179:115-125

Aono S, Nakagawa S, Reynolds AB, Takeichi M.(1999) p120(ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. J Cell Biol. May 3;145(3):551-62.

Berx G, Van Roy F. (2001). The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. Breast Cancer Res. 2001;3(5):289-93.

Brawer, JR.., Schipper, H., Robaire, B. (1983) Effects of long term androgen and estradiol exposure on the hypothalamus. Endocrinology 112:194-199

Chen YT, Stewart DB, Nelson WJ.(1999). Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. J Cell Biol. Feb 22;144(4):687-99.

Cyr, D.G., Finnson K.W., Dufresne J. , and Gregory M. (2002). Cellular interactions and the blood-epididymal barrier. *In*: B. Robaire and B. Hinton, eds., "The Epididymis : from Molecules to Clinical Practice". Plenum Press. pp103-118.

Cyr, D.G., and Robaire, B. (1991). Developmental regulation of epithelial and placental-cadherin mRNA in the rat epididymis. Ann. NY. Acad. Sci. 637, 399-408.

Cyr, D.G., Blaschuck, O.W., and Robaire, B. (1992). Identification and developmental regulation of cadherin messenger ribonucleic acids in the rat testis. Endocrinology 131, 139-145.

Cyr, D.G., Hermo, L., Blaschuck, O.W., and Robaire, B. (1992). Distribution and regulation of epithelial-cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. Endocrinology 130, 353-363.

Cyr, D.G, Hermo, L., and Robaire, B. (1993). Developmental regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. Endocrinology 132: 1115-1124.

Cyr , DG., Robaire , B., Hermo, L. (1995). Structure and turnover of the junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. Microsc Res Tech; 30 : 54-66.

Daniel JM, Reynolds AB. (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. Mol Cell Biol. May;19(5):3614-23.

Decaens C, Cassio D.(2001). Spatiotemporal expression of catenins, ZO-1, and occludin during early polarization of hepatic WIF-B9 cells. Am J Physiol Cell Physiol. Mar;280(3):C527-39.

Denker BM, Nigam SK.(1998). Molecular structure and assembly of the tight junction. Am J Physiol. Jan;274(1 Pt 2):F1-9.

Fukata M, Kaibuchi K.(2001). Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. Nat Rev Mol Cell Biol. Dec;2 (12):887-97.

Furuse M, Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, Sa., Tsukita, Sh. (1994) Direct association of occludin with Zo-1 and it possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. J Cell Biol 127:1617-1626

Gumbiner BM (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. J Cell Biol. Feb 7;148(3):399-404.

Gumbiner, B., Stevenson, B.R., and Grimaldi, A. (1988). The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. J. Cell Biol. 107:1575-1587

Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. (2002) Genes Chromosomes Cancer. Jul;34(3):255-68.

Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. J Cell Biol. Jun;125(6):1327-40.

Imamura Y, Itoh M, Maeno Y, Tsukita S, Nagafuchi A. (1999). Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. J Cell Biol. Mar2;144(6):1311-22.

Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., and Tsukita, S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. J. Cell Biol. 138:181-192

Itoh, M., Morita, K., and Tsukita, S. (1999b). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. J. Biol. Chem. 274:5981-5986

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. (1999a). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. J Cell Biol. Dec 13;147(6):1351-63.

Kintner C.(1992) Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. Cell; 69: 225-236

Ohkubo T, Ozawa M. (1999). p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. J Biol Chem. Jul 23;274(30):21409-15.

Oko R, Clermont Y (1989). Light microscopic immunocytochemical study of fibrous sheath and outer dense fiber formation in the rat spermatid.
Anat Rec. Sep;225(1):46-55

Oko R, Hermo L, Chan PT, Fazel A, Bergeron JJ.(1993) The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. J Cell Biol. 123(4):809-21

Olson GE, NagDas SK, and Winfrey VP. (2002). Structural differentiation of the spermatozoa during post-testicular maturation. *In*: B. Robaire and B. Hinton, eds., "The Epididymis : from Molecules to Clinical Practice". Plenum Press.

Ozawa M, Kemler R.(1992). Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. J Cell Biol. Feb;116(4):989-96.

Papkoff J. (1997). Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src. J Biol Chem. Feb 14;272(7):4536-43.

Peifer M, Berg S, Reynolds AB.(1994) A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. Cell. Mar 11;76(5):789-91

Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T, Rodriguez-Boulan E.(1996) Catenins and ZO-1 forms a complex during early stages in the assembly of tight junctions. J Cell Biol132: 451-463

Robaire, B., and Hermo, L.,(1988) Efferents ducts, epididymis and vas deferent : Structure , functions and their regulation. In : The physiology of reproduction , vol.1. E.Knobil and J.Neill,eds. Raven press, New York, pp.999-1080

Steinberg MS, McNutt PM (1999). Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. Curr Opin Cell Biol. Oct;11(5):554-60.

Stratton, I.G., Ewing, L.L., Desjardins, C. (1973) Efficacy of testosterone-filled polydimethylsiloxane implants in maintaining plasma testosterone in rabbits. J Reprod Fertil 35: 235-244

Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hummingbird DK, Reynolds AB. (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. J Cell Biol. Jan 10;148(1):189-202.

West MR, Ferguson DJ, Hart VJ, Sanjar S, Man Y. (2002)Maintenance of the epithelial barrier in a bronchial epithelial cell line is dependent on functional E-cadherin local to the tight junctions. Cell Commun Adhes. Jan-Feb;9(1):29-44

Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM. (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. J Cell Biol. May 4;141(3):779-89.

FIGURE LEDGENS

Figure 1. Immunocytochemical localization of α- (A),β-catenin (B), p120^{ctn} (C) and ZO-1(D) in adult rat epididymis. In the caput epididymidis (A) a strong α-catenin immunoreaction was present along the entire length of the lateral plasma membranes between adjacent principal cells (arrows). A similar pattern of immunostaining was observed in the other regions of the adult epididymis. β-catenin (B) was also localized along the lateral plasma membrane of principal cell in each of the four epididymal segments. However, a more intense react was observed in the apical region of the cells (arrows). P120^{ctn} (C) was localized along the entire lateral plasma membrane of principal cells (arrows) in all segments of the epididymis, only the caput epididymidis is shown. ZO-1 (D) was localised in the apical region witch represent the region of tight junctions. P=principal cells, B=basal cells, C=clear cells, IT=intertubular space, Lu=lumen, n=nuclei; S=spermatozoa. (640X)

Figure 2. Testicular regulation of catenins in adult rat epididymis. Rats were orchidectomized and sampled 14 days after surgery. Immunostaining for α- (A), and β-catenin (B) was altered in orchidectomized rats. In these animals α- and β-catenin immunostaining was less prevalent along the lateral plasma membrane of adjacent principal cells and a more intense cytoplasmic react was observed in each of the four epididymal segments (only caput epididymidis is shown). Unlike α- and β-catenin, p120^{ctn} (C) was unaltered by orchidectomy in any of the four epididymal segments (only caput epididymidis is shown). In rats who were orchidectomized and who received testosterone implants, the immunostaining for each catenin was identical to that observed in intact control rats. α-catenin immunostaining in the caput epididymidis of an orchidectomized rat given testosterone is shown (D). P=principal cells, B=basal cells, IT= intertubular space, Lu=lumen. (640X)

Figure 3. Western blot analysis of of α- ,β-catenin , p120^{ctn} and ZO-1 in the initial segment-caput (ct), corpus (cs) and cauda (ca) epididymidis of adult rat. A 50 μg aliquot of membrane enriched epididymal proteins were isolated by centrifugation and separated by PAGE. Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane and revealed using primary antisera for each catenin as well as ZO-1. Results indicate that each antibody was specific as a specific band of the expected molecular weight was observed.

Figure 4. Immunoprecipitation of β-catenin and ZO-1 from protein samples isolated of enriched membrane fractions from the initial-segment-caput region of 7-, 18- and 91-day old rats. The β-catenin immunoprecipitates were screened with for ZO-1 while ZO-1 immunoprecipitates were screened for β-catenin. Results indicate that ZO-1 and β-catenin are strongly associated during the formation of the blood-epididymal barrier as demonstrated by the intense immunoblot reactions for both ZO-1 and β-catenin in the β-catenin and ZO-1 respective immunprecipitates. The association between ZO-1 and β-catenin appears to decrease in older animals as indicated by the fainter reactive bands from each protein in 91-day old rats.

Figure 5. Immunocytochemical localization of catenins in the epididymis of 7 day old rats. Immunolocalocalization of α- (A), β-catenin (B) and $p120^{ctn}$ (C) in epididymides of 7 day old rat indicate that all three catenins were already localized along the lateral plasma membrane of adjacent principal cells. At this age the intensity of the reaction was similar throughout the epididymis for each catenin (only caput is shown). While the intensity of the reaction increased as a function of age, the immunlocalization of each catenin was not altered as a function of postnatal development. β-catenin immunostaining in the caput epididymdis of 49 day old rat is shown (D). P=principal cells, B=basal cells, IT=intertubular space, Lu=lumen. (640X)

Figure 6. Immunoprecipitation of β-catenin in the initial segment-caput epididymidis of adult rat. β-catenin was immunoprecipitated as indicated in the Materials and Methods and immunoprecipitated proteins were separated by PAGE. Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane. Blots were screened for E-cadherin, α-, β-catenin, and $p120^{ctn}$ using specific antisera for each of these proteins. The results indicate that each of these proteins which comprise the adhering junctions were co-precipitated with β-catenin.

FIGURE 1

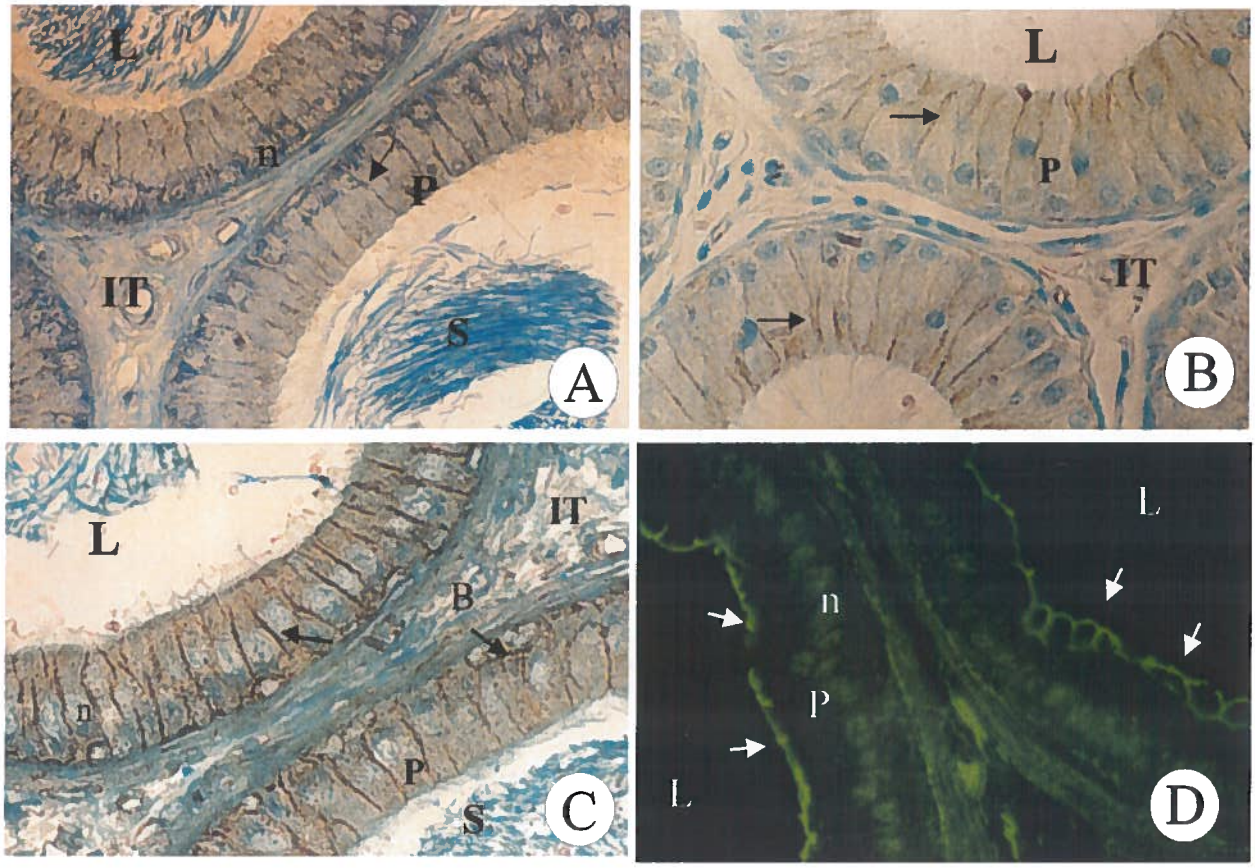


FIGURE 2

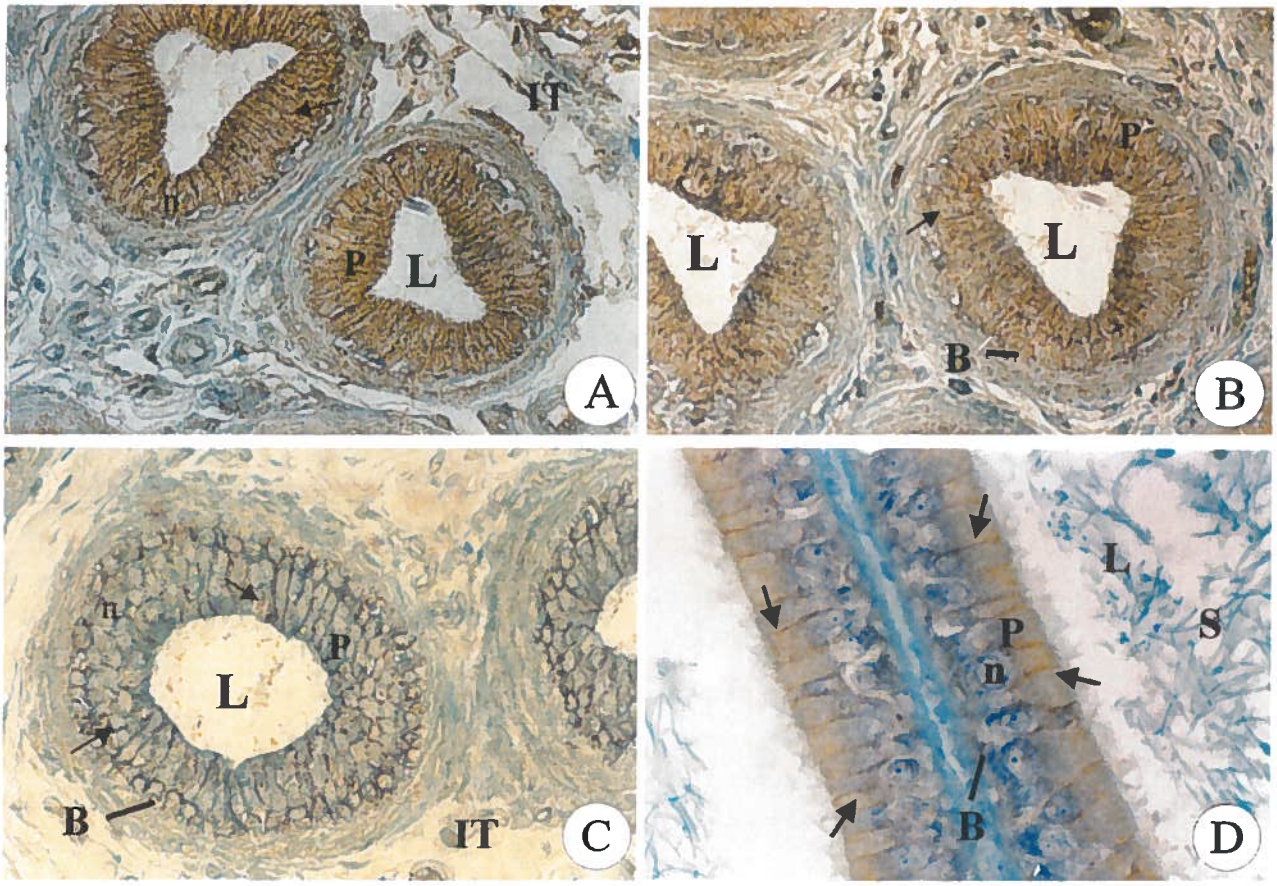


FIGURE 3

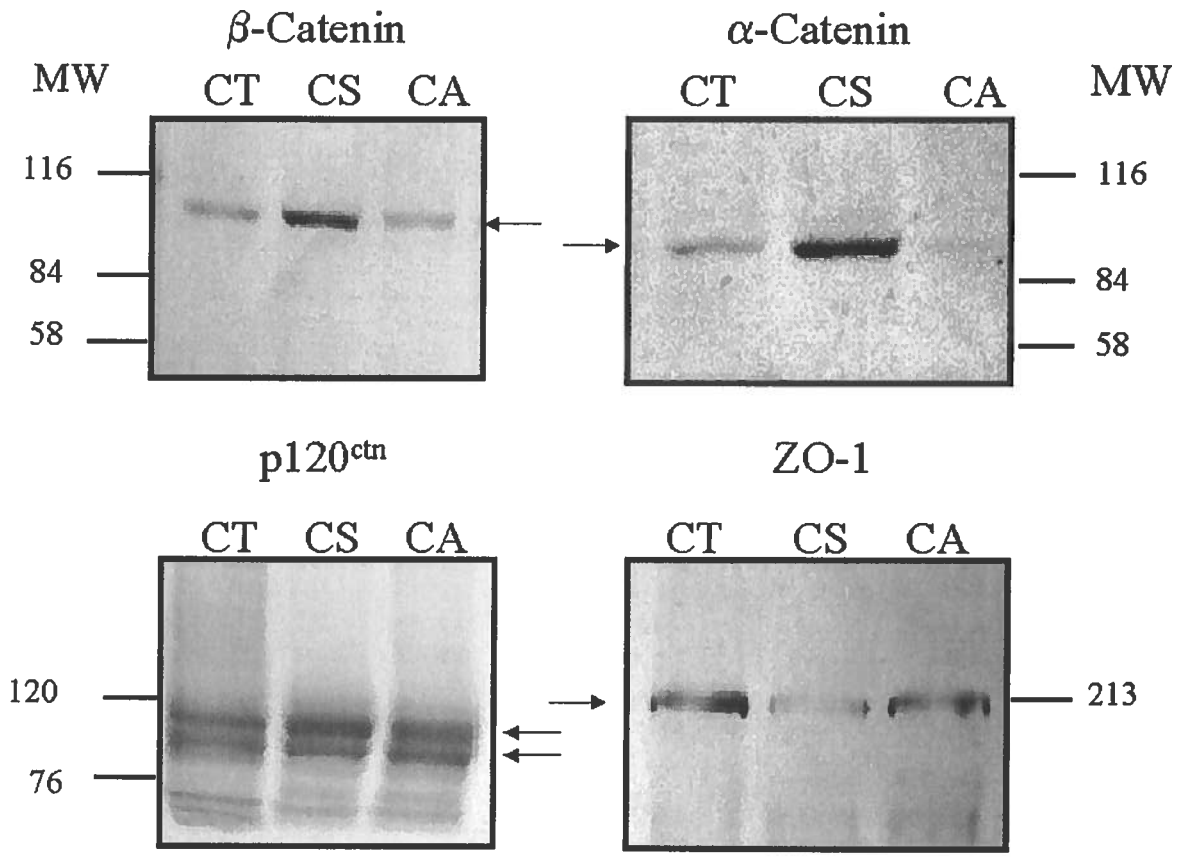

β-Catenin
MW
CT CS CA
116
84
58
α-Catenin
CT CS CA
MW
116
84
58
p120ctn
CT CS CA
120
76
ZO-1
CT CS CA
213

FIGURE 4

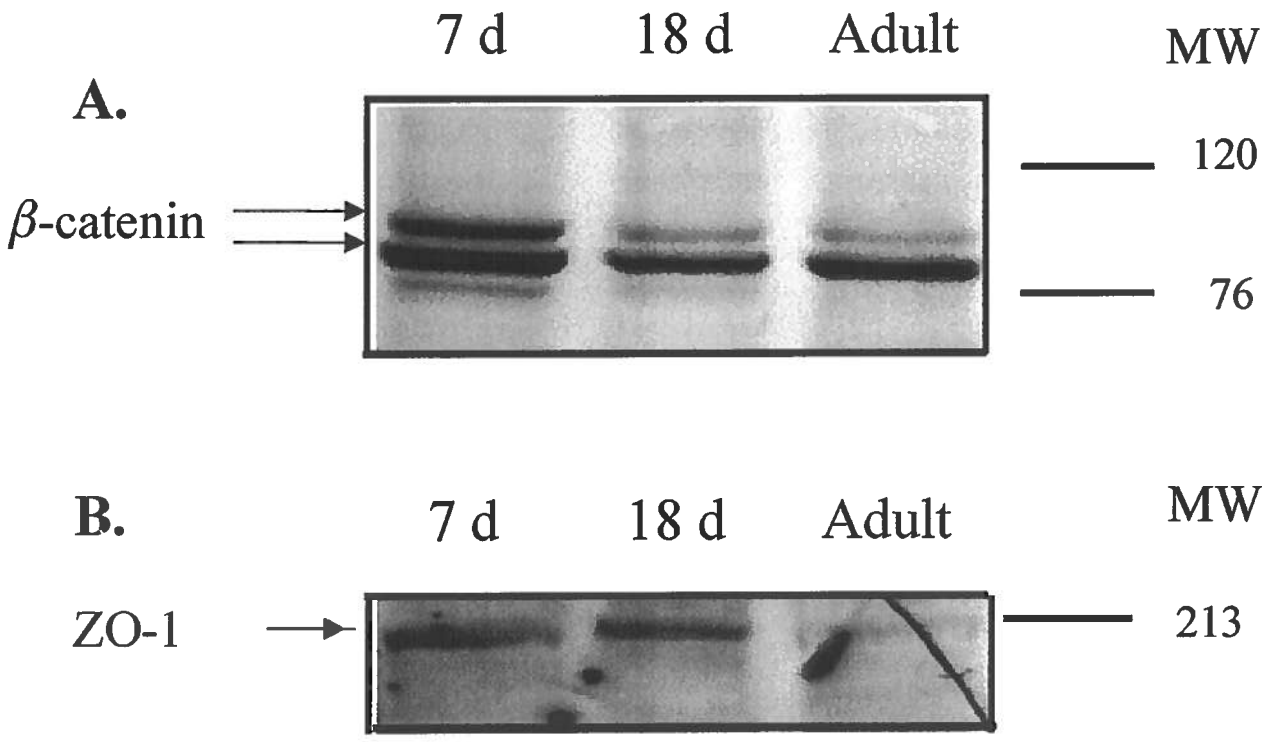


FIGURE 5

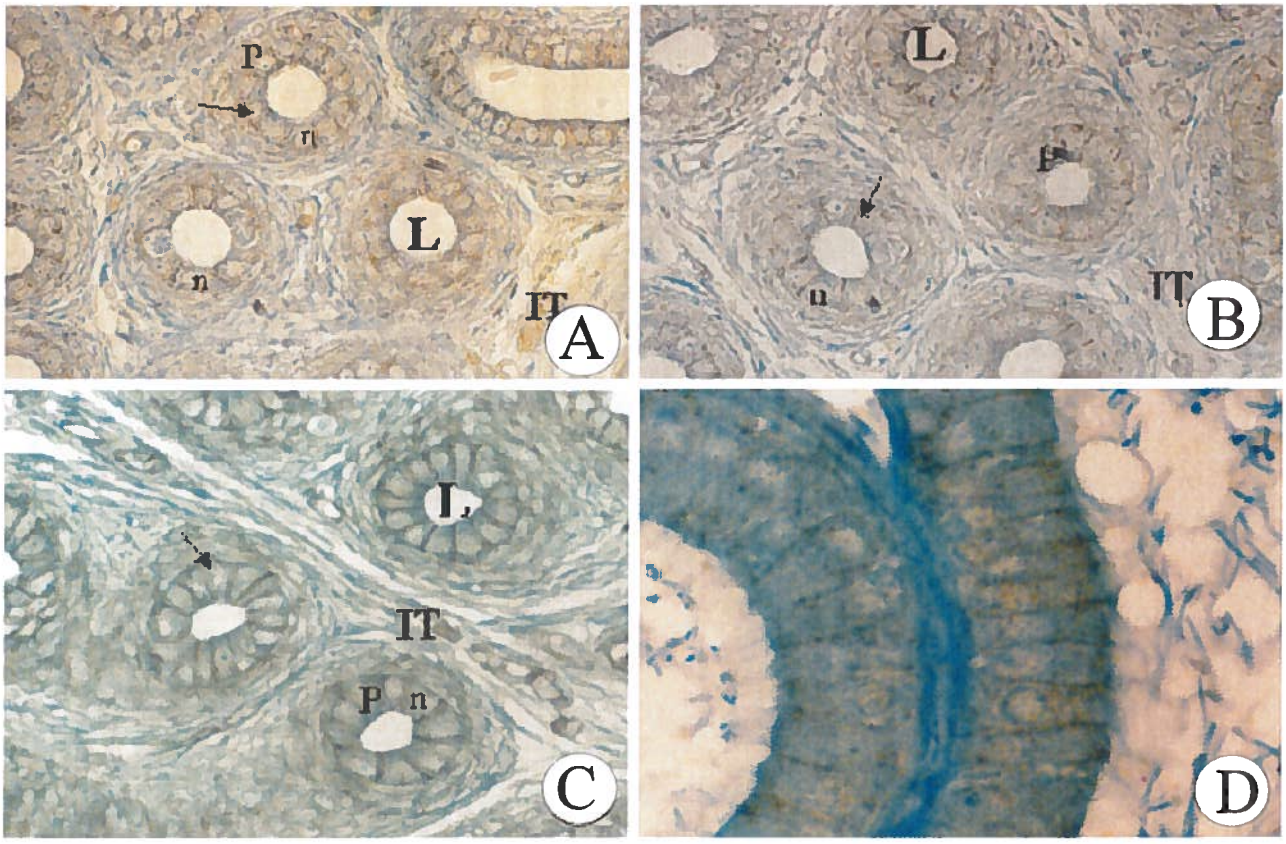
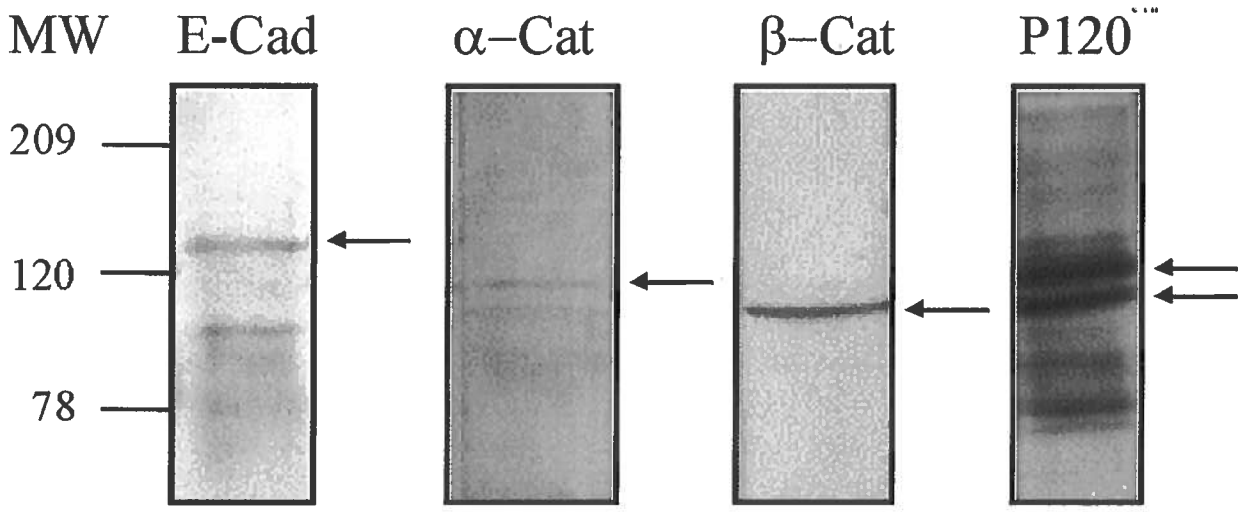


FIGURE 6



CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La barrière hémato-épididymaire est essentielle afin que les spermatozoïdes puissent acquérir leur pouvoir fécondant et leur motilité. Elle est tout aussi essentielle pour la protection des spermatozoïdes contre les attaques du système immunitaire. Elle permet ainsi la création du microenvironnement retrouvé dans la lumière de l'épididyme et assure l'isolement des spermatozoïdes du fluide interstitiel. Les facteurs responsables de la régulation de cette barrière sont cependant encore inconnus. Les résultats de cette recherche ont permis d'approfondir les connaissances sur la physiologie de la barrière et plus particulièrement, sur l'identification et la régulation des protéines qui font partie des jonctions d'adhérence dans l'épididyme.

La formation de la barrière hémato-épididymaire nécessite l'implication des protéines des jonctions d'adhérence, d'abord pour l'adhésion cellulaire ainsi que pour les cascades de signalisation entre les jonctions d'adhérence et les jonctions serrées. La connaissance de la composition et la régulation des composantes des jonctions d'adhérence est donc essentielle afin de comprendre la formation de la barrière hémato-épididymaire. Plusieurs expériences ont démontré l'importance de l'établissement et du maintien des jonctions d'adhérence afin d'obtenir des jonctions serrées efficaces. Les hypothèses de recherche de cette étude étaient que β-, α-caténine ainsi que $p120^{ctn}$ font partis des jonctions d'adhérence dans l'épididyme de rats adultes et que ces protéines sont régulées par les androgènes. De plus, une autre hypothèse a été formulée à l'effet que β-caténine joue un rôle important dans la formation de la barrière hémato-épididymaire en s'associant avec ZO-1.

Le premier objectif de cette étude était donc de démontrer la localisation des protéines cytoplasmiques de la jonction d'adhérence chez le rat adulte. Les résultats obtenus démontrent très bien que les caténines, α- et β- ainsi que $p120^{ctn}$, sont bien localisées le long des membranes plasmiques dans tous les différents types de cellules ainsi que dans les quatre segments de l'épididyme. De plus, la localisation de E-cadhérine a aussi été démontrée le long des membranes entre deux cellules principales voisines (Cyr et al. 1992) suggérant que le complexe E-cadhérine/caténines (β- α-caténine et $p120^{ctn}$) fait

parti des jonctions d'adhérence dans l'épididyme. Par immunoprécipitation de β-caténine, l'association avec E-cadhérine et les autres caténines a été démontré dans la présente étude. Il est donc possible de conclure que le complexe E-cadhérine/caténines est présent dans les différents segments de l'épididyme et fait parti des jonctions d'adhérence. De plus, Cyr et al., (1995) ont démontré qu'il y avait bien un complexe jonctionnel dans l'épididyme qui se situe le long des membranes plasmiques des cellules principales et qui inclut des jonctions d'adhérence et des jonctions serrées.

Les trois caténines (β-, α-caténine et $p120^{ctn}$) ont démontré une expression dans plusieurs types cellulaires y compris dans les cellules basales et les cellules claires et la réaction se situe le long des membranes dans tous ces types cellulaires. Ces résultats s'expliquent en sachant que la jonction d'adhérence n'est pas seulement associée aux jonctions serrées et qu'elle est aussi responsable de l'intégrité du tissu en joignant le cytosquelette de deux cellules voisines s'assurant ainsi de l'adhésion cellulaire. Il est donc possible d'observer les protéines de la jonction d'adhérence dans les cellules où l'on ne retrouve pas de jonctions serrées comme par exemple, entre les cellules basales et principales. Ainsi entre ces cellules, il y a sûrement d'autres cadhérines, en plus de E-cadhérine, qui forment les jonctions d'adhérence dans l'épididyme et qui se retrouvent le long des membranes avec les caténines α-, β- et $p120^{ctn}$. En effet, dans le testicule, plus de 20 types de cadhérines ont été identifiés (Johnson, 2000) jusqu'à aujourd'hui, il serait donc très probable que le même scénario se produise dans l'épididyme.

Il a été démontré que la présence de α-caténine et β-caténine est nécessaire afin d'assurer la force de l'adhésion (Tsukita et al., 1992; Imamura et al., 1999) et $p120^{ctn}$ module l'intensité de l'adhésion (Aono et al., 1999; Thoreson et al., 2000). Il est maintenant clair que le complexe E-cadérine/caténines (β-, α-caténine et $p120^{ctn}$) fait partie de la jonction d'adhérence dans l'épididyme. Ainsi les protéines cytoplasmiques de la jonction d'adhérence sont bien présentes dans l'épididyme et se retrouvent dans plusieurs types cellulaires.

Le deuxième objectif était de vérifier si, comme les ARNm de E-cadhérines, les caténines sont régulées par les androgènes. Les caténines β- et α- changent de localisation suite à 14 jours d'orchidectomie et l'intensité de la réaction au niveau de la membrane est aussi diminuée. La localisation devient cytoplasmique ce qui suggère

qu'il y a peut-être une dégradation du complexe au niveau de la membrane expliquant la diminution de l'intensité. Il est aussi possible que le complexe E-cadhérine/β-caténine soit affecté par la baisse des niveaux de E-cadhérine. En effet, E-cadhérine s'associe avec β-caténine à sa sortie du réticulum endoplasmique et β-caténine est responsable de la localisation de E-cadhérine au niveau de la membrane (Chen et al. 1999). Ainsi, une baisse des niveaux de E-cadhérine résulterait en une diminution des complexes E-cadhérine/ β-caténine expliquant l'augmentation de β-caténine libre dans le cytoplasme. Il est aussi possible que l'accessibilité des épitopes reconnus par l'anticorps soit différente.

Par contre, l'expression de $p120^{ctn}$ ne semble pas affectée par la chirurgie (orchidectomie) et par conséquent la localisation de cette protéine demeure le long de la membrane cytoplasmique. Cette protéine est fortement phosphorylée, plusieurs isoformes sont présents suggérant que cette protéine peut être régulée de plusieurs façons (Aho et al., 2002). De plus, Papkoff, (1997) a démontré qu'il y a plusieurs "pools" de caténines dans une même cellule et que $p120^{ctn}$ est régulée différemment de β- et α-caténine. Cette différence est peut-être due, en partie, au fait que $p120^{ctn}$ ne se lie pas aussi intensément que α- et β-caténine à E-cadhérine. De plus, $p120^{ctn}$ se lie à des partenaires qui lui sont distincts et qui lui permettent peut-être d'influencer le complexe par une cascade de signalisation qui lui est propre (Daniel et Reynolds, 1999). Ces résultats suggèrent que $p120^{ctn}$ n'est pas régulée de la même façon que β- et α-caténine dans l'épididyme et par conséquent leur rôle peut être différent.

Afin de vérifier la localisation des caténines lors du développement postnatal, des animaux de 7-14-49 et 96 jours ont été utilisés. Dès le 7^{ieme} jour, toutes les caténines étudiées sont déjà présentes et sont localisées le long des membranes plasmiques dans toutes les cellules non différenciées. Friend et Gilula, (1972) ont démontré que la formation des jonctions serrées commence chez l'embryon, durant la différenciation du canal mésonéphrétique et se poursuit jusqu'à l'âge de 21 jours postnatal. Ceci peut probablement expliquer le marquage observé chez l'animal de 7 jours puisque la formation des jonctions d'adhérence doit être présente pour que les jonctions serrées puissent prendre place. De plus, par des analyses northern-blot, l'ARNm de E-cadhérine a aussi été retrouvé dans l'animal de 7 jours et les concentrations augmentent significativement durant la formation de la barrière hémato-épididymaire (Cyr et al.,

1993). Ces résultats suggèrent aussi, qu'avant même la sécrétion des androgènes, les protéines de la jonction d'adhérence sont présentes dans tous les segments de l'épididyme.

Le dernier objectif de cette étude était de vérifier s'il y avait une interaction entre ZO-1, et β-caténine et si cette interaction variait pendant la formation de la barrière hémato-épididymaire. Agarwal et Hoffer, (1989) ont démontré que la barrière hémato-épididymaire devenait imperméable à différents moments en fonction du segment. Dans la tête de l'épididyme, la barrière est complétée au jour 18 postnatal, chez le rat. Les épididymes ont été retirés des animaux âgés de 7-14 et 91 jours soit, avant, durant et après la formation de la barrière. Les résultats obtenus démontrent bien que l'interaction entre β-caténine et ZO-1 varie en fonction du développement de la barrière devenant moins importante chez l'adulte. Une hypothèse peut être faite suggérant que β-caténine est nécessaire afin de permettre la localisation de ZO-1 au niveau des jonctions serrées. Ainsi, au début de la formation de la barrière, l'interaction entre ZO-1 et β-caténine est plus importante car il y a une plus grande quantité de protéines en complexe se rendant aux jonctions serrées. La diminution de l'interaction représente une activité ralentie au niveau de la barrière puisque cette dernière est complétée et l'interaction observée entre ces deux protéines représentant probablement le rythme de renouvellement des jonctions serrées.

Plusieurs études ont démontré l'importance de l'interaction entre ZO-1 et β-caténine lors de la formation des jonctions serrées et que cette interaction est perdue lorsque les jonctions serrées sont formées (Rajasekaran al.,1996). Dacanes et Cassio, (2001) suggèrent qu'il y a une interaction entre ZO-1 et les caténines après que la jonction d'adhérence soit formée soulignant l'importance de la jonction d'adhérence sur l'assemblage des jonctions serrées.

Les résultats de cette recherche démontrent que les protéines α-, β-caténine ainsi que $p120^{ctn}$ font parti les jonctions d'adhérence dans l'épididyme et ce, dans tous les segments de l'épididyme et qu'elles sont responsables de l'adhésion cellulaire entre les divers types de cellules. Cependant, contrairement à E-cadhérine, elles ne sont pas toutes régulées par les androgènes. En effet, β- et α-caténines changent de localisation suite à l'orchidectomie des animaux tandis que celle de $p120^{ctn}$ ne semble pas être

affectée par la chirurgie. Ainsi, il est possible de conclure que dans l'épididyme, les jonctions d'adhérence sont formées par les caténines β-, α- et $p120^{ctn}$, et qu'il y a possiblement d'autre cadhérines impliquées dans l'adhésion cellulaire.

De plus, l'interaction variable en fonction du temps entre β-caténine et ZO-1 durant la formation de la barrière hémato-épididymaire suggère que β-caténine puisse influencer la formation de la barrière. Ces premiers indices confirment l'implication des protéines des jonctions d'adhérence dans la formation des jonctions serrées.

Cette étude a permis de démontrer la présence et la régulation des composantes cytoplasmiques formant les jonctions d'adhérence dans l'épididyme. Puisque cette dernière est importante pour le bon fonctionnement de la barrière hémato-épididymaire, ces résultats apportent des informations essentielles à la bonne compréhension de la physiologie de cette barrière. Ils apportent aussi des indices convaincants sur le rôle des protéines des jonctions d'adhérence lors de la formation de la barrière. Plusieurs informations sont encore nécessaires afin de confirmer la façon dont la barrière est régulée et plusieurs mécanismes sont probablement en cause. Mais les informations qu'ont procurées cette recherche ont permis une bonne compréhension de la jonction d'adhérence dans l'épididyme et ouvrent la porte à une multitude de possibilités de recherche comme par exemple, démontrer si ZO-1 est localisé au niveau des jonctions d'adhérence chez le jeune animal et démontrer s'il existe une interaction entre ZO-1 et les autres caténines. Il serait aussi intéressant de savoir si ZO-1 est régulé par les androgènes dans ce tissu.

BIBLIOGRAPHIE

ABERLE, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, R. Kemler. 1997. «beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway». The Embo Journal,vol. 16, p. 3797-3804

ADAMALIi, H.I. et L. Hermo. 1996 « Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. »Journal of Andrology, vol. 3, p. 208

AHO, S., L. Levansuo, O. Montonen, C. Kari, U. Rodeck et J. Uitto. 2002. « Specific sequence in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells. » Journal of Cell Science, vol. 115, p. 1391-1402

ALBERTS, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. 1994. Biologie Moléculaire de La Cellule, 3iem édition, Paris : Medecine-sciences, Flammarion, p.950-971

AGARWAL, A., et A.P. Hoffer. 1989. «Ultrastructural studies on the development of the blood-epididimis barrier in immature rats». Journal of Andrology, vol. 10, p. 425-431

AMANN, RP. SS. Howards 1980 « Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. » The Journal of Urology, vol.124, p. 211-215

AMANN, RP. 1981 « A critical review for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. » Journal of Andrology, vol. 2, p. 37-58

ANASTASIADIS, P.Z., et A.B. Reynolds. 2000. « The p120 catenin family : complex roles in adhesion, signaling and cancer ». Journal of Cell Science, vol. 113, p. 1319-1334.

ANDERSON, J.M. 1996. «Cell signaling : MAGUK magic». Current Biology, vol. 6, p. 382-384

ANDO-AKATSUKA, Y., M. Saitou, T. Hirase, M. Kishi, A. Sakakibara, M. Itoh, S. Yonemura,M. Furuse, Sh. Tsukita. 1996. «Interspecies diversity of occludin sequence : cDNA cloning of human, mouse dog, and rat-kangaroo homologues». Journal of Cell Biology, vol. 133, p. 43-47

AONO, S., S.Nakagawa, A.B. Reynold, M. Takeichi.1999. « P120 (ctn) acts as an inibitory regulator of cadherin function in colon carcimona cells. »Journal of Cell Biology, vol. 145, p. 551-562

ATANASSOVA, N., C. McKinnell, K. Williams, KJ. Turner, JS. Fisher, PT. Sauders,MR. Millar et RM. Sharpe. 2001. « Age-, cell- and region-specific immunoexpression of estrogen receptor alpha (but not receptor beta) during postnatal development of the epididymis and vas deferens of the rat and distribution of this pattern by neonatal treament with diethylstilbestrol. » Endocrinology, vol. 142,p. 874-886

BACK, D.J. 1975. « The presence of metabolites of 3H-testosterone in the lumen of the cauda epididymis of the rat. » Steroids, vol. 25, p. 413-420

BADRAN, H. H. et L. Hermo. 2002. « Expression and regulation of aquaporins 1,8 and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. » Journal of Andrology, vol. 23, p. 358-373

BAGNIS, C., M. Marsolais, D. Biemesderfer, R. Laprade, S.Breton. 2001. « Na^+ /H^+-exchange activity and immunolocalization of NHE3 in rat epididymis. » American Journal Physiology, Renal Physiology, vol. 280, p. F426-F436

BALDA, MS., K. Matter. 2000. « The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. »The Embo Journal, vol.19, p. 2024-2033

BALDA, MS., K. Matter. 2000. « Transmembrane proteins of tight junctions. » Seminar in Cell and Developmental Biology, vol. 11, p. 281-289

BALDA, MS., C. Flores-Maldonado, M. Cereijido, K. Matter. 2000a. « Multiple domains of occludin participate in regulation of paracelllular permeability. » Journal of Cell Biochemistry, vol.78, p. 85-96

BALDA, M. S., JA. Wintney, C. Flores, S. Gonzalez, M. Cereijido, et K. Matter. 1996a. « Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. » Journal of Cell Biology, vol. 134, p. 1031-1049

BALDA, M.S., L. Gonzalez-Mariscal, K. Matter, M. Cereijido et J.M. Anderson. 1993. «Assembly of the tight junction : the rôle of diacylglycerol». Journal of Cell Biology, vol. 123, p. 293-302

BALDA, M. S., L. Gonzalez-Mariscal, M. Mascias-Silva, M.E.Torres-Marquez, J.A.Garcia Sainz et M. Cereijido. 1991 « Assembly and sealing of tight junctions : possible participation of g-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. » The Journal of Membrane Biology, vol.122, p. 193-202

BAMFORTH, SD., U. Kniesel, H. Wolburg, B. Engelhardt, W. Risau. 1999. « A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. » Journal of Cell Science, vol.112, p. 1879-1888

BAZZONI, G., et al. 2000. « Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. » Journal of Biologycal Chemistry, vol. 275, p. 20520-20526

BEATCH, M., LA. Jesaitis, WJ. Gallin, DA, Goodenough et BR. Stevenson. « The tight junction protein ZO-2 contains three PDZ domain(PSD-95/Discs-Large /ZO-1)domains and a alternately spliced region. » Journal of Biologycal Chemistry, vol. 271, p. 25723-25726

BEDFORD, JM., 1979. « Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis.» In : fawcett DW, Bedford JM (éd.). The spermatozoa. Baltimore : Urban & Schwarzenberg, 1979, p.7-21

BEHRENS J., W. Birchmeier, SL. Goodman et BA. Imhof. 1985. « Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. » The Journal of Cell Biology. vol. 101, p. 1307-15

BELMONTE, S. A., P. S. Romano et M. A. Sosa. 2002. «Mannose-6 phosphate receptors as a molecular indicator of maturation of epididymal sperm.» Archives of Andrology, vol. 48, p. 53-63

BENOIT, J. 1926. « Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères. » Arch. Anat Histol Embryol vol. 5, p.175-412

BEN-ZE'EV, A., B. Geiger.1998. «Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer.» Current Opinion in Cell Biology, vol. 10, p. 629-639

BERX, G., F. Van Roy. 2001. « The E-cadherin/catenin complex : an important gatekeeper in breast cancer tumorigenisis and malignant progression. » Breast cancer Research, vol. 3, p. 289-293

BHANOT, P., M. Brink, CH. Samos, JC. Hsieh, Y. Wang, JP. Macke, D. Andrew, J. Nathans, R. Nusse. 1996. «A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor». Nature, vol. 382, p. 225-230

BOUE, F., R. Sullivan.1996 « Cases of human infertility associated with the absence of P34H an epididymal sperm antigen. » Biology of Reproduction, vol. 54, p.1018-1024

BOUE, F., J. Blais R. Sullivan. 1996. « Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. » Biology of Reproduction, vol. 54, p.1009-1017

BRAGA, V.M., L.M. Macheski, A. Hall, et N.A. Hotchin. 1997. « The small GTP-ases Rho and Rac are required establishment of cadherin-dependant cell-cell contacts. » Journal of Cell Biology, vol. 137, p. 1421-1431

BRADLEY, R.S., P. Cowin et A.M.C.Brown. 1993. « Expression of *Wnt*-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion. » Journal of Cell Biology. Vol. 123, p. 1857-1865.

BRIEHER, WM et BM. Gumbiner. 1994. « Regulation of C-cadherin function during activin induced morphogenesis of Xenopus animal caps. » Journal of Cell Biology, vol. 126, p. 519-527

BRIEHER, W.M., A .S. Yap, et B.M. Gumbiner. 1996. « Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-Cadherin. » Journal of Cell Biology vol. 135, p. 487-496

BROOKS, DE. 1983. « Epididymal functions and their hormonal regulation. » Australian Journal of Biological Sciences, vol. 36, p. 205-221

BROWN, D., T. Katsura et CE. Gustafson. 1998. « Cellular mechanisms of aquaporin trafficking » American Journal Physiology, Renal Physiology, vol. 44, p. F328-F331

BYSKOV, A.G. et P.E.Hoyer 1988. « Embryology of mammalian gonads and ducts. » In : Knobil E., Neill J. (éd.). The Physiology of Reproduction. New York : Raven press, 1988, p. 265-302

CABANA, T. 1997. Embryologie animale. Faculté des arts et des sciences, département de sciences biologiques. Service des entreprises auxiliaires. Université de Montréal, p. 79-133

CADIGAN, K.M. et R. Nusse. 1997. « Wnt signaling : a common theme in animal development. » Genes et Development, vol. 11, p. 3286-3305

CASILLAS, E.R. et B.J. Erickson. 1975. « Studies on cartinine synthesis in the rat epididymis. » Journal of Reproduction and Fertility, vol. 44, p.287-291

CEREIJIDO, M., J. Valdes, L. Shoshani, et R.G. Contreras. 1998. «Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity». Annual Review of Physiology, vol. 60, p. 161-177

CHEN, Y., BS. Bal, JP. Gorski.1992. « Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. » Journal of Biologycal Chemistry, vol. 267, p. 24871-24878

CHEN, Y., C. Merzdorf, DL. Paul, DA. Goodenough. 1997. « COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early Xenopus embryos. » Journal of cell Biology, vol.138, p. 891-899

CHEN, YT. DB. Stewart et WJ. Nelson. 1999. « Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplamic reticulum exit and basal-lateral membrane targetting of E-cadherin in polarised MDCK cells. » The Journal of Cell Biology, vol. 144, p. 687-699

CHINOY, NJ., RJ. Verma, KG. Patel. 1983. « Effect of calcium on sperm motility of cauda epididymis in vitro. » Acta Europea Fertilitatis, vol. 14, p. 421-423

CHLENSKI, A., KV. Ketels, M. Tsao, MS. Talamonti, MR Anderson, R. Oyasu et DG. Scarpelli. 1999. « Tight junction protein ZO-2 is differently expressed in normal pancreatic ducts compared to human pancreatic adenocarcinoma. » International Journal of Cancer, vol. 82, p. 137-144

CITI, S., N. Denisenko. 1995. « Phosphorylation of the tight junction protein cingulin and the effects of protein kinase inhibitors and activators in MDCK epithelial cells. » Journal of Cell Science, vol. 108, p. 2917-2926

CLAUDE, P., D.A. Goodenough. 1973 « Fracture faces of zonulae occludentes from 'tight' and ' leaky' epithelia. » Journal of Cell Biology, vol. 58, p. 390-400

CLAUDE, P. 1978. « Morphological factors influencing transepithelial permeability : a model for the resistance of the zonula occludens. » The Journal of Membrane Biology, vol. 10, p. 219-232

CLAVERIE, JM., JP. Hardelin, R. Legouis, J. Levilliers, L. Bougueleret, MG, Mattei et C. Petit. 1993. «Characterization and chromosomal assignment of a human cDNA encoding a protein related to the murine 102-kDA cadherin-associated protein (α-caténine)». Genomics, vol.15, p. 13-20

CLERMONT, Y., et J. Flannery. 1970. « Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats.» Biology of Reproduction, vol. 3, p. 283-292

CLULOW, J., R.C. Jones L.A. Hansen et S.Y. Man. 1998. « Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis. » Journal of Reproduction and Fertility, vol. 53, p.1-14.

COMMISSION d'enquête sur les nouvelles technologie de la reproduction. 1993. Un virage à prendre en douceur. Rapport final, Ministère des services gouvernementaux

CORDENONSI, M., F. Turco, F. D'Atri, E. Hammar G. Martinucci, F. Meggio et S. Citi. 1999. « Xenopus leavis occludin. Identification of in votro phosphorylation sites by protein kinase CK2 and association with cingulin. » European Journal of Biochemistry/FEBS, vol. 264, p. 374-384.

COUROT, M. 1981 « Transport and maturation of spermatozoa in the epididymis of mammals. » Prog reprod biol, vol. 8, p. 67-79

COOPER, TG.,1982 « Secretion of inositol and glucose by the perfused rat cauda épididymis. » Journal of Reproduction and Fertility, vol. 64, p. 373-379

COOPER, TG.. 1998. « Interaction between epididymal secretion and spermatozoa. » Journal of Reproduction and Fertility, suppl, vol. 53, p.119-136

CYR D.G. et B. Robaire 1991. « Developmental regulation of epithelial and placental-cadherin mRNA in the rat epididymis. » Annual NY Acad Science, vol. 637, p. 399-408

CYR, D.G., O.W. Blaschuk et B. Robaire. 1992a. «Identification and developmental regulation of cadherin messenger ribonucleic acid in the rat testis». Endocrinology, vol. 131, p. 139-145

CYR, D.G., L. Hermo, O.W. Blaschuk et B. Robaire. 1992b. «Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization or epithelial cadherin in the rat epididymis». Endocrinology, vol.130, p. 353-363

CYR, D.G., L. Hermo et B. Robaire. 1993. «Developmental changes in épithelial cadhérin messager ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin during postnatal epididymal development in the rat». Endocrinology, vol.132, p. 1115-1124

CYR, DG., B. Robaire et L. Hermo. 1995. « Structure and turnover of the junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. » Microscopy Research and Technique, vol. 3, p. 54-66.

CYR, D.G., Hermo, L., Egenberger, N., Mertineit, C., Trasler, J.M., et Laird D.W. 1999. «Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis». Endocrinology, vol.140, p. 3815-3834

CYR, D.G., Finnson K.W., Dufresne J. , and Gregory M. 2002. « Cellular interactions and the blood-epididymal barrier ». In: B. Robaire and B. Hinton, (ed.). The Epididymis : from Molecules to Clinical Practice. Plenum Press, 2002, p.103-118

DALE, TC 1998 Biochemestry Journal, vol. 329, p. 209-223
DANIEL, JM. et AB. Reynolds. 1999. « The catenin p120ctn interacts with KAISO, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. » Molecular of cell Biology, vol. 19, p. 3614-3623

DECAENS, C., et D. Cassio. 2001. « Spatiotemporal expression of caténins, ZO-1 , and occludin during early polarization of hepatic WIF-B9 cells.» American Journal of Physiology. Cell Physiology, vol. 280, p. C527-539

De LARMINAT, M.A., P.S. Cuasnicu et J.A. Blanquier. 1980. « The in vitro metabolism of androgen levels in rats epididymis during sexual development.» Journal of Steroid Biochemistry, vol. 13, p. 1207-1213

DENHARDT, DT., X. Gou.1993 . « Osteopontin : a protein with diverse functions. » The FASEB Journal, vol. 7, p. 1475-1482

DENKER, BM, Nigam SK. 1998. « Molecular structure and assembly of the tight junction.» American Journal of Physiology, vol. 274, p. F1-F9.

DENKER, B. M., C. Saha, S. Khawaja et S.K. Nigam. 1996. «Involvement of a heterotrimeric G protein α subunit in tight junction biogenesis.» Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 25750-25753

EBNET, K., C. U. Sckulz, M.K. Meyer Zu Brickwedde, G.G. Pendle et D. Vestweber. 2000. « Junctional adhesion molecul interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. » Journal of Biologycal Chemistry, vol. 275, p. 27979-27988.

ELKJAER, m., Z. Vajda, LN. Nejsum, T. Kwon, UB. Jensen, M. Amiry-Moghaddam, J. Frokiaer et S. Nielsen. 2000. « immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. » Biochem. Biophys Res Commun. vol. 276, p. 1118-1128

FANNING, AS., B.J. Jameson, L.A. Jesaitis et J.M. Anderson. 1998. « The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. » Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 29745-29753

FANNING, AS., LL. Mitic et JM. Anderson. 1999. « Transmembrane proteins in the tight junction barrier. » Journal of the American Society of Nephrology, vol. 10, p. 1337-1345

FLICKINGER, C.J.. 1981. « Regional differences in synthesis, intracellular transport, and secretion of protein in the mouse epididymis » Biology of Reproduction, vol. 25, p. 871-883

FLICKINGER, C.J.. 1983. « Synthesis and secretion of glycoprotein by epididymal epithelium. » Journal of Andrology, vol. 4, p. 157-161

FRIEND, DS. Et NB. Gilula. 1972. « Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. » The Journal of Cell Biology, vol. 53, p. 758-776

FUCHS, M., T. Müller, M.M. Lerch et A. Ullrich. 1996. « Association of human protein-tyrosine phosphatase k with members of the armadillo family. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 16712-16719

FUKATA, M., S. Kuroda, M. Nakagawa, A. Kawajiri, N. Itoh, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, H. Fujisawa, A. Kikuchi et K. Kaibuchi.1999. « Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. » The Journal of Biological Chemistry, vol.274, p. 26044-26050

FUKATA, M., et K. Kaibuchi. 2001. « Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. » Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 2, p. 887-897

FURUSE, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo et S. Tsukita. 2002. « Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier : a lesson from claudin-1-deficient mice. » The journal of Cell Biology, vol.156, p. 1099-1111

FURUSE, M., T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura, Sa. Tsukita et Sh. Tsukita. 1993. «Occludin : a novel integral membrane protéine localizing at tight junctions.» The Journal of Cell Biology, vol.123, p. 1777-1788

FURUSE, M., M Itoh, T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura, Sa. Tsukita et Sh. Tsukita. 1994. «Direct association of occludin with Zo-1 and it possible involvement in the localization of occludin at tight junctions.» The Journal of Cell Biology, vol.127, p. 1617-1626

FURUSE, M., T. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto et Sh. Tsukita. 1998a. «Claudine-1 and –2 : novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin.» The Journal of Cell Biology, vol.141, p. 1539-1550.

FURUSE, M., H. Sasaki, K. Fujimoto et Sh. Tsukita. 1998b. «A single gene product, claudin-1 or –2 reconstitues tight junction strands and recruit occludin in fibroblasts.» The Journal of Cell Biology, vol. 143, p. 391-401.

GERHART, J., et R. Keller.1986. « Region-specific cell activities in amphibien gastrulation. » Annual Reviews in Cell Biology, vol. 2, p. 201-229

GLOYNA, R.E. et J.D. Wilson. 1969. « A comparative study of the conversion of testosterone to 17β-hydroxy-5α-androstan-3-one (dihydrotestosterone) by prostate and epididymis. » Journal of Clinical Endocrinology, vol. 29, p. 970-977

GONZALEZ-MARISCAL, L. 1999. « Molecular characterization of th etight junction protein ZO-1 in MDCK cells. » Experimental Cell Research, vol. 248, p. 97-109

GONZALEZ-MARISCAL, L., A. Betanzos et A. Avila-Flores. 2000. « Maguk proteins : structure and rôle in the tight junction. » Seminars in Cell and Developmental Biology, vol. 11, p. 315-324

GOTTARDI, C.J. et B.M. Gumbiner. 2001. « Adhesion signaling : How β-catenin interacts with its partners. » Current Biology, vol.11, p. R792-R794

GOTTARDI, C., M. Arpin, S. Fanning et D. Louvard. 1996. «The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. » Processing of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, p. 10779-10784.

GOW, A., CM. Southwood JS. Li, M. Pariali, GP. Riordan, SE. Brodie J. Danias, JM. Bronstein, B. Kachar, RA. Lazzarini. 1999. « CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. » Cell, vol. 99, p. 649-659

GREGORY, M., J. Dufresne, L. Hermo et D.G. Cyr. 2001. «Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the epididymis and is regulated by androgène. » Endocrinology, vol.142, p. 854-863

GUMBINER, B. et K. Simons. 1986. «Afunctionnal assay for proteins involved in establishing an epithelial occludin barrier : Identification of a uvomorulin-like polypeptide». Journal of Cell Biology, vol. 102, p. 457-468

GUMBINER, B., B.R. Stevenson et A. Grimaldi. 1988. « The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. » The Journal of Cell Biology, vol. 107, p. 1575-1587

GUMBINER, B., L. Theodore et D. Apatira. 1991. «Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. » Processing of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, p. 3460-3464

GUMBINER, B. 1993. « Breaking through the tight junction barrier. » The Journal of Cell Biology, vol. 123, p. 1631-1633

GUMBINER, B. 2000. « Regulation of cadherin adhesive activity. » The Journal of Cell Biology, vol. 148, p. 399-404

HAMMERSTEDT, R.H., et W.A. Rowan. 1979. « Phosphatidylcholine of blood lipoprotein is the precursor of glycerylphosphorylcholinefound in seminal plasma. » Biochimica et Biophysica acta, vol. 710, p. 370-376

HASKINS, J., L. Gu, E. S. Wittchen, J. Hibbard et B. R. Stevenson. 1998. «ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. » The Journal of Cell Biology, vol. 141, p. 199-208

HATTA, K. et M. Takeichi. 1986. «Expression of N-Cadherin adhesion molecules associated with early morphogenic events in chick development » Nature, vol. 320, p. 447-449

HECHT, A., CM. Litterst, O. Huber et R. Kemler. 1999. «Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 18017-18025

HERMO, L., J. Wright, R. Oko et C.R. Morales. 1991a. « Rôle of epithelial cells of the male excurrent duct system of the rat in the endocytosis or secretion of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). » Biology of Reproduction, vol. 44, p. 1113-1131

HERMO, L., R.Oko et B. Robaire. 1992a. «Epithelial cells of the epididymis show regional variations with respect to the secretion or endocytosis of immobilin as revealed by light and electron microscope immunocytochemistry. » The Anatomical Record, vol. 232, p. 202-220

HERMO, L., J. Dworkin et R. Oko. 1988. «Rôle of the epithelial clear cell of the rat epididimis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. » The American Journal of Anatomy, vol. 83, p. 107-124

HERMO, L. 1995. «Structural features and function of principal cells of the intermediate zone of the epididimis of adult rats. » The Anatomical Record, vol. 242, p. 515-530

HESS, RA., D. Bunick, DB. Lubahn, Q. Zhou et J. Bouma. 2000. « Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. » Journal of Andrology, vol. 21, p. 107-21

HINCK, L., IS. Nathke, J. Papkoff et WJ. Nelson. 1994. «Dinamics of cadherin/catenin complex formation :novel protein interactions and pathways of complex assembly. » The Journal of Cell Biology, vol. 125, p. 1327-1340

HINCK, L., WJ. Nelson et J. Papkoff. 1994. «Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing β-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. » The Journal of Cell Biology, vol.124, p. 729-741

HINTON, B.T. et B.P. Setchell. 1980. «Concentration and uptake of cartinine in the rat epididymis: A micropuncture study. » In R.A. Frankel and J.D. McGarry (éd.). Cartinine biosynthesis, metabolism and functions. New-York : Academic press 1980, p. 237-249.

HINTON, B.T., et S.S. Howards. 1981. « Permeability caractheristics of the epithelium in the rat caput epididymis. » Journal of Reproduction and Fertility, vol. 63, p. 95-99.

HOFFER, A.P., et B.T. Hinton. 1984. « Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. » Biology of Reproduction, vol 30, p. 991-1004

HOFFMAN, LH. N. Jahad, MC. Orgebin-Crist. 1976. « The effects of testosterone, 5alpha-dihydrotestosterone, 3alpha-androstanediol, and 3beta-androstanediol on epithelial fine structure of the rabbit epididymis in organ culture. » Cell Tissue Research, vol. 167, p. 493-514

HOLSCHBACH, C., T.G. Cooper. 2002. «A possible extratubular origin of epididymal basal cells in mice.» Reproduction, vol.123, p.517-525

HONG, CY., BN. Chiang, P. Turner. 1984. « Calcium ion is the key regulator of human sperm function. » Lancet, vol. 2, p. 1449-1451

HOSCHUETZKY, H., H. Aberle, et R. Kemler. 1994. «β-catenin mediates the interaction of the cadherin –catenin complex with epidermal growth factor receptor. » The Journal of Cell Biology, vol.127, p.1375-1380

HOWARDS, S.S., S.J. Jessse et A.L. Johnson. 1976. « Micropuncture studies of the blood-seminiferous tubule barrier. » Biological Reproduction, vol. 14, p. 264-269.

IBRAHIM, NM., LG. Young et O. Frohlich. 2001. « Epididymal specificity and androgen regulation of rat EP2.» Biology of reproduction, vol. 65, p. 575-580

ILIO, K. Y., R. A. Hess. 1994. « Structure and function of the ductuli efferentes: a review. » Microscopy Research and Technique, vol. 29, p. 432-67.

ILIO, K.Y. et R. A. Hess 1992. « Localization and activity of Na+,K(+)-ATPase in the ductuli efferentes of the rat. » The Anatomical Record, vol. 234, p. 190-200

IMAMURA, Y., M Itoh, Y. Maeno, S. Tsukita et A. Nagafuchi. 1999. « Functional domaine of α-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. » The Journal of Cell Biology, vol. 144, p. 1311-1322

ITOH, M., S. Yonemura, A. Nagafuchi, Sa. Tsukita et Sh. Tsukita. 1991. « A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites. » The Journal of Cell Biology, vol. 115, p. 1449-1462

ITOH, M., A. Nagafuchi, S. Yonemura, T. Kitani-Yasuda, S. Tsukita et S. Tsukita. 1993. «The 220-kd protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells : cDNA cloning and immunoelectron microscopy. » The Journal of Cell Biology, vol.121, p. 491-502

ITOH, M., K. Morita et Sh. Tsukita. 1999. «Caractérization of ZO-2 as a Maguk family member associated with tight and adherens junctions with a binding affinity to occludin and α-catenin. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 5981-5986

ITOH, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou et S. Tsukita. 1999. «Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the Cooh termini of claudin. » The Journal of Cell Biology, vol.147, p. 1351-1363

JESAITIS, LA. et DA. Goodenough. 1994. «Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppresser protein . » The Journal of Cell Biology, vol. 124, p. 949-961

JOHNSON, K.J., S.R. Patel et K. Boekkelheide. 2000. « Multiple cadherin superfamily members with unique espression profiles are produced in rat testis. » Endocrinology vol.141, p. 675-683

JOHNSON, K.R., D.K. Hummingbird et A.B. Reynolds. 2000. «Selective uncoupling of p120ctn from E-cadherin disputes strong adhesion. » The Journal of Cell Biology, vol. 148, p. 189-201

KAIBUCHI, K., S. Kuroda, M. Fukata et M. Nakagawa. 1999. «Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. » Current Opinion in Cell Biology, vol. 11, p. 591-596

KANKA, J. et V. Kopecny. 1977. « An autoradiographic study of macromolecular synthesis in the epithelium of the ductus epididymidis in the mouse . I.DNA, RNA, and protein. » Biology of Reproduction, vol.6, p. 421-427

KEIRSEBILCK, A., S. Bonné, K. Staes, J. van Hengel, F. Nollet, A. Reynolds et F. van Roy. 1998. «Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms ». Genomics, vol. 50, p. 129-146

KEMLER, R. et J. Stappert. 1994. «A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated». Cell Adhesion and Communication, vol. 2, p. 319-327

KEON, B.H., S. Schafer, C. Kuhn, C. Grund, W.W. Franke. 1996. « Symplekin , a novel type of tight junction plaque protein. » The Journal of Cell Biology, vol. 134, p. 1003-1018

KIM, S.W., X. Fang, H. Ji, A.F. Paulson, J.M. Daniel, M. Ciesiolka, F. van Roy et P.D. McCrea. 2002. « Isolation and caracterization of Xkaiso, a transcriptional repressor that associates with the catenin Xp120ctn in *Xenopus laevis.* » The Journal of Biological Chemistry, vol.277, p. 8202-8208

KINTNER, C. 1992. « Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain ». Cell, vol. 69, p. 225-236

KNIESEL, U., et H. Wolburg. 2000. « Tight junctions of the blood-brain barrier. » Cellular and Molecular Neurobiology, vol.20, p. 57-76

KNUDSEN, K.A., A.P. Soler, K.R. Johnson et N.J. Wheelock. 1995. « Interaction of α-actinin with the cadherin/cetenin cell-cell adhesion complex via α-catenin. » The Journal of Cell Biology, vol. 130, p. 67-77

KORMANO, M.. 1967. « Dye permeability and alkaline phosphatase activity of testicular capillaries in the post-natal rat ». Histochimie, vol. 9, p. 327-338

KURODA, S, M. Fukata, K. Fujii, T. Nakamura, I. Izawa et K. Kaibuchi. 1997. « Regulation of cell-cell adhesion of MDCK cells by Cdc42 and Rac1 small GTPases. » Biochemistry Biophys Res Commun, vol.240, p. 430-435

KURODA, S, M, Fukata, M, Nakagawa, K, F ujii, T. Nakamura, T. Ookubo, I. Izawa, T. Nagase, N. Nomura, H. Tani, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara et K. Kaibuchi 1998. « Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin- mediated cell-cell adhesion. » Science, vol. 281, p. 832-835

LAPIERRE, L. A. 2000. « The molecular structure of the tight junction. »Advenced Drug Delivery Reviews, vol. 41, p.255-264

LARUE, L., C. Antos, S. Butz, O. Huber, V. Delmas, M. Dominis et R. Kemler. 1996. «A role for cadherins in tissue formation. » Developement, vol. 122, p. 3185-3194

LÉGARÉ, C., M. Thabet, S. Picard et R. Sullivan. 2001. « Effect of vasectomy on P34H messenger ribonucleic acid expression along the human excurrent duct : A reflexion on the function of the human epididymis. » Biology of Reproduction, vol 64, p. 720-727

LEUNG, GPH ., C.M. Tse, S.B. Cheng Chew, et P.Y.D. Wong. 2001. « Expression of multiple NA+/H+ exchanger isoforms in cultured epithelial cells from rat efferent duct and cauda epididymis. » Biology of Reproduction, vol 64, p. 482-490.

LEVY, S., B. Robaire. 1999. «Segment-specific changes with age in the expression of junctional protéins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. » Biology of Reproduction, vol. 60, p. 1392-1401.

LIESKE, JC., H. Swift, T. Martin, B. Patterson, FG. Toback. 1994. « Renal epithelial cells rapidly bind and internalize calcium oxalate monohydrate crystals. » Processing of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, p. 6987-6991

LIESKE, JC., FG. Toback, S. Deganello. 1996. « Face-selective adhesion of calcium oxalate dihydrate crystals to renal epithelial cells. » Calcified Tissue International, vol. 58, p. 195-200

LIESKE, JC., MS. Hammes, JR Hoyer, FG. Toback. 1997. « Renal cell osteopontin production is stimulated by calcium oxalate monohydrate crystal. » Kidney International, vol. 51, p. 679-686

LIU, HW., YC Lin, CF. Chao, SY. Chang et GH. Sun. 2000. « GP-83 and GP-39, two glycoproteins secreted by human epididymis are conjugated to spermatozoa during maturation. » Molecular Human Reproduction, vol. 6, p. 422-428

LIU, Y., A. Nusrat, FJ. Schnell, TA. Reaves, S. Walsh, M. Pochet et CA. Parkos. 2000. « Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. » Journal of Cell Science, vol. 113, p. 2363-2374

LISOVSKY, M., K. Itoh, et S. Y. Sokol. 2002. «Frizzled receptors activate a novel JNK-dependent pathway that may lead to apoptosis. » Current biology, vol.12, p. 53-58

LUEDTKE, C.C., M.D. Mckee, D.G. Cyr, M. Gregory, M.T. Kaartinen, J. Mui et L. Hermo. 2002. «Osteopontine Expression and rgulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. » Biology of Reproduction, vol. 66, p. 1437-1448

MAHONY, MC., S. lanzendorf, K. Gorden et GD. Hodgen. 1996. «Effect of caffeine and dbcAMP on zona pellucide penetration by epididymal spermatozoa of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis)*. » Molecular Reproduction and Development, vol. 43, p. 530-535

MANEELY, R.B.. 1959. « Epididymal structure and function. A historical and critical review. » Acta Zoologica, vol. 40, p. 1-21

MARTIN-PADURA, I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa et al. 1998. « Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. » The Journal of Cell Biology, vol. 142, p. 117-127

MATTER, K. 2000. « Epithelial polarity : Sorting out the sorters. » Current Biology, vol. 10, p. R39-R42

MARIEB E.N. 1999. Anatomie et Physiologie Humaines (2iem éd); Edition du renouveau pédagogique inc., Montréal, Canada. 1194 p.

MAURO, L., M. Bartucci, C. Morelli S. Ando et E. Surmacz. 2001. «IGF-I receptor-induced cell-cell adhesion of MCF-7 breast cancer cells requires the expression of junction protein ZO-1. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 39892-39897

McCARTHY, KM., IB. Skare, MC. Stankewich, M. Furuse, S. Tsukita, RA. Rogers, RD. Lynch, EE. Schneeberger. 1996. « Occludin is a functional component of the tight junction. » Journal of Cell science, vol. 109, p. 2287-2298

McCREA, P., et B. Gumbiner. 1991. «Purification of a 92 kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (Uvomorulin) : characterization and extractability of thr protein complex from the cell cytostructure. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 4514-4520

MOLLGARD, K., D.N. Malinowski et N.R. Sauders. 1976. « Lack of correlation between tight junction morphology and permeability properties in developping choroid plexus. » Nature, vol. 264, p. 293-294

MORITA, K., M. Furuse, K. Fujimoto et Sh. Tsukita. 1999. «Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. » Processing of National Academy Science USA, vol. 96, p. 511-516

MORITA, K., H. Sasaki, M. Furuse et S. Tsukita. 1999. « Endothelial claudin. Claudin-5/ tmvcf constitutes tight junctions strands in endothelial cells. » The Journal of Cell Biology, vol. 147, p. 185-194

MOROI, S., M. Saitou, K. Fujimoto, A. Sakakibara, M. Furuse, O. Yoshida et S. Tsukita. 1998. «Occludin is concentrated at tight junction of mouse / rat but not human / guinea pig sertoli cell in testis. » American Journal of Physiology, vol. 274, p. C1708-C1717

MÜLLER, T., A. Choidas, E. Reichmann et A. Ullrich.1999. « Phosphorylation and free pool of β-catenin are regulated by tyrosine kinase and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. » The journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 10173-10183

MURESAN, Z., DL. Paul et DA. Goodenough. 2000. « Occludin-1B, a variant of the tight junction protein occludin. » Molecular Biology of the Cell, Vol. 11, p. 627-634

NAGAFUCHI, A., S. Ishihara et S. Tsukita. 1994. «The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhésion : functional analysis of E-cadherin-α-catenin fusion molecules.» The Journal of Cell Biology, vol.127, p. 235-245

NAGANO, T. et F. Suzuki.1976. «The postnatal development of junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze fracture». The Anatomical Record, vol. 185, p. 403-417

NALBANDOV, A.V.1976. Reproductive Physiology of mammals and birds » 3rd ed., pp.1-334 W.H. Freeman and Compagny, San Francisco.

NATH, D., GC. Majumder.1999. « Maturation-dependent modification of the protein phosphorylation profile of isolated goat sperm plasma membrane. » Journal of Reproduction and Fertilization, vol.115, p. 29-37

NEMILOFF, A.,1926 « Histo-physiologische Untersuchungen über dne Nebenhoden Zeitschrift für » Anatomie und Entwicklungsgeschichte, vol. 79, p. 1-43

NIESET, JE., AR. Redfield, F. Jin, KA. Knudsen, KR. John et MJ. Wheelock. 1997. «Characterization of the interactions of α-catenin with α-actinin and β- catenin/ placoglobin. » Journal of Cell Sciences, vol. 110, p. 1013-1022

NIXON, B., R.C. Jones, L.A. Hansen et M.K. Holland. 2002. « rabbit epididymal secretory proteins. I. Characterization and hormonal regulation. » Biology of Reproduction, vol. 67, p. 133-139

NOLLET, F., G. Berx, F. Molemans, F. van Roy. 1996. «Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) ». Genomics, vol. 32, p. 413-424

NOSE, A., A. Nagafuchi et M. Takeichi. 1987. «Isolation of placental cadherin cDNA : identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules.» The Embo Journal, vol. 6, p. 3655-3661

NOSE, A., K. Tsuji, M. Takeichi. 1990. «Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. » Cell, vol. 61, p. 147-155

OHKUBO, T., et M. Ozawa. 1999. «p120 (cnt) binds to the membrane proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activities. » The Journal of Biologycal Chemistry, vol. 274, p. 21409-21415

OHSUGI, M., L. Larue, H. Schwarz et R. Kemler. 1997. « Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin.» Dev Biol, vol. 185, p. 261-271

OKO, R., L. Hermo, PT Chan, A Fazel et JJ Bergeron. 1993. « The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. » The Journal of Cell Biology, vol. 123, p. 809-21.

OLSON, GE., SK. NagDas et VP. Winfrey. 2002. Structural differentiation of the spermatozoa during post-testicular maturation. B. Robaire et B. Hinton éd., " The epididymis : from molecules to clinical practice." Plenum Press

ORGEBIN-CRIST, MC. 1976. « The effects of testosterone, 5alpha-dihydrotestosterone, 3alpha-androstanediol, and 3beta-androstanediol on epithelial fine structure of the rabbit epididymis in organ culture. » Cell tissue research, vol 167, p. 493-514

PAPKOFF, J. 1997. « Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 4536-43.

PASTOR-SOLER, N., C. Bagnis, I. Sabolic, R. Tyszkowski, M. McKee, A. Van Hoek, S. Breton et D. Brown. 2001. « Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. » Biology of Reproduction, vol. 65, p. 384-393

PASTOR-SOLER, N., C. Isnard-bagnis, C. Herak-Kramberger, I. Sabolic, A. Van Hoek, D. Brown et S. Breton. 2002. « Expression of aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. » Biology of Reproduction, vol.66, p. 1716-1722

PERL, A.K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb et G. Christofori. 1998. «A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma». Nature, vol. 392, p. 190-193

PÖTTER, E., C. Bergwitz et Gt. Brabant. 1999. «The cadherin-catenin system : implication for growth and différenciation of endocrine tissues. » Endocrine reviews, vol. 20, p. 207-239

RAJALAKSMI, M., V. Sukanya, PR. Ramakrishnan et J. Kaur. 1990. « Effect of dihydrotestosterone on ultrastructural changes in rhesus monkey spermatozoa. » Andrologia, vol. 22, p. 144-151

RAJASEKARAN, A . K., M. Hojo, T. Huima et E. Rodriguez-Boulan. 1996. « Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. » The Journal of Cell Biology, vol. 132, p. 451-463

REICHERT, M., T. Muller et W. Hunziker. 2000. «The PDZ domains of zonula-occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of madin-Darby canine kidney I cells. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 9492-9500

REID, B.L. et K.W. Cleland. 1957. « The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis. » Australian Jounal of Zoology, vol. 55, p. 223-246

REID, B.L.. 1959. « The structure and function of the epididymis.II. The histogenesis of the rat epididymis. » Australian Jounal of Zoology, vol. 7, p. 22-38.

REYNOLDS, AB, J. Daniel, P. McCrea, M.J., Wheelock, J. Wu et Z. Zhang. 1994. «Identification of a new catenin : the tyrosin kinase substrate p120cas associates with E-Cadherin complexes. » Molecular of Cell Biology, vol. 14, p. 8333-8342

REYNOLDS, AB., NA. Jenkins, DJ. Gilbert, NG. Copeland, DN. Shapiro, J. Wu et J.M. Daniel. 1996. «The gene encoding p120cas, a novel catenin, localizes on human chromosome 11q11 (CTNND) and mouse chromosome 2 (Catns). » Genomics, vol. 31, p. 127-129

ROBAIRE, B. et L. Hermo. 1988. «Efferent ducts, epididymis and vas deferens :structure functions, and thier regulation ». In : Knobil E., Neill J. (éd.). The physiology of reproduction. New York: Raven press, 1988, p. 999-1080

Robaire, B. et RS. Viger. 1995. « Regulation of epididymal epithelial cell functions.» Biology of Reproduction, vol. 52, p. 226-36

ROBINSON, R. et I.B. Fritz. 1979. « Myoinositol biosynthesis by Sertoli cells and level of myoinositol biosynthetic enzyme in testis and epididymis » Canadian Journal of Biochemistry, vol. 57, p. 962-967

SAITOU, M., K. Fujimoto, Y. Doi, M.Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, H. Takano, T. Noda et S. Tsukita. 1998. « Occludin-deficient embryonic stem cells can differenciate into polarized epithelial cells besring tight junctions. » The Journal of Cell Biology, vol. 141, p. 397-408

SATOH, H., Y. Zhong, H. Isomura, M. Saitoh, K. Enomoto, N. Sawada, M. Mori. 1996. « Localisation of 7H6 tight junction-asssociated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. » Experimental Cell Research, vol. 222, p. 269-274

SATOSHI, I. et al. 1998 Embo. Jounal. 17, pp.1371-1384

SATOH-HORIKAWA, K., H. Nakanishi, K. Takahashi, M. Miyahara, M. Nishimura, K. Tachibana, A. Mizoguchi et Y. Takai. 2000. « Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities. » The Journal of Biological Chemistry, Vol. 275, p. 10291-1029

SCHEER, H. et B. Robaire. 1980. « SteroidΔ 4-5α-reductase and 3α-hydrxystéroïde déhydrogénase in the rat epididymis during development. » Endocrinology, vol. 107, p. 948-953

SCHEER, H. et B. Robaire. 1983. « Subcellular distribution of steroidΔ 4-5α-reductase and 3α-hydrxystéroïde déhydrogénase in the rat epididymis during sexual maturation.» Biology of Reproduction, vol. 29, p. 1-10

SEILER, P., L. Wenzel, A. Wagenfeld, C.-H. Yeung, E. Nieschlag et TG. Cooper. 1998. « The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and their temporal expression of macrophage antigens. » International Journal of Andrology, vol.21, p. 217-226

SETCHELL, BP. et DE. Brooks.1988. « Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. » In : Knobil E., Neill J. (éd.). The physiology of reproduction. New York : Raven press, 1988, p. 753-836

SHORE, E.M., et W.J. Nelson.1991. « Biosynthesis of the cell adhesion molecule Uvormorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 19672-19680

SIMON, DB et al. 1999. «Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellularMg2+ reabsortion .» Science, vol. 285, p. 103-106

SITERI, JE., KM. Ensrud, A. Moore et DW. Hamilton. 1995. « Osteopontin mRNA and protein inthe rat testis and epididymis, and on sperm. » Molecular of Reproduction and Development, vol. 40, p. 16-28

SPRING, K. 1998. «Routes and mechanisms of fluid transport by epithelia. » Annual Reviews in Physiology, vol. 60, p. 105-119

STAEHELIN, L.A. 1974. «Structure and function of intercellular junctions». International Reviews Cytology, vol. 39, p. 191-283

STEVENSON, B. R., J. D. Siliciano, M. S. Mooseker et D. A. Goodenough. 1986. «Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. » The Journal of Cell Biology, vol. 103, p. 755-766

STUART, R., A Sun, K. T. Bush et S. K. Nigam. 1996 « Dependance of epithelial intercellular junction biogenesis on thapsigargin-sensitive intracellular calcium stores. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 13636-13641

SUJARIT, S. et RC. Jones. 1991. « [3H] Thymidine uptake by the epididymis, seminal vesicles and prostate gland during postnatal development of the rat .» Reproduction, Fertility and Development, vol. 3, p. 313-319

SUN, EL. et CJ. Flickinger. 1982. « Proliferative activity in the rat epididymis during postnatal development. » Anatomical record, vol. 203, p. 273-284

SUZUKI, F. et T. Nagano. 1976. « Changes in occluding junctions of epididymal epithelium in the developing ang gonadectomized mammals. » The Journal of Cell Biology vol. 70, p. 101a

TAIPALE, J., et PA. Beachy. 2001. « The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. » Nature, vol. 411, p. 349-354.

TERPE, H-J., H. Stark, P. Prehm et U. Guenthert. 1994. « Cd44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. » Histochemistry, vol.101, p. 79-89

THORESON, M.A., P.Z. Anastasiads, J.M . Daniel. R.C. Ireton, M.J. Wheelock, K.R. Johnson, D. K. Hummingbird et A.B. Reynolds. 2000. « Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. » The Journal of Cell Biology, vol. 148, p. 189-202.

TOWNES, P.L. et J. Holtfreter. 1955. « Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells ». The Journal of Experimental Zoology, vol. 128, p. 53-120

TOYOFUKU, T., M. Yabuki, K. Otsu, T. Kuzuya, M. Hori, M. Tada. 1998. «Direct association of the gap junction protein connexine-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. » The Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 12725-12731

TRASLER, JM., L. Hermo et B. Robaire 1988. « Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. » Biology of Reproduction, vol. 38, p. 463-479

TSUKITA, S., S. Tsukita, A. Nagafuchi et S. Yonemura. 1992. « Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junction. » Current opinion in Cell Biology, vol. 4, p. 834-839

TSUKITA, S. et M. Furuse. 1999. « Occludin and claudins in tight junction strands : leading or supporting players ? » Trends in Cell Biology, vol. 9, p. 268-273

TSUKITA, S., M. Furuse. 2000. « Pores in the wall : claudins constitue tight junction strands containing aquaous pores. » The Journal of Cell Biology, vol. 149, p. 13-16

TSUKITA, S., M. Furuse et M. Itoh. 2001. « Multifunctional strands in tight junctions » Nature Reviews, Molecular Cell Biology, vol. 2, p. 285-293

TUCK, R.R., B.P. Setchell, G.M.H. Waites et J.A. Young. 1970 « The composition of fluide collected by micropuncture ans catherization from the seminiferous tubules and the rete testis of rats. » Pluegers Arch., vol. 318, p. 225-243.

TULSIANI, DR., MD. Skudlarek, MK. Holland et MC. Orgebin-Crist. 1993. « Glycosilation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. » Biology of Reproduction, vol. 48, p. 417-428

TURNER, TT. DW. Miller.1997. « On the synthesis and secretion of the seminiferous tubule proteins in vivo after ischemia and germ cell loss. » Biology of Reproduction, vol. 57, p. 1275-1284

TURNER, T.T. 1991. « Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. » Annual New-York academic of science, vol. 637, p. 364-383.

TURNER, T.T. et S.S. Howards. 1985. « The tenacity of the blood-testis and blood-epididymal barrier. » In : T.J. Lobl and E.S.E. Hafez (éd.). Male fertility and its regulation. Lancaster : MTP press limited, 1985, p. 383-393

UPADHYAY, S., J.M. Luciani et L. Zamboni. 1981. « The role of mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. » In : A.G. Byskov and H. Peters (éd.). Development and function of reproductive organs. Amsterdam : Excerpta Medica, 1981, p.18-27.

VAN DE WETERING, M., R. Cavallo, D. Dooijes, M. van Beest, J. van Es, J. Loureiro, A. Ypma, D. Hursh, T. Jones, A. Bejsovec, M. Peifer, M. Mortin et H. Clevers. 1997. «Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. » Cell, vol. 88, p. 789-799

VAN HENGEL, J., P. Vanhoenacker, K. Staes et F. van Roy. 1999. « Nuclear localization of the p120 ^{cnt} Armadillon-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. » Processing of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 7980-7985

VIGER, RS. et B. Robaire. 1992. « Expression of 4-ene steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid in the rat epididymis during postnatal development. » Endocrinology, vol. 131, p. 1534-40

VIGER RS. et B. Robaire. 1994. «Immunocytochemical localization of 4-ene steroid 5 alpha-reductase type 1 along the rat epididymis during postnatal development. » Endocrinology, vol. 134, p. 2298-306.

VIGER, RS., et B. Robaire. 1996. « The mRNAs for the steroid 5 alpha-reductase isozymes, types 1 and 2, are differentially regulated in the rat epididymis ». Journal of Andrology, vol. 17, p. 27-34

VLEMINCKX, K. et R. Kemler. 1999. «Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. » Bioessays, vol. 21, p. 211-220

YAP, A.S., J.M. Mullin et B. R. Stevenson. 1998. «Molecular analysis of tight junction physiology : insights and paradoxes». The Journal of Membrane Biology, vol. 163, p. 159-167

VLEMINCKX, K., R. Kemler et A. Hecht. 1999. «The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta-catenin complex in Xenopus laevis. » Mechanisms of Development, vol. 81, p. 49-58

WATABE-UCHIDA, M., N. Uchida, Y. Imamura, A. Nagafuchi, K. Fujimoto, T. Uemura, S. Vermeulen, F. van Roy, E.D. Adamson et M. Takeichi. 1998. «α-caténine- vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells ». The Journal of Cell Biology, vol. 142, p. 847-857

WEST, MR., DJ Ferguson, VJ. Hart, S. Sanjar et Y. Man. 2002. « Maintenance of the epithelial barrier in a bronchial epithelial cell line is dependent on functional E-cadherin local to the tight junctions. » Cell Commun Adhes, vol. 9, p. 29-44

WILLOTT, E., M.S. Balda, M. Heintzelman, B. Jameson et J.M. Anderson. 1993. « Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. » American Journal of Physiology, vol. 262, p. C1119-C1124

WILLOTT, E., M.S. Balda, A.S. Fanning, B Jameson, C. van Itallie et J.M. Anderson. 1993 « The tight junction protein ZO-1 is homologous to the *Drosophila* disc-large tumor suppressor protein of septate junctions. » Processing of National Academy of Sciences USA, vol. 90, p. 7834-7838

WITTCHEN, ES., J. Haskins et B.R. Stevenson. 1999. « Protein interactions at the tight junction : actin has multiple binding parterns, and ZO-1 forms independant complexes with ZO-2 and ZO-3.» The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 35179-35185

WONG, PYD, CL. Au. et HK. Ngai. 1978. « Electrolyte and water transport in rat epididymis; its possible role in sperm maturation. » In : Endocrine approach to male contraception. Copenhagen : Scriptor p.608-628

WONG, PY. et CH. Yeung. 1978. « Absorptive and secretory functions of the perfused rat cauda epididymis » Journal of Physiology, vol. 275, p. 13-26

WONG, PY. et CN. Uchendu. 1990. « The rôle of angiotensin-converting anzyme in the rat epididymis. » Journal of Endocrinology, vol. 125, p. 457-465

YAP, A.S., C.M. Niessen et B.M. Gumbiner. 1998. « The juxtamenbrane region or the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. » Journal of Cell Biology, vol. 141, p. 779-789

YEUNG, C.-H., G. F. Weibauer et T.G. Cooper. 1999. « Responses of monkey epididymal sperm of different maturational status to second messengers mediating protein tyrosinw phosphorylation, acrosome reaction, and motility. » Molecular Reproduction and development, vol. 54, p.194-202

YEUNG, CH., D. Nashan TG. Cooper, C. Sorg, F. Oberpenning, H. Schulze et E. Nieschlag. 1994. « Basal cells of the human epididymis-antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. » Biology of Reproduction vol. 50, p. 917-926

Yokoyama S, K. Tachibana, H. Nakanishi, Y. Yamamoto, K. Irie, K. Mandai, A. Nagafuchi, M. Monden et Y. Takai. 2001. « alpha-catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectin-based cell-cell adhesion sites through afadin. » Molecular Biology of the Cell, vol. 12, p. 1595-1609

YONEMURA, S., M. Itoh, A. Nagafuchi et Sh. Tsukita. 1995. « Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. ». Journal of Cell Science, vol. 108, p. 127-142