

Université du Québec  
INRS Institut Armand-Frappier

EFFETS D'UNE EXPOSITION AU TRIBUTYLÉTAIN SUR LE  
SYSTÈME REPRODUCTEUR MÂLE

Par  
Johanna Barthelemy

Thèse présentée  
pour l'obtention  
du grade de Philosophiae Doctore (Ph.D.)  
en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Dr Jacques Bernier, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Dr Gerard Cooke, Ministère de Santé Canada
Examineur externe	Dr Robert Sullivan, Université Laval
Directeur de recherche	Dr Daniel G. Cyr, INRS-Institut Armand-Frappier







## Résumé

Le tributylétain (TBT) est un perturbateur endocrinien qui, de part ses utilisations, possède une forte dispersion dans l'environnement marin. Des effets importants ont ainsi été observés pour des organismes marins exposés, notamment au niveau de la reproduction et de la fertilité. Cependant, jusqu'ici, peu d'études ont été faites sur l'impact des organo-étains sur les mammifères et leur système reproducteur. Il est possible qu'une exposition à des contaminants environnementaux soit en partie responsable de l'augmentation de l'incidence de certaines pathologies du système reproducteur mâle, observée depuis plusieurs décennies.

Le développement du système reproducteur est complexe et requiert non seulement des hormones sexuelles, mais dépend également des interactions directes entre les cellules. Nous nous intéressons particulièrement à deux formes de jonctions : les jonctions serrées, qui forment dans le tractus reproducteur les barrières hémato-prostatique et hémato-épididymaire et qui sont formées en partie par une famille de protéines nommées claudines. Et également aux jonctions adhérentes, qui sont responsables de la cohésion cellulaire et qui sont formées notamment des cadhérines et des caténines.

L'objectif de cette étude était de déterminer les effets à long terme d'une exposition *in utero* au TBT sur le système reproducteur mâle. Nous avons exposé des rats *in utero* à différentes concentrations de TBT (0, 2.5, 10 et 20 mg/kg) et ils ont ensuite été sacrifiés à l'âge de 91 jours. Tout d'abord, une analyse de motilité de spermatozoïdes assistée par ordinateur (CASA) a permis de dénoter des effets du TBT sur différents paramètres, tels par exemple une baisse de leur motilité, ainsi qu'une baisse de leur motilité progressive. Une baisse importante du poids de la prostate ventrale a été observée. De plus nous avons mis en évidence une baisse dose-dépendante de l'expression de E-cadhérine dans les jonctions adhérentes de cet organe. Un changement du patron d'expression des claudines qui composent les jonctions serrées de la prostate ventrale a été observé, ainsi qu'un changement dans la localisation de la claudine-1. Des effets similaires sur les protéines des jonctions serrées et des jonctions adhérentes ont été mis en évidence dans l'épididyme. Ainsi le TBT semble avoir un effet ciblé sur les protéines composant les jonctions intercellulaires du système reproducteur mâle, qui sont indispensables afin de

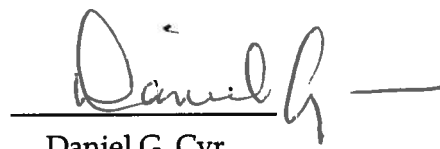
créer un environnement propice au développement et à la maturation des spermatozoïdes, ainsi qu'une coordination fonctionnelle entre les cellules.

Afin de vérifier les effets observés *in vivo*, nous avons mené différentes expériences de culture cellulaire. Pour ce faire, une nouvelle lignée cellulaire d'épididyme a été développée dans notre laboratoire. Nous avons exposé les cellules à différentes concentrations de TBT, non létales, et nous avons pu observer une baisse dose-dépendante des claudines, ainsi que d'E-cadhérine. Cependant, contrairement aux animaux, les cellules possèdent une capacité de récupération, ainsi les effets ne sont pas permanents chez des cellules matures. Enfin, à l'aide d'oligos de type morpholinos, en inhibant l'expression des claudines, nous avons pu démontrer qu'il existait un phénomène de compensation entre les différentes claudines qui composent l'épididyme, lorsque l'expression de l'une d'entre elles est inhibée.

Nos résultats ont ainsi permis de mettre en évidence le fait qu'une exposition au TBT durant le développement embryonnaire a des effets rémanents sur le système reproducteur même une fois l'âge adulte atteint. De plus, les effets du TBT sur les claudines, et les autres acteurs des complexes jonctionnels du système reproducteur, pourraient mettre en péril l'intégrité des barrières hémato-épididymaire et hémato-prostatique, ayant ainsi des conséquences importantes sur le développement des spermatozoïdes et la fertilité masculine.

---

Johanna Barthelemy



---

Daniel G. Cyr

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr Cyr, de m'avoir donné la possibilité de faire un stage de maîtrise, puis un doctorat dans son laboratoire. De m'avoir ainsi initiée à la recherche, de m'avoir donné l'opportunité d'évoluer dans un laboratoire de qualité et également l'occasion de participer à de nombreux congrès afin de partager le fruit de mes recherches.

Je remercie également tous mes collègues étudiants, certains devenus de précieux amis, que j'ai côtoyés pendant ces longues années à l'INRS, ils ont été ma première famille quand j'étais fraîchement débarquée de Paris, et ils ont tous contribué à mon intégration dans la culture québécoise. Il y a les passés, Poil de ', David, Ken, Myrian, Martin et puis ceux du quotidien Le Belge, Clo, Meech, Ju, Ge, Mich Mich, Steph, Alex, Evemie, Aurore. Merci infiniment... Et un spécial merci à Michelle pour sa patience à corriger mon anglais, hum parfois très moyen !

Un merci tout particulier à Julie. Je suis arrivée dans le Lab, je ne connaissais que les rudiments de la biologie moléculaire, avec patience et abnégation elle m'a tout enseigné. Elle a toujours su me prodiguer de justes conseils et éclairer ma lanterne dans la nuit noire de la recherche.

Je remercie Yannick de m'avoir soutenue dans les moments difficiles et d'avoir su m'encourager à toujours continuer.

Puis, je remercie du plus profond de mon cœur ma famille, et surtout mes parents, Laurence et Bertrand, ainsi que mes grands-parents Éliane et Roger et ma sœur Leelo, pour leur support sans faille, pour m'avoir encouragée à suivre mes rêves, même les plus fous. J'ai toujours su combien je pouvais compter sur eux.

Dans les derniers temps, mon cœur s'est remis à battre, merci à mon ange barjavelien de tout simplement exister, sans toi ma vie manquerait de saveur et de couleur. Marc, the sun rises and sets with you...





*Cette thèse est dédiée à Mathias, Bianca, Anaïs et Émile mes quatre petits bout'chous nés pendant ma thèse, qui me font croire qu'il existe plein de spermatozoïdes performants et que la Nature, même si elle a dévoilé aux scientifiques une grande part de ses mystères, restera toujours pour moi une source d'émerveillement.*

Cherchons comme cherchent ceux qui doivent trouver et trouvons comme trouvent ceux qui doivent chercher encore. Car il est écrit : celui qui est arrivé au terme ne fait que commencer.



## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	v
Remerciements.....	vii
Liste des tableaux et figures.....	xv
Liste des abbréviations .....	xvii
Introduction.....	1
Chapitre 1 : La revue de la littérature.....	7
Section 1. Le système reproducteur mâle.....	9
1.1 Généralités.....	9
1.2 Le testicule.....	10
1.2.1 Structure.....	10
1.2.2 La spermatogenèse .....	11
1.2.3 Les spermatozoïdes .....	11
1.2.4 Régulation du fonctionnement des testicules.....	13
1.2.4.1 Action des androgènes .....	13
1.2.4.2 Action des autres hormones .....	15
1.2.5 La barrière hémato-testiculaire.....	16
1.3 Les canaux efférents.....	18
1.4 Les canaux déférents.....	18
1.5 Les vésicules séminales .....	19
Section 2. L'épididyme .....	20
2.1 Organisation structurelle de l'épididyme.....	20
2.1.1 Rôle de l'épithélium de l'épididyme .....	21
2.1.2 Composition de l'épithélium .....	22
2.1.2.1 Les cellules principales.....	22
2.1.2.2 Les cellules basales.....	22
2.1.2.3 Les cellules apicales .....	23
2.1.2.4 Les cellules étroites .....	23
2.1.2.5 Les cellules halos .....	23
2.1.2.6 Les cellules claires .....	24
2.1.3 Rôle de la lumière .....	24
2.1.4 Activité sécrétoire.....	24
2.1.4.1 Activité mérocrine et apocrine .....	25
2.1.4.2 Majeures protéines de sécrétion.....	25
2.1.5 Activité d'endocytose .....	28

2.2	Fonctions de l'épididyme.....	28
2.2.1	Maturation des spermatozoïdes.....	29
2.2.2	Acquisition de la motilité.....	29
2.2.3	Acquisition du pouvoir fécondant.....	30
2.2.4	Stockage des spermatozoïdes.....	31
2.3	Les jonctions cellulaires.....	32
2.3.1	Les jonctions adhérentes.....	33
2.3.1.1	Les cadhérines.....	34
2.3.1.2	Les caténines.....	35
2.3.1.3	Formation des jonctions adhérentes.....	37
2.3.1.4	Régulation des cadhérines et de l'adhésion cellulaire.....	38
2.3.1.5	Expression des protéines de jonctions adhérentes dans l'épididyme.....	39
2.3.2	Les jonctions lacunaires.....	41
2.3.2.1	Composition et formation.....	41
2.3.2.2	Les jonctions lacunaires dans l'épididyme.....	43
2.3.3	Les jonctions serrées.....	44
2.3.3.1	Les protéines transmembranaires.....	45
2.3.3.2	Les protéines cytoplasmiques.....	47
2.3.3.3	Mise en place et régulation.....	48
2.3.3.4	La barrière hémato-épididymaire.....	49
2.4	Régulation hormonale de l'épididyme.....	51
2.4.1	Régulation par les androgènes.....	51
2.4.1	Les autres facteurs de régulation.....	51
2.5	Les lignées cellulaires d'épididyme.....	53
Section 3. La prostate.....		55
3.1	Structure.....	55
3.2	Types cellulaires.....	56
3.3	Régulation hormonale.....	57
3.4	Prostate et interactions cellulaires.....	60
3.5	Barrière hémato-prostatique.....	60
3.6	Prostate et cancer.....	61
Section 4. Les contaminants environnementaux.....		63
4.1	Les perturbateurs endocriniens.....	63
4.2	Le tributylétain.....	65
4.2.1	Généralités.....	65
4.2.2	Utilisations et dispersion dans l'environnement.....	65
4.2.3	Métabolisation.....	66
4.2.4	Effets sur les organismes marins.....	66
4.2.5	Effets sur les mammifères.....	67
4.2.5.1	Effets généraux et Dose Journalière Acceptable.....	67
4.2.3.2	Effets sur le système reproducteur.....	68
4.2.3.3	Effets sur les barrières.....	69

4.2.3.4 Effets sur les hormones et leur régulation.....	69
Objectif de recherche.....	72
Chapitre 2 : Effets du TBT sur le développement du système reproducteur .....	75
Chapitre 3 : Effets du TBT sur la prostate ventrale.....	131
Chapitre 4 : Effets du TBT sur l'épididyme .....	179
Discussion – Conclusion.....	229
Références.....	241



## Liste des tableaux et figures

Figure 1 : Schéma du système reproducteur mâle et de ses principales composantes .....	9
Figure 2 : Schéma d'un spermatozoïde .....	12
Figure 3 : Représentation schématique des différentes régions de l'épididyme .....	21
Figure 4 : Représentation des différents types de jonctions entre deux cellules épithéliales .....	30
Figure 5 : Représentation d'une jonction adhérente.....	32
Figure 6 : Représentation d'une plaque jonctionnelle composée de jonctions lacunaires	38
Figure 7 : Représentation d'une jonction serrée.....	40
Tableau 1 : Liste des perturbateurs endocriniens et de leurs effets.....	59





## Liste des abréviations

$\alpha$	alpha
$\alpha$ -cat	alpha-caténine
ABP	<i>androgen binding protein</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
al.	collaborateurs
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AR	récepteur aux androgènes
ARN(m)	acide ribonucléique (messenger)
ATP	adénosine triphosphate
$\beta$	béta
$\beta$ -cat	béta-caténine
C	celsius
Ca <sup>2+</sup>	calcium
Cldn	claudine
COX	cyclooxygenase
CRISP	protéine de sécrétion riche en cystéines
CTP	protéine de liaison au cholestérol
Cx	connexine
Cyt	cytochrome
Da	dalton
DHT	dihydrotestostérone
DJA	dose journalière acceptable
E-Cad	E-cadhérine
EPEI	<i>ethoxylated polyethylenimine</i>
ER	récepteur aux œstrogènes
E-RABP	protéine épидидymaire qui se lie à l'acide rétinoïque
Fig.	figure
FSH	hormone folliculo stimuline
$\gamma$	gamma
$\gamma$ -cat	gamma-caténine
g	gramme
GnRH	hormone gonado-libérine
HE-1	<i>Human epididymal protein-1</i>
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
k	kilo
KO	knock-out
LH	hormone lutéinisante
LRP	<i>low-density-lipoprotein receptor related protein</i>
m	milli
M	molaire
MAGI	<i>membrane associated guanylate kinase</i>
MAGUK	<i>membrane-associated guanylate kinase</i>
MOs	Morpholinos
MT	métallothionéine

MUPP1	<i>multi PDZ domain protein-1</i>
n	nano
NPC2	protéine Niemann-Pick de Type C
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p120 <sup>ctn</sup>	p120-caténine
PKC	protéine kinase C
PP	protéine phosphatase
PTU	6-propyl-2-thiouracile
s	seconde
SGP-2	<i>Sulfated glycoprotein-2</i>
T <sub>3</sub>	triiodothyronine
T <sub>4</sub>	thyroxine
TR	recepteur pour les hormones de la thyroïde
TRH	thyroïdolibérine
TSH	thyroïdostimuline
μ	micro
ZO-1	<i>zonula occludens-1</i>





## Introduction

Depuis plusieurs décennies, une baisse de la qualité des spermatozoïdes, ainsi qu'une baisse de leurs comptes d'environ 40% a été observée (Carlsen *et al.*, 1992 ; Keiding *et al.*, 1994), de même qu'une augmentation de 2 à 4 % de l'incidence des cancers du testicule (Toppari *et al.*, 1996) menant à une détérioration de la fonction reproductrice masculine. Certaines des causes de l'infertilité sont connues, mais 15% des cas au Canada demeurent inexplicables (Iammarrone *et al.*, 2003 ; Sinawat, 2000). L'hypothèse a été avancée, au sein des milieux scientifiques que l'exposition à des contaminants environnementaux et notamment à ceux de type "perturbateur endocrinien" pourrait être en cause (Sharpe, 2000 ; Lombardo *et al.*, 2005). Ces produits, lorsqu'ils se retrouvent dans l'organisme miment les hormones et induisent alors des réponses anormales (Nilsson, 2000 ; Thibaut et Porte, 2004).

Le tributylétain (TBT) appartient au groupe de produits qualifiés de "perturbateurs endocriniens" (OMS, 1990). Il a été démontré depuis longtemps, qu'à la suite à son utilisation dans les peintures pour coques de bateaux, ce produit était abondamment présent dans l'environnement marin (Fent, 1996 ; Vos *et al.*, 2000). Comme ce produit est rémanent et bioaccumulable, malgré son interdiction d'utilisation sur les bateaux de moins de 15 mètres depuis 1991, il est encore très présent dans l'environnement au Canada (Vigilino *et al.*, 2004) ainsi que dans les produits de la mer destinés à la consommation (Forsyth et Casey, 2003). Chez les mollusques, des études ont montré qu'il était capable d'induire une masculinisation des femelles (Bailey et Davis, 1988 ; Siah *et al.*, 2003). Mais le TBT a également des effets toxiques chez les mammifères (Boyer, 1989). Ainsi, des études ont déjà mis en évidence son effet sur les portées de rats suite à une exposition *in utero* ou même des effets sur les spermatozoïdes suite à une exposition durant la puberté. Cependant, peu d'études portent sur les effets à long terme d'une exposition *in utero*.

Notre objectif était d'évaluer les effets à long terme d'une exposition *in utero* à différentes doses de tributylétain (TBT). Ainsi des rats femelles gravides ont été exposées durant la période de leur gestation à 4 doses de TBT : 0 ; 2,5 ; 10 et 20 mg/kg. Lors de leur naissance, les nouveau-nés mâles étaient gardés, et étaient seulement sacrifiés une fois

atteint l'âge de 91 jours, déterminé comme étant celui de la maturité sexuelle. En effet, à cet âge, chez le rat, plusieurs cycles de spermatogenèse ont déjà eu lieu (Johnson *et al.*, 1999a).

Dans un premier temps nous avons voulu évaluer l'effet de cette exposition *in utero* au TBT sur le poids de différents organes du tractus reproducteur mâle, soit les testicules, l'épididyme, la prostate ventrale ainsi que les vésicules séminales. Ces deux dernières sont des glandes accessoires dont la croissance est dépendante du niveau d'androgènes circulants (Gonzales, 1994 ; Kwong *et al.*, 1999). En conséquence, cela pourrait nous donner une idée sur les effets du TBT sur les organes androgène-dépendants. Dans cette même partie, les effets du TBT sur les spermatozoïdes seront également étudiés. Pour ce faire, nous effectuerons une analyse des spermatozoïdes assistée par ordinateur (ou CASA pour *Computer Assisted Sperm Analysis*) (Amann et Katz, 2004). Elle permet d'évaluer différents paramètres caractéristiques des spermatozoïdes, tels que leur vitesse, leur linéarité de progression ou leur concentration. Cette étude constituera le chapitre 2 de cette thèse.

Les spermatozoïdes durant leur formation dans les tubules séminifères des testicules, puis ensuite durant leur transport dans le canal de l'épididyme, sont protégés par des barrières appelées barrière hémato-testiculaire et barrière hémato-épididymaire (Toyama *et al.*, 2003 ; Hoffer et Hinton, 1984) . Elles servent à protéger les spermatozoïdes d'une attaque immunitaire et également à former dans la lumière un microenvironnement spécifique, qui est indispensable pour la formation et la maturation des spermatozoïdes (Robaire *et al.*, 2006). Ces barrières sont formées par un type de jonctions intercellulaires appelées les jonctions serrées. Il existe également dans le complexe jonctionnel deux autres types de jonctions indispensables : les jonctions lacunaires et les jonctions adhérentes. Les premières servent à la communication intercellulaire, tandis que les secondes servent à assurer la cohésion entre deux cellules adjacentes. Les jonctions adhérentes, sont particulièrement essentielles, puisque, formant l'adhésion cellulaire, elles sont un pré requis à la mise en place des autres types de jonctions (Cyr *et al.*, 1995 ; Cyr *et al.*, 2002 ; Pointis *et al.*, 2005).

Les jonctions serrées sont constituées à la fois de protéines transmembranaires, représentées par la famille des claudines et l'occludine (Furuse *et al.*, 1993 ; Morita *et al.*,

1999), et de protéines cytoplasmiques tels que la famille de *zonula-occludens*, qui créent un lien avec le cytosquelette de la cellule.

Les jonctions adhérentes sont quant à elles notamment constituées d'une famille de protéines appelées cadhérines (Yap *et al.*, 1997), et sont elles aussi reliées au cytosquelette par le biais d'une autre famille de protéines appelées les caténines (Potter *et al.*, 1999).

Enfin, les jonctions lacunaires sont formées par la famille des protéines connexines (Beyer *et al.*, 1987; Bruzzone *et al.*, 1996).

Nous avons donc poursuivi nos expérimentations en étudiant dans des rats mâles adultes exposés *in utero* au TBT, les effets de ce dernier sur le complexe jonctionnel dans la prostate ventrale, ainsi que dans l'épididyme. Ces deux études constitueront les chapitres 3 et 4 de cette thèse.

De plus, les expérimentations *in vivo* comportent beaucoup de limitations de part leur exécution, l'utilisation d'animaux et la longueur des expériences. Ainsi nous avons choisi de procéder également à des expériences *in vitro* à l'aide d'une lignée cellulaire d'épididyme nouvellement développée dans le laboratoire (Dufresne *et al.*, 2005), pour d'une part vérifier si les effets du TBT étaient les mêmes *in vivo* et *in vitro*. D'autre part, pour étudier les interactions entre les différents acteurs du complexe jonctionnel et notamment entre les différentes claudines qui composent la barrière hémato-épididymaire. Les résultats de ces expériences sont inclus dans le chapitre 4 de cette thèse.









## Chapitre 1 : Revue de la littérature



## Section 1. Le système reproducteur mâle

### 1.1 Généralités

Le système reproducteur mâle est un système complexe, qui comprend les gonades (les testicules), un système de canaux (les canaux efférents, les épидидymes, les canaux déférents, l'ampoule urétrale, les conduits éjaculateurs et l'urètre) et enfin les glandes accessoires (les vésicules séminales, la prostate et les glandes de Cowper) (Fig. 1). C'est au sein de ce tractus que sont formés les gamètes mâles matures (Setchell et Brooks, 1988 ; Johnson *et al.*, 1999a). Les spermatozoïdes sont produits lors de la spermatogénèse dans les testicules, puis c'est au cours de leur transit dans le canal épидидymaire qu'ils vont acquérir leur motilité et leur pouvoir fécondant (Johnson *et al.*, 1999a). Les spermatozoïdes vont ensuite passer au travers du canal déférent jusqu'à l'ampoule urétrale afin d'être mélangés aux sécrétions des vésicules séminales et de la prostate. L'ensemble sera ensuite expulsé au travers de l'urètre lors de l'éjaculation (Millette, 1999). Chez l'humain, environ 100 millions de nouveaux spermatozoïdes sont produits chaque jour (Amann, 1981). La fonction reproductrice mâle est dépendante des productions neuro-endocrines de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Roberts et Zirkin, 1991 ; McLachlan *et al.*, 1996).

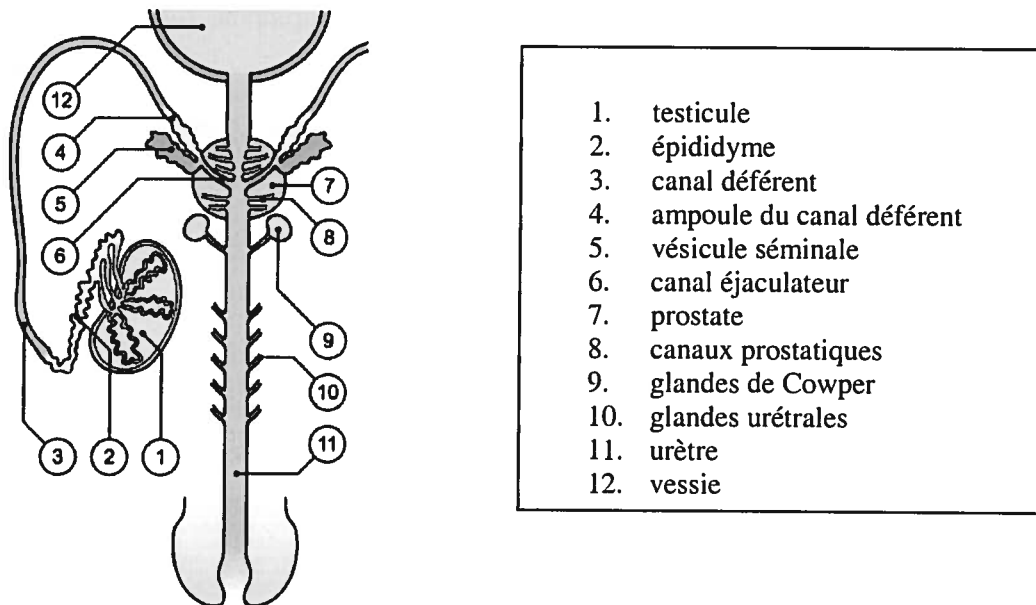


Figure 1 : Schéma du système reproducteur mâle et de ses principales composantes

D'après [www.embryology.ch](http://www.embryology.ch)

## 1.2 Le testicule

### 1.2.1 Structure

Chez plusieurs mammifères, le testicule se développe à l'intérieur de la cavité péritonéale pour migrer ensuite à l'extérieur du corps, dans un sac cutané appelé scrotum. Le testicule est divisé en une série de compartiments internes, les lobules, qui contiennent de nombreux tubules séminifères (Johnson *et al.*, 1999b). Ces derniers sont de longs tubules épithéliaux et circonvolués qui reposent sur une membrane basale et sont le lieu de la spermatogenèse. L'épithélium des tubules séminifères comporte deux types cellulaires : les cellules germinales, ou gonocytes, et les cellules somatiques, ou cellules de Sertoli, qui sont isolées par une membrane basale (Griswold, 1995). À la puberté, en réponse à des stimuli hormonaux, les cellules germinales prolifèrent et entament le processus de spermatogenèse. La paroi des tubules séminifères comprend alors plusieurs assises avec, à la base, les cellules les plus immatures, les spermatogonies, et, allant vers l'apex, des cellules de plus en plus différenciées (Johnson *et al.*, 1999b). Dispersées parmi ces cellules germinales et beaucoup moins nombreuses qu'elles, les cellules de Sertoli servent de support et de plus, sécrètent un fluide rejeté avec les spermatozoïdes dans la lumière des tubules séminifères.

Les tubules séminifères sont entourés de cellules contractiles, les cellules myoïdes ou périlitubulaires (Johnson *et al.*, 1999b), contenant dans leur cytoplasme des filaments d'actine et de myosine. Leur action facilite le largage des spermatozoïdes et de leur véhicule liquide dans la lumière du tubule ainsi que leur progression vers la sortie du testicule. Le tissu conjonctif du testicule, peu abondant est localisé entre les tubules séminifères. Dans le tissu conjonctif se retrouvent des cellules endocrines dotées de gouttelettes lipidiques, les cellules interstitielles, ou cellules de Leydig. Ces cellules sécrètent des androgènes, dont la testostérone, sous le contrôle de l'hormone lutéinisante (LH pour *luteinizing hormone*) hypophysaire (Saez, 1994 ; Mendis-Handagama, 1997). À la sortie du testicule, les tubules séminifères deviennent droits afin de former le *rete testis* et leur paroi mince ne comprend plus que des cellules de Sertoli. Par la suite, plusieurs tubules se réunissent pour former une quinzaine de tubules efférents qui quittent le testicule.

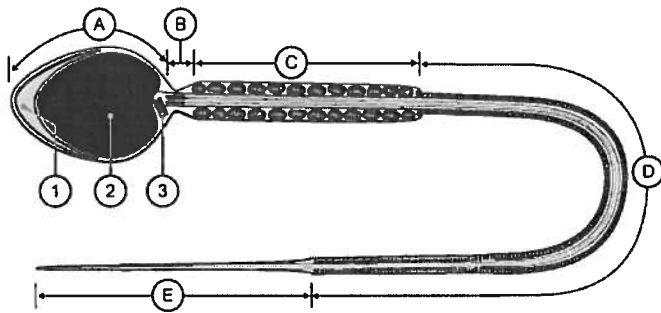
### 1.2.2 La spermatogenèse

La spermatogenèse, ou formation des spermatozoïdes, se déroule au sein des tubules séminifères (Holstein *et al.*, 2003). Elle s'effectue à partir de cellules souches, les spermatogonies, qui se multiplient par simple division mitotique. Les spermatogonies se transforment ensuite en spermatocytes I qui vont subir la mitose réductionnelle de la méiose pour donner les spermatocytes II. Ces spermatocytes II vont donner les spermatides après avoir subi la mitose équationnelle. Les spermatides, qui sont en réalité des spermatozoïdes immatures, vont subir une phase de maturation appelée spermiogénèse, pour donner naissance aux spermatozoïdes. Cette dernière phase permet au spermatozoïde d'acquérir les outils nécessaires à la fécondation. La spermatogenèse débute à la puberté et est permanente. Le processus de formation des cellules germinales peut être divisé en 14 différents stades (De Krester et Kerr, 1994). Toutes les cellules de la lignée germinale ne complètent pas la maturation ; plusieurs dégèrent et sont phagocytées par les cellules de Sertoli (Guraya, 1980).

Il faut environ 58 jours, chez le rat pour qu'une spermatogonie se différencie et donne naissance à 256 spermatozoïdes, tandis que chez les humains cette durée est de 76 jours (De Krester et Kerr, 1994 ; Johnson *et al.*, 1999a).

### 1.2.3 Les spermatozoïdes

Les spermatozoïdes, ont pour but d'amener les chromosomes paternels à l'intérieur de l'ovocyte. Ils sont formés de deux parties (Fig. 2), la tête composée du noyau (contenant les chromosomes) et de l'acrosome (sac contenant les enzymes nécessaires pour franchir la zone pellucide), et le flagelle qui est l'organe de propulsion du spermatozoïde (Millette, 1999).



- |    |                     |
|----|---------------------|
| 1. | acrosome            |
| 2. | noyau               |
| 3. | centriole           |
| A. | Tête                |
| B. | Cou                 |
| C. | Pièce intermédiaire |
| D. | et E. Flagelle      |

Figure 2 : Schéma d'un spermatozoïde  
D'après [www.embryology.ch](http://www.embryology.ch)

Le spermatozoïde est entièrement recouvert d'une membrane plasmique qui est constituée d'une mosaïque de lipides, de cholestérol et de protéines (Eddy et O'Brien, 1994). La membrane plasmique assure l'intégrité de la cellule et va permettre de la protéger de son environnement.

La tête du spermatozoïde sert à véhiculer l'information génétique. Le noyau et l'acrosome sont entourés de composantes cytosquelettiques ainsi que de cytoplasme. Le noyau, qui est situé dans la partie postérieure de la tête va s'allonger lors de la spermiogénèse pour conférer à la tête sa forme, qui est spécifique à chaque espèce. La chromatine y est très condensée, et l'enveloppe nucléaire est dépourvue de pores (Millette, 1999). L'acrosome, qui dérive de l'appareil de Golgi, est situé dans la partie antérieure de la tête. Cette organelle va jouer un rôle primordial dans le processus de la fécondation. En effet, l'acrosome contient des enzymes qui vont permettre de traverser la zone pellucide de l'ovocyte (Baldi *et al.*, 2000).

Le flagelle est constitué du cou, de la pièce intermédiaire, de la pièce principale et de la pièce terminale. Le cou est situé à la base du flagelle et constitue la jonction entre la tête et la pièce intermédiaire. C'est au niveau du cou que va être formé l'axonème au moment de la spermiogénèse (Sathananthan *et al.*, 2001). L'axonème est composé de tubuline et de deux microtubules centraux. C'est la composante contractile de la queue du spermatozoïde, elle possède une activité ATPase qui est nécessaire à la motilité du flagelle (Oko et Clermont, 1999). La pièce intermédiaire est très riche en mitochondries qui vont fournir l'énergie nécessaire au mouvement du spermatozoïde (Tanaka et Baba, 2005).



Les spermatozoïdes, après leur formation, sont libérés à l'intérieur des tubules séminifères et ensuite vont passer dans l'épididyme où ils vont terminer leur maturation et y être stockés (Robaire *et al.*, 2006).

#### 1.2.4 Régulation du fonctionnement des testicules

Les testicules sont sous le contrôle des hormones hypophysaires folliculo stimuline (FSH pour *Follicle stimulating hormone*) et hormone lutéinisante (LH pour *Luteinizing hormone*) qui vont stimuler la spermatogenèse et la synthèse des androgènes (Holdcraft et Braun, 2004). L'ensemble de ces messagers hormonaux est nécessaire, non seulement pour la régulation de la production des cellules germinales, mais aussi pour la prolifération et le fonctionnement des cellules somatiques, qui sont indispensables au testicule (McLachlan *et al.*, 2002). L'axe hypothalamus-adénohypophyse agit en deux temps pour réguler les hormones dans le testicule. Dans un premier temps, l'hypothalamus stimule, grâce à la gonado-libérine (GnRH), l'adénohypophyse qui, par la suite, va répondre à cette stimulation en libérant la FSH et la LH (Singh *et al.*, 1996 ; Heckert et Griswold, 2002).

##### 1.2.4.1 Action des androgènes

La LH agit sur les cellules de Leydig dans le testicule pour qu'elles sécrètent les androgènes testiculaires, principalement la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT). Les androgènes vont être synthétisés à partir du cholestérol (Miller, 1988 ; Stocco, 1999). La testostérone et la DHT vont mener leur action via une liaison au récepteur aux androgènes (AR pour *Androgen receptor*). La DHT est un androgène plus puissant que la testostérone, puisqu'elle a une beaucoup plus grande affinité pour le récepteur AR que la testostérone (Carlson et Katzenellenbogen, 1990). Elle va être formée à partir de la testostérone à l'aide de l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase. Ainsi, il était possible d'induire une virilisation de souris mâles en leur administrant de la DHT, alors qu'elles ne possédaient pas l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase. Cependant, leur tractus reproducteur était bien différencié, même si il était sous-développé. La testostérone est donc capable d'induire seule la différenciation du tractus reproducteur et la DHT, sert à amplifier largement le mécanisme (Mahendroo *et al.*, 2001). La testostérone est responsable (avec les hormones corticosurrénales) du déclenchement de la puberté, et donc du déclenchement de la maturation des spermatozoïdes. En effet, il est possible de rétablir l'initiation de la

spermatogenèse en injectant de la testostérone chez des animaux déficients en GnRH (Singh *et al.*, 1995). La testostérone va agir localement sur les cellules de Sertoli afin de déclencher la stimulation de la spermatogenèse, elle va aussi permettre la différenciation, la croissance et le fonctionnement des organes reproducteurs. De plus, la testostérone exerce un rétrocontrôle inhibiteur sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse. Ce rétrocontrôle négatif régule à la baisse la sécrétion hypothalamique de GnRH ce qui conduit à une réduction de la libération de FSH et LH. Mais en plus, la testostérone inhibe directement la libération de LH par l'adénohypophyse (DeKretser et McFarlane, 1996).

Le développement ainsi que le fonctionnement des cellules de Leydig est en partie contrôlé par les cellules de Sertoli. En effet, des études sur des souris déficientes pour l'AR (ARKO pour *Androgen receptor Knock-Out*) ou pour l'AR spécifiquement dans les cellules de Sertoli (SCARKO pour *Sertoli cells androgen receptor knock-out*), montrent une diminution du nombre de cellules de Leydig. Par contre, les niveaux de LH étaient huit fois plus élevés dans les souris ARKO, comparativement aux souris SCARKO et aux contrôles (De Gendt *et al.*, 2005). Arrivée aux testicules, la FSH a pour cible les cellules de Sertoli et va contrôler leur prolifération. En effet, la FSH va provoquer la synthèse dans les cellules de Sertoli d'une protéine liant la testostérone, l'ABP (pour *androgen binding protein*) (Danzo *et al.*, 1990). De cette façon, la testostérone peut être transportée par les cellules de Sertoli dans la zone luminale et y être concentrée. Ainsi, la FSH joue un rôle déterminant dans la spermatogenèse (Rannikki *et al.*, 1995). Des études génétiques et pharmacologiques chez les rongeurs ont confirmé que le rôle premier de la FSH était la stimulation de la prolifération des cellules de Sertoli durant le développement pubertaire (Heckert et Griswold, 2002). De plus, lors d'expériences de mutations de la FSH murine, il a été démontré que ces mutations menaient à une baisse considérable de la taille des testicules et du nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme, bien que ces mâles ne soit pas infertiles (Kumar *et al.*, 1997; Dierich *et al.*, 1998). Mais, les cellules de Sertoli vont également être contrôlées par les androgènes. En effet, les cellules germinales ne possèdent pas de récepteur aux androgènes. Des études de mutations du récepteur aux androgènes spécifiquement dans les cellules de Sertoli mènent à un arrêt de la spermatogenèse au stade de la méiose (De Gendt *et al.*, 2004).

Ainsi, les cellules germinales sont contrôlées par les androgènes mais indirectement, par le biais des cellules de Sertoli.

La testostérone n'affecte pas la synthèse FSH, c'est une autre hormone sexuelle, l'inhibine produite par les cellules de Sertoli, qui freine la sécrétion hypophysaire de FSH (Holdcraft et Braun, 2004).

#### 1.2.4.2 Action des autres hormones

En plus de la testostérone, les cellules de Leydig synthétisent également des œstrogènes. Cependant, il est à noter que chez les animaux prépubères ce sont les cellules de Sertoli qui sont responsables de cette synthèse (Bourguiba *et al.*, 2003). L'action des œstrogènes se fait via leur liaison à un récepteur. Il existe deux sous-types du récepteur aux œstrogènes (ER pour *Estrogen receptor*) : ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Des études avaient montré que chez des souris mâles déficientes pour le récepteur ER $\alpha$ , on observait une baisse très importante de spermatozoïdes dans l'épididyme, ainsi qu'une réduction de la fertilité. Un rôle des œstrogènes dans la spermatogenèse était donc suspecté (Lubahn *et al.*, 1993). Cependant, il a maintenant été clairement démontré que le principal rôle de ER $\alpha$  est de réguler la réabsorption du fluide luminal dans le *rete testis* et les canaux efférents (Hess *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000). Tandis que des mâles déficients pour ER $\beta$  sont eux fertiles et leurs testicules ne sont pas affectés (Krege *et al.*, 1998). L'aromatase, qui est l'enzyme terminale impliquée dans la conversion des androgènes en œstrogènes, est présente dans les testicules de mammifères. D'abord dans les cellules de Sertoli puis après la puberté dans les cellules de Leydig. De plus, l'aromatase est régulée par la gonadotropine. Cette enzyme joue un rôle dans le développement, la reproduction, ainsi que dans la différenciation sexuelle et comportementale (Abney, 1999).

Les hormones thyroïdiennes, soit la thyroxine (T<sub>4</sub>) et la triiodothyronine (T<sub>3</sub>) sont également impliquées dans le développement du testicule. En effet, le récepteur nucléaire pour les hormones de la thyroïde (TR) est présent dans les cellules de Sertoli à d'importantes concentrations au moment du développement. Le récepteur TR est également présent dans l'animal adulte mais en proportion moindre (Buzzard *et al.*, 2000 ; Canale *et al.*, 2001). La thyroïdolibérine (TRH) est l'hormone hypothalamique qui va pousser l'antéhypophyse à produire la thyrotropine (TSH). Cette dernière va stimuler la

production des hormones thyroïdiennes. Récemment, il a été démontré que la TRH et son récepteur étaient exclusivement présents dans les cellules de Leydig (Mendis-Handagama et Ariyaratne, 2004). Il a de plus été démontré que chez les rats souffrant d'hypothyroïdisme néonatal, soit un niveau anormalement bas d'hormones thyroïdiennes, la spermatogenèse était anormale. Également, chez des animaux chez lesquels un hypothyroïdisme avait été induit à l'aide du PTU (un inhibiteur des hormones de la thyroïde), la taille des testicules étaient augmentée et il y avait une augmentation de près de 84% du nombre de cellules de Sertoli (Van Haaster *et al.*, 1992 ; Maran et Aruldas, 2002). Ainsi, la T<sub>3</sub> contrôle le développement et la différenciation des cellules de Sertoli et cette régulation est menée par un des isoformes du TR, le TR $\alpha$ , tel que démontré par des études de knock-out (Holsberger *et al.*, 2005).

#### 1.2.5 La barrière hémato-testiculaire

La barrière hémato-testiculaire est formée, contrairement à la barrière hémato-cervicale, après la naissance de l'individu. Elle est constituée en partie de jonctions cellulaires appelées les jonctions serrées (Pelletier et Byers, 1992). La première étude de la barrière hémato-testiculaire a été faite par Dym et Fawcett (1970). Ils ont établi la formation d'une barrière entre les cellules de Sertoli. Chez l'humain, elle a été déterminée comme devenant fonctionnelle entre l'âge de 11 et 14 ans. Bergmann et Dierichs (1983) ont mis en évidence que la mise en place de la barrière est progressive, à savoir, elle est stade-dépendante. Ainsi, une barrière totalement mature n'est effective que plusieurs jours après son initiation, et serait synchronisée avec l'élargissement de la lumière des tubules. Contrairement à la barrière hémato-cervicale ou la barrière hémato-épididymaire, qui sont composées uniquement de jonctions serrées et où les jonctions adhérentes sont situées en dessous, la barrière hémato-testiculaire consiste en une coexistence entre les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (Pelletier et Byers, 1992 ; Toyama *et al.*, 2003). La barrière hémato-testiculaire est une structure très dynamique puisqu'elle doit se désassembler afin de laisser passer les cellules germinales (Cheng et Mruk, 2002 ; Wong *et al.*, 2004). La fermeture des jonctions est concomitante avec l'apparition et le début de la différenciation des premiers spermatocytes, qui se produisent chez les rongeurs entre 15 et 20 jours après la naissance (Bergmann et Dierichs, 1989). Chez le rat, la barrière hémato-testiculaire commence à se former vers le

douzième jour postnatal et elle deviendra totalement étanche entre les jours dix-huit à vingt (Russel *et al.*, 1989). Cette barrière étanche s'oppose au passage du sang vers l'intérieur du tube séminifère. Elle empêche la reconnaissance par le système immunitaire de l'organisme des protéines de surface spécifiques qui sont sur la cellule germinale (Russell et Peterson, 1985). Elle permet également de faire une sélection des molécules qui vont transiter entre le compartiment sanguin et la lumière des tubules séminifères. Par contre, si les jonctions serrées sont absentes lors de la naissance, il y a une présence importante de cellules lacunaires. En effet, ces dernières servent à la communication intercellulaire qui est indispensable durant le développement du système reproducteur.

#### 1.2.6 Analyse de sperme

La motilité des spermatozoïdes est indispensable pour qu'ils atteignent l'ovocyte. Ainsi, il existe une méthode appelée CASA (*Computer-assisted sperm analysis*) qui permet une analyse de la motilité des spermatozoïdes assistée par ordinateur. Cette méthode est approuvée par l'OMS et a été utilisée par la première fois en 1987 par Working et Hurtt.

L'analyse des spermatozoïdes se fait grâce à un système optique composé d'une source de lumière, d'un microscope et d'une caméra vidéo qui digitalise les images. Ce système d'analyse vidéo micrographique assistée par ordinateur permet une mesure automatique objective. Son principe est basé sur l'étude des trajectoires de la tête du gamète qui sont un bon reflet de l'activité flagellaire. Après acquisition (enregistrement avec une fréquence de l'ordre de 40 hertz) et mémorisation des images des têtes spermatiques, les données sont analysées par un logiciel spécifique à chaque système. L'étude d'une trajectoire peut se faire de façon précise à partir de 30 points (Grizard et Jimenez, 1997).

À partir de spermatozoïdes provenant de la queue de l'épididyme, cette méthode va permettre d'analyser différents paramètres, tels que :

- la concentration des spermatozoïdes (en millions/ml) permettant d'évaluer s'il y a dans l'échantillon un nombre suffisant de spermatozoïdes ;
- la motilité des spermatozoïdes, ils sont alors classés en 4 catégories : les statiques, les progressifs lents, les progressifs moyens et les progressifs rapides ;

- leur vitesse de progression (en  $\mu\text{m/s}$ ) soit de façon instantanée (VAP pour *Average Path Velocity*), soit la vitesse de déplacement d'un point à un autre (VSL pour *Straight Line Velocity*), soit la vitesse sur la trajectoire réelle (VCL pour *Curvilinear Velocity*) ;
- un index de linéarité de la progression (en % =  $\text{VSL/VCL}$ ) ;
- l'amplitude des mouvements de la tête du spermatozoïde (en  $\mu\text{m}$ ) ;
- la fréquence de battement du flagelle (Hz) (Perreault *et al.*, 2001).

Des normes ont donc été établies par l'OMS pour ces différents paramètres afin de définir des seuils, gage de spermatozoïdes potentiellement fertiles et suffisamment mobiles.

Ce type d'analyse est utilisé dans des études de toxicologie pour vérifier si les différents paramètres, qui sont caractéristiques pour une espèce, sont affectés par une exposition à des xénobiotiques (Horimoto *et al.*, 2000).

### 1.3 Les canaux efférents

A la sortie du *rete testis*, les spermatozoïdes transitent dans les canaux efférents avant de pénétrer dans l'épididyme (Robaire et Hermo, 1988 ; Johnson *et al.*, 1999). Leur nombre et leur longueur varient en fonction des espèces. Durant ce trajet, une réabsorption importante du liquide luminal s'effectue, ce qui va permettre une importante concentration des spermatozoïdes avant qu'ils ne pénètrent dans l'épididyme (Hess, 2002).

### 1.4 Les canaux déférents

Les canaux déférents remontent dans la cavité abdominale jusque vers la vessie urinaire, ils sont le prolongement de l'épididyme. En traversant la cavité abdominale, ils s'associent à des artères, veines et nerfs, formant ensemble le cordon spermatique. Ils sont composés d'un épithélium complexe, qui possède des capacités sécrétrices et absorbantes. Un canal déférent transporte le liquide spermatique aux glandes qui, par leurs sécrétions, permettent aux spermatozoïdes d'achever la maturation biochimique nécessaire en vue de la fécondation. Il occupe dans la cavité pelvienne une position postérieure à la vessie urinaire. À ce niveau se localise une glande paire, dérivée d'excroissances épithéliales du canal déférent : la vésicule séminale (Johnson *et al.*, 1999a).

## 1.5 Les vésicules séminales

La taille, la forme et la fonction des vésicules séminales varient avec l'âge et la condition hormonale de l'animal. Chaque vésicule consiste en un tube replié sur lui-même à quelques reprises et dont la paroi comprend muqueuse, musculaire et *adventitia*. L'épithélium de la muqueuse est simple, cylindrique. Il ne contient pas de cellules ciliées, mais des cellules qui sécrètent un produit jaunâtre, nutritif pour les spermatozoïdes. Chez l'homme la sécrétion des vésicules séminales constitue environ 60% du volume du liquide séminal (Gonzales, 1989).

Chaque vésicule séminale possède un canal excréteur qui ne se jette pas dans le canal déférent, mais poursuit plutôt une trajectoire parallèle, les deux formant ensemble le "canal éjaculateur". Les canaux excréteurs et canaux déférents des deux côtés se jettent ensemble dans l'urètre, unique, dès son émergence de la vessie urinaire. À partir de ce point, l'urètre sert tant de canal urinaire que de canal génital (Gonzales, 2001). Le poids des vésicules séminales ainsi que son activité sécrétoire sont dépendants du niveau d'androgènes circulants. En effet, des rats dont on augmentait les niveaux sériques de testostérone ou qui étaient traités avec des androgènes voyaient l'activité sécrétoire de leurs vésicules séminales grandement augmentée (Higgins *et al.*, 1978 ; Gonzales, 1994).

## Section 2. L'épididyme

Lorsqu'ils sortent du testicule, les spermatozoïdes des mammifères n'ont pas encore la capacité de se déplacer ni celle de féconder l'ovule. Les spermatozoïdes acquièrent ces différentes qualités lors de leur séjour dans l'épididyme (Bedford, 1973 ; Yeung et Cooper, 2002 ; Cuasnicu *et al.*, 2002 ; Gatti, 2004). L'épididyme est un long canal replié sur lui-même, qui est composé de deux compartiments : un épithélium et une lumière (Cooper, 1999). Le canal de l'épididyme quitte ensuite l'épididyme sous le nom de canal déférent (Robaire *et al.*, 2006). Les spermatozoïdes ne sont pas reconnus comme faisant parti du soi, et vont donc être protégés d'une attaque du système immunitaire par la barrière hémato-épididymaire (Hoffer et Hinton, 1984 ; Cyr *et al.*, 2002). Les spermatozoïdes peuvent séjourner dans l'épididyme pendant plusieurs mois, après quoi ils sont phagocytés par les cellules épithéliales de l'épididyme (Jones, 2004). L'équipe de Sutovsky (2001) avait montré qu'il semblait exister, au sein de l'épididyme, un contrôle de qualité des spermatozoïdes et que ceux qui étaient imparfaits étaient dégradés. Cependant cette hypothèse est controversée (Cooper *et al.*, 2002). En fait, même si ces allégations demanderaient plus d'approfondissements, il semblerait qu'il existe un équilibre entre les signaux de survie et ceux de destruction des spermatozoïdes. Ils seraient, de plus, régulés par les androgènes (Jones, 2004). La protection des spermatozoïdes est aussi faite via la sécrétion d'une fraction immunosuppressive, contenue dans le fluide provenant des cellules épithéliales des vésicules séminales et de la prostate (Dostal *et al.*, 1997).

### 2.1 Organisation structurelle de l'épididyme

L'épididyme est généralement divisé en quatre régions distinctes (Figure 3) : le segment initial, la tête (*caput*), le corps (*corpus*), et la queue (*cauda*) qui ont chacune un rôle bien spécifique. En effet, chacune de ces régions possède des types cellulaires distincts, et dont l'abondance varie en fonction de la région. De plus, l'épaisseur de l'épithélium, les propriétés d'absorption et la sécrétion des différentes protéines sont également fonction de la région (Herme et Robaire, 2002).



Le microenvironnement luminal de chaque région de l'épididyme contient des facteurs spécifiques qui sont nécessaires pour la maturation des spermatozoïdes (Robaire et Viger, 1995 ; Turner, 2002 ; Wong *et al.*, 2002). La motilité du sperme serait acquise dans la tête, le pouvoir fécondant dans le corps tandis que le stockage des spermatozoïdes se fait dans la queue (Hinton, 1995; Turner, 1995; Hermo et Robaire, 2002).

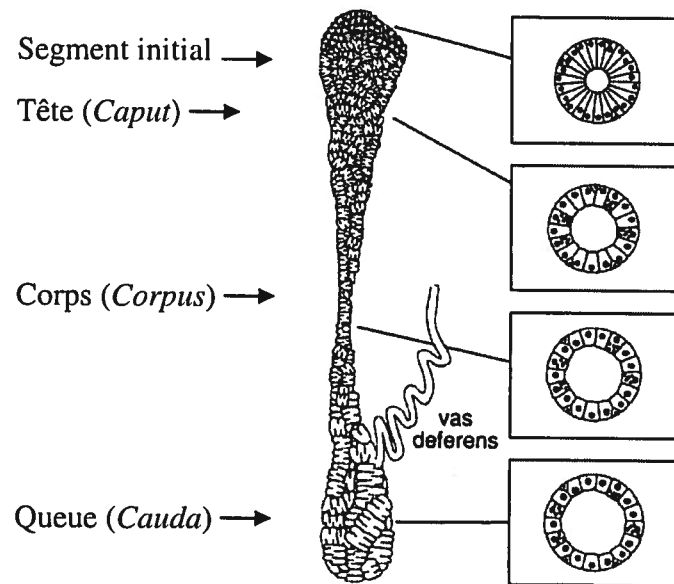


Figure 3 : Représentation schématique des différentes régions de l'épididyme (Hinton, 1998)

### 2.1.1 Rôle de l'épithélium de l'épididyme

L'épithélium de l'épididyme joue un rôle essentiel dans la composition du liquide séminal. En effet, il est responsable de l'absorption d'un large volume de liquide et de molécules provenant du testicule, ce qui permet d'augmenter la concentration de spermatozoïdes lors de leur entrée dans l'épididyme (Robaire et Viger, 1995). De plus, l'épithélium de l'épididyme secrète dans la lumière des ions, des protéines et autres petites molécules synthétisées par les cellules principales de l'épididyme (Turner, 1991 ; Hermo *et al.*, 1994). Ces deux propriétés vont permettre de créer l'environnement luminal spécifique nécessaire à la maturation des spermatozoïdes (Wong *et al.*, 2002). C'est également dans l'épithélium de l'épididyme que va avoir lieu la conversion de la testostérone en DHT (Cooke et Robaire, 1987).

### 2.1.2 Composition de l'épithélium

Six types cellulaires sont présents dans l'épididyme de rat adulte : Les cellules principales, basales, apicales, étroites, halos et claires (Reid et Cleland, 1957 ; Hermo et Robaire, 2002). Chez cette espèce cependant, entre la naissance et le jour post-natal 14 toutes les cellules sont identiques (Sun et Flickinger, 1979). Suit ensuite une phase de différenciation qui va du jour post-natal 16 au jour 44. Les premières cellules étroites apparaissent au jour 16, tandis que les cellules principales et les cellules basales apparaissent à partir du jour 28 (Hermo *et al.*, 1992). Finalement, débute au jour 45 la phase d'expansion, qui est caractérisée par l'apparition de sperme dans la lumière, ainsi qu'une augmentation de la taille de l'épididyme et de son poids. (Sun et Flickinger, 1979).

#### 2.1.2.1 Les cellules principales

Dans l'épididyme différencié, les cellules principales constituent la base de l'épithélium. Elles possèdent une importante activité sécrétoire et endocytotique. Elles sont prédominantes dans l'ensemble des segments, puisqu'elles représentent de 65 à 80% de l'ensemble des cellules, cependant elles possèdent des morphologies différentes (Trasler *et al.*, 1988 ; Hermo et Robaire, 2002). En effet, dans le segment initial, elles sont hautes et possèdent quelques microvillosités. Leur noyau relativement petit se situe à la base de la cellule. Puis, plus on progresse vers la queue de l'épididyme, plus leur taille diminue en hauteur, en conséquence la lumière devient alors de plus en plus large (Robaire *et al.*, 2006). De plus, dans le segment du corps de l'épididyme les cellules principales possèdent de nombreuses gouttelettes lipidiques dont le rôle demeure encore à déterminer.

#### 2.1.2.2 Les cellules basales

Les cellules basales sont présentes dans tous les segments de l'épididyme, elles possèdent une forme allongée. Elles sont situées à la base de l'épithélium et sont en contact avec la membrane basale, mais ne possèdent pas d'accès à la lumière. Aucun rôle précis ne leur est connu pour le moment (Veri *et al.*, 1993 ; Hermo et Robaire, 2002). Il a cependant été déterminé que leur forme dépend de l'apport en androgènes. Puisque ce dernier va permettre la formation des spermatozoïdes et du fluide séminal qui vont, par

leur pression sur l'épithélium de l'épididyme, conférer leur forme aux cellules basales, tel que démontré chez des animaux castrés (Herms et Papp, 1996). Elles possèdent une activité sécrétoire et renferment donc des granules de sécrétion. Le devenir de ces sécrétions est encore à déterminer mais servirait possiblement pour la régulation des cellules principales (Robaire *et al.*, 2006). Les cellules basales de l'épididyme expriment les metallothionéines (MT) tel que démontré chez le rat et chez l'humain (Cyr *et al.*, 2001). Notamment dans la queue où les spermatozoïdes sont stockés et les MTs serviraient à les protéger contre une attaque oxydative. De plus, cette activité serait androgène-dépendante. Récemment, il a été démontré que les cellules basales seraient essentielles pour l'épithélium épididymaire puisqu'elles réguleraient les cellules principales via notamment une voie de signalisation impliquant notamment  $Ca^{2+}$  et COX, ce dernier n'étant exprimé que par les cellules basales et non dans les cellules principales (Cheung *et al.*, 2005).

#### 2.1.2.3 Les cellules apicales

Les cellules apicales sont caractéristiques du segment initial, et leur caractéristique est leur noyau, situé près de la lumière. Elles ne possèdent pas de contact avec la membrane basale. Elles ont pour rôle d'abaisser le pH afin de conserver le métabolisme des spermatozoïdes à un bas niveau. Elles servent aussi à éliminer les particules de la lumière par endocytose (Adamali *et al.*, 1999 ; Herms et Robaire, 2002).

#### 2.1.2.4 Les cellules étroites

Les cellules étroites sont elles aussi situées uniquement dans le segment initial. Elles sont peu nombreuses et sont caractérisées par un noyau allongé situé dans la partie supérieure de la cellule et une base très étroite les relie à la membrane basale (Adamali et Herms, 1996). Elles présentent également de nombreuses vésicules impliquées dans l'endocytose (Herms *et al.*, 2000). Elles diffèrent principalement des cellules apicales par leur forme ainsi que leur profil d'expression protéique (Adamali et Herms, 1996).

#### 2.1.2.5 Les cellules halos

Les cellules halos sont présentes dans tous les segments de l'épididyme et sont caractérisées par un noyau très dense (Herms et Robaire, 2002). Elles sont localisées à la

base de l'épithélium. Les cellules halos ont d'abord été décrites comme étant uniquement des lymphocytes (Hermo *et al.*, 1988), mais de récentes études ont démontré qu'elles sont constituées de lymphocytes T et de monocytes chez les juvéniles tandis que chez les animaux plus âgés elles sont composées de lymphocytes B ainsi que d'éosinophiles (Flickinger *et al.*, 1997 ; Serre et Robaire, 1999). Ainsi, les cellules halos possèdent des fonctions immunitaires.

#### 2.1.2.6 Les cellules claires

Les cellules claires sont présentes dans la tête, le corps et la queue de l'épididyme. Ce sont de larges cellules, qui présentent de nombreuses vésicules dans leur région apicale et des gouttelettes lipidiques au niveau basal. Elles possèdent une active fonction d'endocytose, qui est particulièrement importante dans la queue. (Hermo *et al.*, 1988 ; Hermo et Robaire, 2002).

#### 2.1.3 Rôle de la lumière

La lumière de l'épididyme est composée de spermatozoïdes et d'un fluide dont la composition varie au travers de l'épididyme. Il est composé en grande partie d'ions, de petites molécules organiques, de protéines tous jouant un rôle dans la création d'un environnement propice à la maturation des spermatozoïdes (Robaire *et al.*, 2006). La lumière de l'épididyme va jouer un rôle à la fois dans la maturation, l'acquisition de la motilité, l'acquisition du pouvoir fécondant et le stockage des spermatozoïdes.

#### 2.1.4 Activité sécrétoire

Afin de créer un environnement spécifique qui va être propice à la maturation des spermatozoïdes, un certain nombre de protéines vont être secrétées dans la lumière de l'épididyme. Dans la partie proximale du canal épидидymaire, la plupart des protéines testiculaires vont y être rapidement absorbées (Dacheux *et al.*, 2003). Les cellules de l'épididyme vont synthétiser de nombreux produits qui vont soit être retenus dans les cellules, soit être relargués dans la lumière (Turner, 1991 ; Hermo et Robaire, 2002 ; Dacheux et Dacheux, 2002). Ce sont les cellules principales qui majoritairement vont être le siège de cette synthèse, même si elle a également lieu dans les cellules étroites (Hermo *et al.*, 2000), les cellules claires (Hermo *et al.*, 2000) et les cellules basales (Veri *et al.*, 1993).

#### 2.1.4.1 Activité mérocrine et apocrine

Il existe dans l'épididyme deux modes de sécrétion, le mode mérocrine et le mode apocrine (Hermo et Robaire, 2002). Les protéines sécrétées de façon mérocrine par les cellules principales, sont formées dans le réticulum endoplasmique, glycosylées dans l'appareil de Golgi et enfin entreposées dans de grandes granules, qui suite à une fusion avec la membrane plasmique, vont relarguer leur contenu dans la lumière (Hermo, 1994).

L'activité apocrine, contrairement à la mérocrine n'implique pas l'appareil de Golgi ni de granules de sécrétion, mais plutôt des protrusions appelées bulles apicales, dirigées vers la lumière qui sont retrouvées dans les cellules principales et les cellules étroites (Adamali *et al.*, 1999 ; Hermo *et al.*, 2000 ; Saez *et al.*, 2003). Une fois relâchées dans la lumière ces bulles subissent une fragmentation, relâchant ainsi leur contenu, appelé epididymosomes qui peut ensuite interagir avec les spermatozoïdes (Aumuller *et al.*, 1997 ; Hermo et Jacks, 2002, Sullivan *et al.*, 2005) .

#### 2.1.4.2 Protéines majeures sécrétées

Depuis l'avènement des outils de protéomique, de nombreuses études ont décrit les protéines présentes dans l'épididyme de nombreuses espèces (Syntin *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 2000 ; Dacheux *et al.*, 2006 ; Yuan *et al.*, 2006). Une des caractéristiques principale des protéines épидидymaires est le fait qu'elles ont une distribution spatiale restreinte, ce qui fait que la composition du fluide évolue continuellement au long du canal épидидymaire (Dacheux et Dacheux, 2002). De plus, la régulation des sécrétions épидидymaires selon les segments varie selon les espèces (Turner *et al.*, 2003). La majorité, soit 60% des protéines sont sécrétées dans la partie proximale de l'épididyme chez les rongeurs (Turner *et al.*, 2000) de même que chez les autres mammifères (Dufaure et Drevet, 1998). Un petit nombre de protéines, qui dépend des espèces, mais qui est souvent inférieur à dix, représente la majorité de la sécrétion. Chez le rat la clusterine (ou SGP-2), la protéine de sécrétion riche en cystéines (Crisp1) et la protéine épидидymaire qui se lie à l'acide rétinoïque (E-RABP) sont celles qui sont synthétisées et sécrétées le plus abondamment (Dacheux *et al.*, 2003). Chez l'humain c'est également la clusterine qui représente la majeure partie des protéines. Cependant, contrairement aux autres espèces où il existe une forte régionalisation des protéines (Dacheux *et al.*, 2003 et 2005),

ce n'est pas le cas chez l'humain (Dacheux *et al.*, 2006). Cette étude récente a permis de caractériser dans l'épididyme humain les différentes protéines qui compose le fluide luminal épидидymaire et celles qui sont sécrétées. Elle a pu mettre en évidence que l'albumine, la transferrine ainsi que la  $\alpha$ -1-antitrypsine, qui sont des composantes du sérum, étaient les protéines les plus abondamment présentes. Cependant, parmi les protéines sécrétées directement dans l'épididyme humain, la principale est la clusterine qui représente de 25 à 35% de l'ensemble selon les segments, tandis que NCP2/CTP/HE1 (8,8% en moyenne), la lactoferrine (5% en moyenne) ainsi que la protéine D qui est le produit du gène *Crisp1* (5% en moyenne) (Dacheux *et al.*, 2006).

La clusterine, qui est sécrétée dans l'épididyme de façon mérocrine par les cellules principales est en concentration particulièrement importante dans le fluide luminal de la queue de l'épididyme. Chez le rat, elle représente 41% du total des protéines (Mattmueller et Hinton, 1991 ; Turner *et al.*, 2000). Chez l'humain, la majorité de la clusterine est rapidement réabsorbée par l'épithélium de l'épididyme, sauf la proportion sécrétée dans la partie distale (Dacheux *et al.*, 2006). Le rôle de la clusterine est encore inconnu, même si différents rôles ont été suggérés. Dans l'épididyme, elle servirait pour le remodelage de la membrane plasmique lors de la maturation des spermatozoïdes (Dacheux *et al.*, 2003). Sa régulation semble différente selon les régions de l'épididyme. En effet, si une castration entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm de la clusterine dans le corps et dans la queue, elle n'a pas d'effets dans le segment initial et la tête (Cyr et Robaire, 1992). De plus, cette protéine serait endocytosée dans la queue suite à sa dissociation des spermatozoïdes (Mattmueller et Hinton, 1991).

*Crisp* est une famille de protéines qui a été depuis longtemps identifiée dans le fluide luminal de l'épididyme des rongeurs (Eberspaecher *et al.*, 1995). Cette famille est spécifique du système reproducteur et des glandes salivaires. Ainsi, *Crisp1* est sécrétée dans l'épididyme, *Crisp2* dans le testicule et *Crisp3* dans les glandes salivaires. Plus récemment, un quatrième membre a été identifié dans l'épididyme chez la souris et le rat, *Crisp4* (Jalkanen *et al.*, 2005 ; Nolan *et al.*, 2006). Ce serait l'orthologue de la *Crisp1* humaine. Chez les rongeurs elle est impliquée dans le processus de fécondation puisqu'elle a été démontrée comme pouvant se lier aux spermatozoïdes (Haendler *et al.*, 1999). En effet, elle sert à réguler, notamment le phénomène de capacitation des spermatozoïdes et serait impliquée dans la fusion spermatozoïde-ovocyte (Roberts *et al.*,

2003 et 2006). Elle représente chez le rat 11,5% de l'ensemble des protéines sécrétées (Turner *et al.*, 2000).

La Lipocaline 5 (ou E-RABP) appartient à la famille des lipocalines. Elle est présente spécifiquement dans la région proximale de l'épididyme et représente de 15 à 25% des sécrétions de cette région, mais est également exprimée dans la queue (Turner *et al.*, 2000 ; Dacheux *et al.*, 2003). C'est une protéine hautement polymorphe qui a pour rôle de se lier aux molécules hydrophobes et notamment à l'acide rétinoïque, et sert donc de transporteur. Elle est essentielle, puisque l'acide rétinoïque est indispensable pour l'intégrité de l'épithélium de l'épididyme (Orgebin-Crist *et al.*, 2002). En effet, des souris déficientes pour la Lipocaline 5, même si elles étaient fertiles, présentaient un épithélium sous-développé dans la queue de l'épididyme (Suzuki *et al.*, 2006). Son expression est, de plus, dépendante des androgènes (Newcomer, 1993).

NCP2/CTP/HE1, représente la même protéine, soit la protéine Niemann-Pick de type C (Ko *et al.*, 2003), auparavant identifiée comme HE1 (Kirchhoff *et al.*, 1996) et également appelée protéine de liaison au cholestérol (ou CTP pour *cholesterol transfer protein*). Elle est abondamment présente dans tous les segments de l'épididyme (Dacheux *et al.*, 2006) et il a été de plus démontré que son expression était totalement inhibée lors d'une vasectomie (Légaré *et al.*, 2004). Elle jouerait un rôle de facteur de décapacitation qui régulerait, durant les phases de maturation, de stockage et de capacitation, la composition en lipides de la membrane des spermatozoïdes.

La lactoferrine est sécrétée à la fois dans le corps et la queue de l'épididyme de nombreux animaux (Fouchécourt *et al.*, 2000). Elle serait un des composants principaux des antigènes retrouvés sur les spermatozoïdes (Yu et Chen, 1993), et son expression est régulée par les œstrogènes.

Concernant la sécrétion apocrine, parmi les protéines associées avec les épидидymosomes, très peu ont été identifiées. Ce qui explique en partie pourquoi les fonctions des épидидymosomes demeurent encore inconnues (Sullivan *et al.*, 2005). Cependant, nous pouvons nommer HE5 qui a été identifié comme étant endogène à l'épididyme humain (Kirchhoff *et al.*, 2000). Elle est abondante dans les cellules principales de la région distale de l'épididyme (Kirchhoff, 1998). En fait cette protéine est identique à CD52 qui avait déjà été identifiée et caractérisée auparavant. Durant une sécrétion de type apocrine HE5 va s'associer à la membrane cytoplasmique du

spermatozoïde. Elle serait impliquée lors de cas d'infertilité immunologique (Kirchhoff, 2002). Chez la plupart des mammifères, la glutathion peroxydase de type 5 (GPX5) est également sécrétée de façon apocrine, et ce spécifiquement dans la tête et la queue de l'épididyme (Rejraji *et al.*, 2002). Il serait possible que la GPX5 serve à protéger les spermatozoïdes d'une réaction de l'acrosome prématurée. Il a été démontré que son expression dans la tête de l'épididyme était hautement dépendante des androgènes chez la souris (Ghyselinck *et al.*, 1993). Enfin, l'ubiquitine, qui est également associée avec les épидидymosomes, servirait pour l'élimination des spermatozoïdes anormaux (Sutovsky *et al.*, 2001 ; Sutovsky, 2003).

### 2.1.5 Activité d'endocytose

L'endocytose est une importante fonction des cellules épидидymaire, qui va permettre de maintenir un environnement luminal propice à la maturation des spermatozoïdes (Hermo et Robaire, 2002). Elle se fait via un récepteur spécifique, le LRP-2 (Hermo *et al.*, 1999). Les protéines qui vont suivre cette voie vont être soit dégradées soit recyclées à la surface de la cellule. Parmi les protéines il va y avoir notamment la clusterine, qui se lie avec une haute affinité à LPR-2 et va être soumis à l'endocytose par les cellules principales (Hermo *et al.*, 2000b ; Hermo et Adonian, 2003). Également l'immobiline qui joue un rôle précis dans la queue de l'épididyme. Sécrétée dans la lumière, cette protéine va se lier aux spermatozoïdes et empêcher leur mouvement. Pour maintenir un état d'équilibre dans la lumière, l'immobiline va subir l'endocytose par les cellules claires dans la partie distale de la queue de l'épididyme (Hermo, 1995 ; Hermo et Robaire, 2002).

## 2.2 Fonctions de l'épididyme

L'épididyme joue dans le système reproducteur plusieurs rôles. Il sert pour le transport des spermatozoïdes, leur protection et leur stockage en attendant la prochaine éjaculation (Setchell *et al.*, 1993 ; Jones, 1999). De plus, c'est au sein de cet organe, que les spermatozoïdes, qui sortent des testicules immatures et incapables de se déplacer, acquièrent leur motilité et leur potentiel de fertilité (Turner, 1995 ; Jones, 1999). Cela a lieu durant un processus de maturation qui se déroule tout le long du trajet des spermatozoïdes à travers l'épididyme. Il a été montré que, si les cellules germinales



humaines ne subissent pas tous les changements ayant lieu dans l'épididyme, elles sont alors incapables de devenir matures et n'ont pas de pouvoir fécondant (Jones, 1999).

### 2.2.1 Maturation des spermatozoïdes

La maturation des spermatozoïdes est un processus complexe. A leur sortie du testicule les spermatozoïdes sont immatures, ils sont encore incapables de féconder un ovule. Et c'est lors de leur passage dans le canal épидидymaire qu'ils vont devenir matures en subissant différents changements morphologiques, physiologiques et biochimiques. (Yeung et Cooper, 2002). Yeung *et al.* (1998) ont montré à l'aide de souris transgéniques déficientes pour le récepteur de la tyrosine kinase c, que ces souris ne développaient pas de segment initial. Même si les spermatozoïdes étaient motiles, ils étaient incapables d'atteindre l'ovule à cause d'une anomalie de leur flagelle. Ainsi, le segment initial semble jouer un rôle particulier dans la maturation des spermatozoïdes. Si d'autres études ont montré le rôle de diverses protéines épидидymaires (comme l'apolipoprotéine B) ou enzymes (comme les aromatasés) dans la fertilité des spermatozoïdes alors jusque là aucune des régions ne démontrait le rôle d'un segment particulier dans la maturation des spermatozoïdes (Lye et Hinton, 2000). Le changement morphologique le plus évident est la perte de la gouttelette cytoplasmique. Chez un spermatozoïde immature on observe une gouttelette cytoplasmique au niveau de la région arrière de la tête (Cooper, 2005). Cette gouttelette qui contient des éléments membranaires sacciformes et des enzymes de dégradation migre le long de la pièce intermédiaire, et finalement se détache avant que le spermatozoïde n'atteigne la queue de l'épididyme. Son rôle exact est inconnu, mais la perte de la gouttelette semble conférer une plus grande motilité aux spermatozoïdes. Ainsi chez des spermatozoïdes qui possèdent encore cette gouttelette dans la queue, leur motilité ainsi que leur pouvoir fécondant est diminué (Averal *et al.*, 1996).

### 2.2.2 Acquisition de la motilité

La capacité de se mouvoir des spermatozoïdes est acquise dans les parties proximales de l'épididyme (Robaire *et al.*, 2006). L'acquisition de la motilité se fait de façon graduelle. Lorsqu'ils sont dans la partie proximale de la tête de l'épididyme, les spermatozoïdes sont capables de mouvements vibratiles légers. Puis, vers la région centrale de la tête, ils

sont capables de nager en cercles serrés. Finalement c'est en atteignant le début du segment caudal que leurs mouvements deviennent progressifs (Brooks, 1983). Si beaucoup de protéines composent le fluide luminal de l'épididyme (Dacheux *et al.*, 2003), le rôle de chacune d'entre elle est loin d'être identifié. Une protéine, Bin1b a récemment été identifiée comme étant impliquée dans la motilité des spermatozoïdes et appartient à la famille des  $\beta$ -défensives (Li *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2004). En effet, des cellules exprimant Bin1b sont capables d'induire une motilité chez des spermatozoïdes immatures, par le biais d'une augmentation de la réserve de  $Ca^{2+}$  des spermatozoïdes, qui est connu pour jouer sur la motilité des spermatozoïdes.

Cependant lors de leur stockage dans la queue de l'épididyme les spermatozoïdes sont maintenus dans un état quiescent les empêchant de se mouvoir (Ruiz-Bravo, 1988), notamment grâce à une protéine appelée immobiline qui compose une sorte de mucus qui remplit la lumière et dans lequel les spermatozoïdes baignent (Hermo *et al.*, 1994b). Elle est sécrétée par les cellules principales dès le segment initial, et par contre pas dans la région du corps ni de la queue. Elle va être endocytosée dans la région distale de la queue par les cellules claires (Hermo *et al.*, 1992b).

### 2.2.3 Acquisition du pouvoir fécondant

Le gain de la motilité est une étape importante vers l'acquisition du pouvoir fécondant. Le potentiel de fécondation d'un ovule est acquis lorsque les spermatozoïdes matures atteignent la partie proximale de la queue de l'épididyme (Lakosky *et al.*, 1988). En effet, il est depuis longtemps démontré que des spermatozoïdes provenant de la partie proximale de l'épididyme ne possédaient pas la capacité de féconder l'ovule lorsqu'utilisés pour des IVF ou des inséminations artificielles (Horan et Bedford, 1972). Le pouvoir fécondant est la résultante de divers changements du spermatozoïde qui prennent place dans l'épididyme. Un événement important est la migration de la gouttelette lipidique du col du spermatozoïde jusqu'au milieu de sa flagelle, puis le détachement de celle-ci (Cooper et Yeung, 2003). En effet, la rétention de la gouttelette est associée avec l'infertilité par exemple chez les souris (Yeung *et al.*, 2000). Cependant, chez les humains, il existe une autre sorte de gouttelette lipidique, qui elle ne se détache pas. Il semblerait que ce second type de gouttelette soit normal (Cooper, 2005). Ainsi il existerait chez les humains deux types de résidus cytoplasmiques : une plus petite qui

reste en place et qui est partie intégrante d'un spermatozoïde normal et une gouttelette résiduelle anormale qui elle serait associée avec l'infertilité. Lors de l'acquisition du pouvoir fécondant, des changements majeurs sont aussi observés au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde : tels que la diminution du point isoélectrique, l'augmentation de la surface de la cellule possédant une charge négative ainsi que de sa composition lipidique et protéique. Ces modifications à la surface des spermatozoïdes libèrent des récepteurs de surface, ce qui va permettre une reconnaissance entre les spermatozoïdes et les ovules d'une même espèce (Toshimori, 2003 ; Tulsiani, 2003).

Il a récemment été démontré que la protéine SPAM1 (pour *Sperm Adhesion Molecule*), qui est hautement conservée chez les mammifères, est directement impliquée dans le pouvoir fécondant et serait ainsi un bon marqueur des spermatozoïdes matures (Martin-DeLeon, 2006). En effet, à l'aide de souris qui étaient mutantes pour SPAM1, lorsque leurs spermatozoïdes étaient incubés avec le fluide luminal de l'épididyme alors ils retrouvaient leur capacité de pénétrer dans l'ovocyte. Cette protéine est présente dans l'épididyme à la fois sous forme soluble et sous forme insoluble dans des épидидyosomes (Zhang et Martin-DeLeon, 2003).

Différents produits ont déjà été démontrés comme étant capables de compromettre le pouvoir fécondant des spermatozoïdes tels que l'EDS (Klinefelter *et al.*, 1997). En effet, une exposition à ce produit entraînait une baisse de la motilité des spermatozoïdes et une baisse de la testostérone sérique. Mais surtout, la perte du pouvoir fécondant était directement corrélée à une baisse d'une protéine spécifique aux spermatozoïdes, la protéine SP22. De même que la cyclophosphamide qui est un produit utilisé dans les traitements de cancer par chimiothérapie (Elangovan *et al.*, 2006).

#### 2.2.4 Stockage des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes atteignent la queue de l'épididyme sous une forme mature et celle-ci va leur servir de réservoir avant la prochaine éjaculation. Le milieu dans lequel ils sont conservés les maintient dans un stade quiescent, ceci pour une période pouvant aller de quelques jours à plus d'un mois. Si les facteurs permettant la conservation des spermatozoïdes pour une longue période de temps ne sont pas encore bien connus, l'immobiline serait impliquée dans ce processus (Carr et Acott, 1984). Selon certaines études la nécessité de stocker les spermatozoïdes à de basses températures aurait

provoqué la descente des testicules et des épидидymes dans le sac scrotal, permettant ainsi de les conserver à une température inférieure de 2 à 3 degrés à celle du corps. Ainsi si les épидидymes sont soumis à la température corporelle, cela entraîne des conséquences néfastes sur les propriétés d'absorption et de sécrétion de la queue de l'épididyme. Cela entraîne également une dégénérescence des spermatozoïdes non éjaculés et une réduction de leur nombre dans les éjaculats (Bedford, 1991).

Le milieu dans lequel les spermatozoïdes évoluent, et qui change selon la région de l'épididyme, contient des éléments spécifiques qui ne sont retrouvés dans aucun autre fluide. Cette spécificité est maintenue à la fois par la sécrétion et la réabsorption mais également grâce à la barrière hémato-épидидymaire qui va restreindre les échanges entre le compartiment luminal et la circulation sanguine (Dacheux *et al.*, 2003).

La barrière hémato-épидидymaire est composée des jonctions serrées (Cyr *et al.*, 1995 ; Cyr *et al.*, 2002). Ces dernières font partie du complexe jonctionnel qui comprend les jonctions adhérentes, les jonctions serrées, les desmosomes ainsi que les jonctions lacunaires. Ce complexe est indispensable pour le développement du système reproducteur et pour le maintien de son intégrité (Mruk et Cheng, 2004 ; Pointis *et al.*, 2005 ; Robaire *et al.*, 2006).

### 2.3 Les jonctions cellulaires

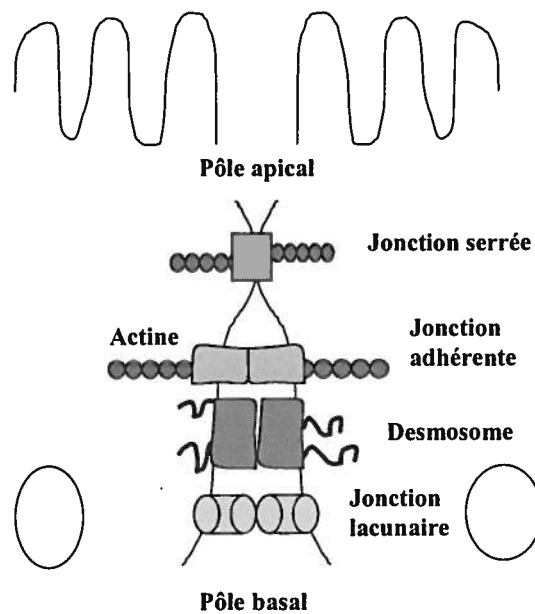


Figure 4 : Représentation des différents types de jonctions entre deux cellules épithéliales

Les cellules polarisées, comme c'est le cas dans l'épididyme, possèdent un domaine apical et un domaine baso-latéral dont la composition en lipides et protéines est différente (Simons et Fuller, 1985 ; Simons et Wandiger-Ness, 1990 ; Bomsel et Mostov, 1991). Leur partie apicale contient différents canaux et des jonctions occlusives, la partie latérale entre les cellules adjacentes est le siège des protéines qui vont servir pour l'adhésion cellulaire et également pour la communication inter cellulaire. Enfin la partie basale du domaine baso-latéral contient les récepteurs pour les hormones et autres molécules de signalisation qui vont servir à réguler les fonctions de la cellule (Miyoshi et Takai, 2005). Il est tout d'abord nécessaire de comprendre les différentes composantes des complexes jonctionnels existant entre les cellules pour mieux cerner les cellules polarisées et la façon dont cette distribution et arrangements cellulaires sont maintenus (Farquhar et Palade, 1963). Il existe différents types de jonctions cellulaires formées par des complexes d'adhérence entre ces cellules. Ces jonctions intercellulaires ne servent pas seulement à l'adhérence, mais contiennent également des éléments indispensables aux voies de signalisation qui régulent la prolifération et la différenciation épithéliale.

Chez les vertébrés le complexe jonctionnel est composé des jonctions lacunaires (Cyr *et al.*, 1995 ; Cyr *et al.*, 1996 ; Pointis *et al.*, 2005), des desmosomes (Olson *et al.*, 1983), des jonctions adhérentes (Cyr *et al.*, 1992b ; Cyr *et al.*, 1995) et enfin des jonctions serrées (Cyr *et al.*, 1995 ; Cyr *et al.*, 1999 ; Gregory *et al.*, 2001).

Mais nous nous attarderons ici principalement aux jonctions adhérentes, aux jonctions lacunaires et aux jonctions serrées.

### 2.3.1 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes servent à créer une cohésion entre les cellules, ce sont elles qui sont responsables de l'adhésion cellulaire (Cereijido *et al.*, 2000). La famille de molécules d'adhésion cellulaire impliquée dans les jonctions adhérentes sont les cadhérines dont l'adhésion est un phénomène calcium-dépendant (Geiger et Ayalon, 1992 ; Braga, 2002). Elles sont, de plus, reliées au cytosquelette d'actine de la cellule (Geiger et Ayalon, 1992 ; Imamura *et al.*, 1999).

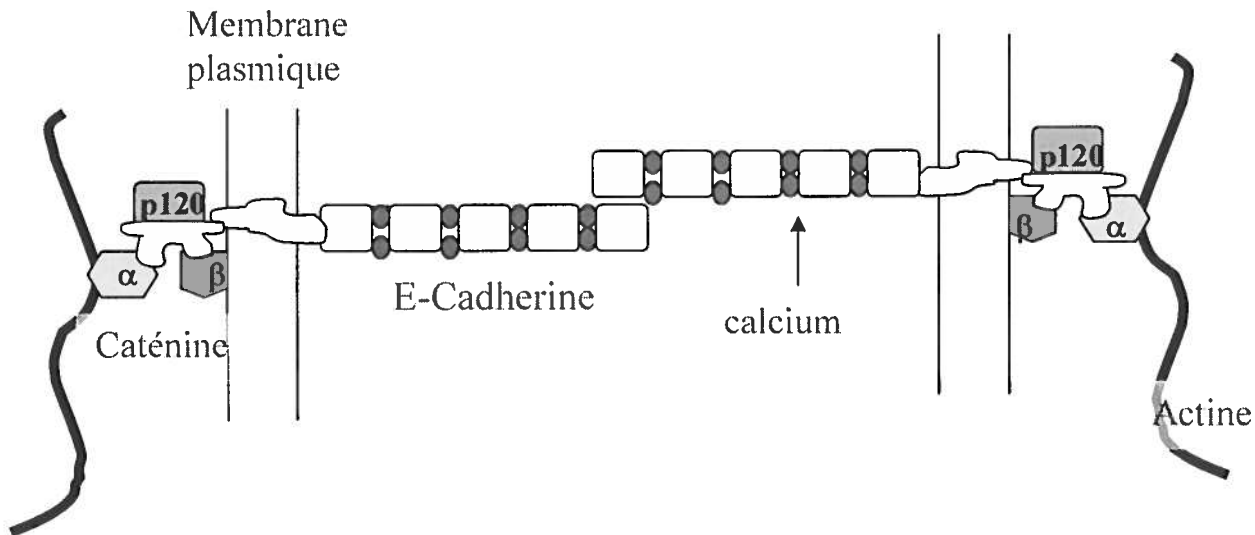


Figure 5 : Représentation d'une jonction adhérente.

Deux E-cadhérines sont liées via un mécanisme calcium dépendant. E-cad est liée à l'actine via  $\beta$ -caténine (ou  $\gamma$ -caténine) qui va être liée à  $\alpha$ -actine, elle-même directement reliée à l'actine ou via des protéines adaptatrices.

### 2.3.1.1 Les cadhérines

La physiologie des tissus du système reproducteur est dépendante de la maintenance d'un contact cellule-cellule approprié. Ainsi, il n'est pas surprenant qu'un nombre varié de cadhérines soient présentes notamment dans les testicules (Byers *et al.*, 1994) ou dans la prostate (Paul *et al.*, 1997). La première des cadhérines à avoir été découverte est E-cadhérine (E-Cad pour *Epithelial cadherin*), ainsi nommée pour avoir été découverte dans un épithélium. Ensuite, la N-cadhérine (N-Cad) et la P-cadhérine (P-Cad) ont été identifiées, et tirent respectivement leur nom du tissu neural et du placenta (Takeichi, 1988 ; Takeichi, 1990). Depuis, plus de 80 cadhérines ont été découvertes et sont divisées en de nombreuses sous-familles. E-Cad, N-Cad et P-Cad appartiennent quant à elles à la famille des cadhérines classiques ou cadhérines de type I (Kemler, 1992 ; Nollet *et al.*, 2000 ; Wheelock et Johnson, 2003 ; Junghans *et al.*, 2005). Ces protéines jouent un rôle essentiel durant le développement, notamment pour l'organisation de cellules en tissus, tandis que chez les adultes, elles contribuent au maintien de l'intégrité des tissus (Takeichi, 1990 ; Gumbiner, 1996 ; Potter *et al.*, 1999 ; Hirano *et al.*, 2003 ; Honecker *et al.*, 2004).

Les cadhérines classiques sont caractérisées par cinq domaines extracellulaires de 110 acides aminés, un domaine transmembranaire et deux domaines cytoplasmiques. Le premier domaine extracellulaire contient une séquence CAR (cell adhesion recognition), tandis que les autres domaines extracellulaires possèdent tous un site de liaison pour le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Takeichi, 1995 ; Braga, 2002). La portion cytoplasmique des cadhérines va interagir avec différentes protéines cytoplasmiques, comme les caténines ou *zonula-occludens-1* (ZO-1), créant ainsi un lien indirect avec le cytosquelette (Kemler, 1993 ; Gumbiner, 1996 ; Imamura *et al.*, 1999).

Les cadhérines sont impliquées dans la formation des jonctions adhérentes, cette dernière va se former par interaction de deux cadhérines provenant de deux cellules adjacentes (Yap *et al.*, 1997). Ce mécanisme de liaison va se faire selon un processus qui est calcium dépendant. Les cadhérines sont également impliquées dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire, ainsi que dans la morphogenèse des tissus et la polarité cellulaire (Larue *et al.*, 1994 ; Blaschuk *et al.*, 1995 ; Perez-Moreno *et al.*, 2003). De plus, lors de phénomène de cancérogenèse, une diminution ou une absence de E-Cad est le plus souvent observée, tandis que l'expression de N-Cad semble être augmentée (Graff *et al.*, 1995 ; Hazan *et al.*, 1997 ; Kuefer *et al.*, 2005)

Si N-Cad est la cadhérine qui est prédominante dans le testicule (Cyr *et al.*, 1995 ; Johnson *et al.*, 2000), E-Cad est la plus abondante dans l'épididyme (Cyr *et al.*, 1991 ; Cyr *et al.*, 2002). De plus, E-Cad n'est pas seulement nécessaire pour les jonctions adhérentes. En effet, son activité d'adhésion a été démontrée comme étant nécessaire à la formation des autres membres du complexe jonctionnel, soit notamment la formation des jonctions serrées (Balda *et al.*, 1993 ; Seth *et al.*, 2000 ; Tunggal *et al.*, 2005), mais également pour les jonctions lacunaires (Gumbiner *et al.*, 1988, Meyer *et al.*, 1992). La formation de ce complexe jonctionnel coïncide avec l'établissement de la polarité dans la cellule, il existe donc un lien étroit entre la formation des différentes jonctions et la polarité (Jamora *et Fuchs*, 2002 ; Nelson, 2003).

### 2.3.1.2 Les caténines

La famille des caténines comprend quatre membres classiques, soit  $\alpha$ -caténine ( $\alpha$ -cat),  $\beta$ -caténine ( $\beta$ -cat),  $\gamma$ -caténine ( $\gamma$ -cat) et p120<sup>cas</sup>. Les caténines sont des protéines

cytoplasmiques,  $\alpha$ -cat,  $\beta$ -cat et  $\gamma$ -cat vont permettre d'ancrer les cadhérines au cytosquelette, tandis que p120<sup>cas</sup> va moduler la force de liaison des cadhérines (Potter *et al.*, 1999 ; Gumbiner, 2000). Ainsi, classiquement, le complexe cadhérines-caténines va être formé de E-Cad, qui va être liée indifféremment à  $\beta$ -cat ou  $\gamma$ -cat, ces dernières étant liées à  $\alpha$ -cat.

$\alpha$ -caténine a une masse moléculaire de 102 kDa et comprend deux membres  $\alpha$ N-cat et  $\alpha$ E-cat, qui sont capables *in vitro* de se substituer l'une à l'autres (Potter *et al.*, 1999). C'est  $\alpha$ -cat qui est responsable de la liaison entre les filaments d'actine et les cadhérines. Elle est liée à  $\beta$ -cat, qui est elle-même liée aux cadhérines. Et  $\alpha$ -cat est liée à l'actine, soit directement, soit par l'intermédiaire d'adaptateurs tels que  $\alpha$ -actinine ou encore la vinculine (Kobielack et Fuchs, 2004). Elle possède trois domaines fonctionnels, dont un qui est impliqué dans la liaison avec ZO-1 (Imamura *et al.*, 1999).

$\beta$ -cat est une protéine de 92 kDa, qui est présente à la fois dans le noyau, le cytoplasme et la membrane cytoplasmique. Quand il n'est pas lié à  $\beta$ -cat, le domaine cytoplasmique des cadhérines change alors de conformation (Huber et Weis, 2001).  $\beta$ -caténine est ainsi impliquée dans de nombreux événements cellulaires et joue un rôle central dans la voie de signalisation de Wnt (Shapiro, 2001). Elle appartient, avec  $\gamma$ -cat (ou plakoglobine) et p120<sup>cas</sup>, à la famille des protéines Armadillo (Hatzfeld, 1999), qui sont caractérisées par la répétition d'un motif de 42 acides aminés, homologue à la protéine Armadillo de la drosophile. Les membres de cette famille sont impliqués dans l'adhésion cellulaire, mais aussi dans les interactions protéine-protéine ainsi que dans le transport nucléaire. De plus, des mutations dans le motif Armadillo mène à différentes pathologies qui vont du cancer de la prostate à la neurodégénérescence (Willert and Nusse, 1998 ; Lisovsky *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2005). p120<sup>cas</sup>, contrairement à  $\beta$ -cat ou à  $\gamma$ -cat n'interagit pas avec  $\alpha$ -cat. Ainsi, cette protéine jouerait un rôle particulier dans le complexe cadhérine-caténine. p120<sup>cas</sup> affecte l'adhésion cellulaire en se liant au domaine juxtamembranaire des cadhérines (Anastasiadis et Reynolds, 2000), elle jouerait ainsi un rôle clé dans l'expression des cadhérines et de  $\alpha$ -caténine et  $\beta$ -caténine et dans la stabilisation du complexe cadhérine-caténines (Davis *et al.*, 2003). En effet, lors d'études d'inhibition de l'expression de p120<sup>cas</sup> à l'aide d'ARN d'interférence sur des cellules endothéliales humaines d'artère ombilicale, une dégradation rapide de tous les acteurs du complexe



cadhérine-caténine, menant à la perte de l'adhésion cellule-cellule, a été observée. Cette régulation se ferait via des interactions de p120<sup>ctn</sup> avec les Rho GTPases (Anastasiadis et Reynolds, 2001). De plus p120<sup>ctn</sup> joue un rôle direct sur E-Cad puisque p120<sup>ctn</sup> est indispensable pour une expression normale d'E-Cad, de même que leur interaction est nécessaire pour une mise en place de l'adhésion cellulaire entre deux cellules adjacentes. Enfin, p120<sup>ctn</sup> contrôle le 'turn-over' des cadhérines en modulant l'entrée des cadhérines dans leur voie de dégradation par endocytose. Ainsi dans des cellules endothéliales où l'on inhibe p120 à l'aide d'ARN d'interférence, à son arrivée à la membrane cytoplasmique, E-Cad est rapidement dégradée (Ireton *et al.*, 2002 ; Kowalczyk et Reynolds, 2004).

### 2.3.1.3 Formation des jonctions adhérentes

Les cadhérines vont donc promouvoir l'adhésion cellulaire, une liaison va ensuite se mettre en place entre le domaine cytoplasmique de la cadhérine et des caténines. Il existe une interaction entre les cadhérines avec  $\beta$ -cat ou  $\gamma$ -cat, ce qui va permettre le lien avec le cytosquelette (Gottardi *et al.*, 2002 ; Tunggal *et al.*, 2005). Cette interaction prend naissance dans le réticulum endoplasmique, lors de la synthèse des cadhérines. Les cadhérines interagissent également avec p120<sup>ctn</sup>, qui est essentielle puisque son niveau de phosphorylation va induire l'adhésion cellulaire, et va servir à réguler la stabilité du complexe des cadhérines à la surface cellulaire notamment en contrôlant son turn-over (Reynolds et Roczniak-Ferguson, 2004). Enfin,  $\alpha$ -cat est intégrée au complexe formé, lorsque le complexe s'insère dans la membrane plasmique, et va être relié selon les cas, soit à  $\beta$ -cat soit à  $\gamma$ -cat. Ce complexe d'adhésion est alors relié au cytosquelette via la liaison de  $\alpha$ -cat avec les microfilaments. En dehors de la figure centrale du complexe cadhérine-caténine, beaucoup d'autres molécules d'échafaudage, de signalisation et d'adhésion sont liées aux jonctions adhérentes (Perez-Moreno *et al.*, 2003). Par exemple, il est à noter que  $\alpha$ -cat est également reliée à ZO-1, qui avant la formation de la jonction serrée est localisée au niveau de la jonction adhérente (Itoh *et al.*, 1997). Une jonction d'adhérente va être constituée par le regroupement de plusieurs complexes jonctionnels (Rowlands *et al.*, 2000). E-cad joue un rôle de régulateur dans la formation du complexe entre cadhérine et caténine. En effet, il a été montré que chez des souris déficientes en E-

Cad, l'expression de  $\alpha$ -cat et  $\beta$ -cat était très fortement réduite, et entraînait une modification de leur localisation, ainsi que de celle de ZO-1 et des filaments d'actine (Ohsugi *et al.*, 1997). De plus, il a récemment été démontré que contrairement à ce qui est depuis longtemps pensé,  $\alpha$ -cat ne serait pas seulement le lien entre le complexe cadhérine-caténine et le cytosquelette. En effet, elle aurait aussi un rôle de régulation dans l'assemblage de l'actine ainsi que dans l'adhésion cellulaire médiée par les cadhérines, en ne se liant pas en fait de façon simultanée à l'un et l'autre. Ainsi cette incapacité de  $\alpha$ -cat à se lier simultanément au complexe E-Cad- $\beta$ -cat et à l'actine, agirait comme un commutateur moléculaire, dans lequel la liaison avec l'un peut influencer sur la capacité de se lier avec l'autre (Drees *et al.*, 2005).

#### 2.3.1.4 Régulation des cadhérines et de l'adhésion cellulaire

Dans l'épididyme, l'expression de E-cad est androgène-dépendante tel que démontré par Cyr *et al.* (1992). En effet, suite à une orchidectomie les niveaux d'ARNm de E-Cad baissent de 75% dans la tête de l'épididyme et de 90% dans le corps. L'exposition à la testostérone permettait le rétablissement partiel des niveaux de messager d'E-Cad et la testostérone permet le maintien de l'expression d'E-Cad.

De plus, de par le complexe qu'elles forment avec les cadhérines, les caténines semblent jouer un rôle dans la régulation des cadhérines. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation de Wnt, qui mène à une augmentation des niveaux de  $\beta$ -cat (ou  $\gamma$ -cat), semble promouvoir la formation du complexe caténine-cadhérine et favorise l'adhésion cellulaire dans certaines lignées cellulaires (Hinck *et al.*, 1994). Cependant dans beaucoup de lignées, il semblerait que ce soit plutôt le niveau d'expression des cadhérines qui limiterait la formation du complexe cadhérine-caténine (Yap *et al.*, 1998). Les interactions de  $\alpha$ -cat avec le cytosquelette semblent aussi influencer la régulation de l'adhésion cellulaire. La région de liaison avec ZO-1 de  $\alpha$ -cat influencerait la force de l'adhésion cellulaire dans les cellules non-épithéliales, cependant ce ne semble pas être primordiale pour les cellules épithéliales, ainsi, cette interaction jouerait un rôle dans l'assemblage de la jonction plutôt que véritablement dans l'adhésion cellulaire (Imamura *et al.*, 1999). p120<sup>cas</sup> semble jouer un rôle double dans l'adhésion cellulaire. En effet, dans certains types cellulaires, p120<sup>cas</sup> serait un inhibiteur de l'adhésion cellulaire régulée par les

cadhérines (Aono *et al.*, 1999). Tandis que dans d'autres elle joue un rôle positif en promouvant l'adhésion cellulaire (Yap *et al.*, 1998 ; Gumbiner, 2000). Ainsi son rôle précis reste à déterminer.

Beaucoup d'autres facteurs entrent en ligne de compte pour la régulation des jonctions adhérentes, tels que le statut de phosphorylation de différents acteurs (Shibamoto *et al.*, 1994 ; Gumbiner, 2000). Les petites protéines GTPases, Rac, Rho et Cdc42 sont également impliquées dans la promotion de l'adhésion cellulaire médiée par les cadhérines (Kaibuchi *et al.*, 1999 ; Fukata et Kaibuchi, 2001 ; Braga, 2002). Ainsi une surexpression de Rac, mène à une accumulation de E-Cad,  $\beta$ -Cat et de l'actine dans les régions de contact des cellules épithéliales, tandis que l'inhibition de l'expression de Rac mène au processus inverse (Braga *et al.*, 1997 ; Takaishi *et al.*, 1997; Goodwin *et al.*, 2003). Il semblerait que Cdc42 affecte directement le complexe cadhérine-caténine (Kaibuchi *et al.*, 1999 ; Yap et Kovacs, 2003). Enfin IQGAP1, qui est un effecteur de Cdc42 et Rac, est capable de se lier au complexe E-Cad- $\beta$ -Cat et rentre alors en compétition avec  $\alpha$ -cat. Il en résulte une dissociation du complexe et une perte de l'adhésion (Kuroda *et al.*, 1998 ; Yap et Kovacs, 2003). Ainsi dans le processus d'adhésion cellulaire, Cdc42 et Rac inhiberaient la liaison entre IQGAP1 et  $\beta$ -Cat, menant ainsi à une stabilisation du complexe cadhérine-caténine (Jaffer et Chernoff, 2004).

### 2.3.1.5 Expression des protéines de jonctions adhérentes dans l'épididyme

Chez les rats adultes E-Cad est présente dans l'épididyme, contrairement au testicule (Cyr *et al.*, 1992a ; Byers *et al.*, 1994). En effet, E-Cad semble être la cadhérine prédominante dans l'épididyme (Cyr et Robaire, 1991 ; Cyr *et al.*, 1992b), et elle est localisée entre les cellules principales. E-Cad est de plus exprimée de façon plus importante dans la tête et le corps de l'épididyme (Cyr *et al.*, 1992b). Par contre, N-Cad est absente de l'épididyme aussi bien chez le rat que chez l'humain (Cyr *et al.*, 1992b ; Andersson *et al.*, 1994). Comme mentionné précédemment, E-Cad est régulée par les androgènes dans l'épididyme (Cyr *et al.*, 1992). Cependant, cette régulation serait différente selon les régions de l'épididyme. En effet, si l'expression d'E-Cad dans la partie proximale de l'épididyme est corrélée avec la conversion de la testostérone en DHT. En revanche, dans la queue ce n'est pas le cas (Cyr *et al.*, 1995). De plus, s'il existe

cette différence de régulation selon les segments, il existe également des disparités de régulation chez les animaux âgés. Lors d'expériences menées chez des rats Wistar, il a été démontré que lorsque ces animaux atteignaient l'âge de 24 mois, le marquage immunohistochimique cytoplasmique d'E-Cad qui était présent à 3 mois au niveau de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme, disparaissait (Levy et Robaire, 1999).

Les différentes caténines sont présentes dans l'épididyme, mais leur distribution est variable selon les régions (DeBellefeuille *et al.*, 2003). Par marquage immunohistochimique,  $\alpha$ -cat,  $\beta$ -cat et p120<sup>cas</sup> ont été localisées le long de la membrane plasmique, entre les cellules principales adjacentes. De plus, dans la région du segment initial, un marquage était également présent entre les cellules étroites et les cellules apicales, tandis que dans le reste des régions de l'épididyme, un marquage était également observé entre les cellules principales et les cellules claires. L'expression de  $\alpha$ -cat et  $\beta$ -cat était plus importante dans les régions du corps de l'épididyme, tandis que l'expression de p120 ne semblait pas différer dans les différents segments. Bien que le rôle des caténines dans chacune des régions de l'épididyme soit encore imprécis, cette différence d'expression vient renforcer le fait que les jonctions serrées ne sont pas aussi nombreuses dans le corps et la queue de l'épididyme (Cyr *et al.*, 1995). Ainsi ces régions auraient besoin de davantage d'adhésion cellulaire. Cette hypothèse est renforcée par une présence accrue d'E-Cad dans les régions de la queue et du corps de l'épididyme (DeBellefeuille *et al.*, 2003).

### 2.3.2 Les jonctions lacunaires

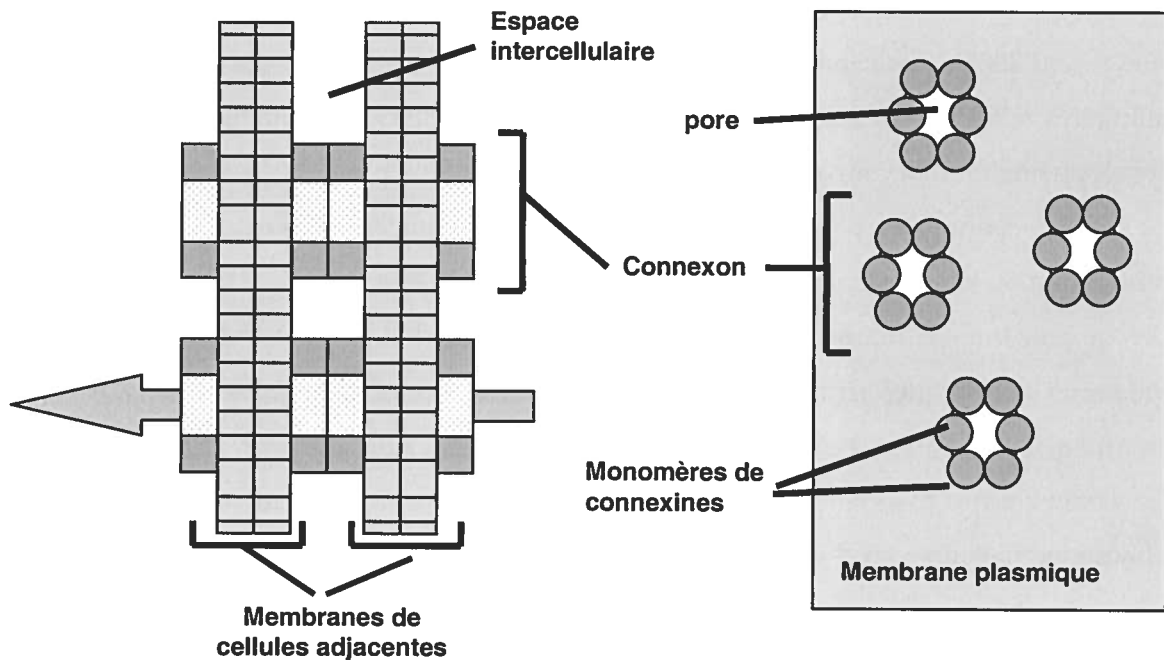


Figure 6 : Représentation d'une plaque jonctionnelle composée de jonctions lacunaires

#### 2.3.2.1 Composition et formation

Les cytoplasmes de nos cellules sont (sauf pour les fibres musculaires squelettiques, certains neurones, les hématies et les spermatozoïdes matures) directement interconnectés par des canaux intercellulaires groupés en plaques membranaires appelées jonctions lacunaires, qui sont aussi appelées les jonctions communicantes (Bruzzone *et al.*, 1996 ; Lo, 1999). Cette communication entre les cellules est essentielle pour la coordination de l'activité d'un groupe de cellules. Et lors que cette communication est perdue cela peut avoir des effets très néfastes. Car, ainsi que l'ont montré Loewenstein et Kanno (1966), les cellules cancéreuses ont perdu cette capacité de communication avec les cellules qui les entourent. Leur croissance n'est alors plus régulée par les cellules environnantes, elles ont perdu leur caractéristique d'inhibition de contact et cela mène à une prolifération anarchique.

Les jonctions lacunaires, forment des canaux de communication entre les cellules, permettant ainsi le passage de petites molécules, tels des seconds messagers ou des ions,

d'un poids inférieur à 1 kDa (Elgang *et al.*, 1995 ; Pointis *et al.*, 2005). Cette communication entre les cellules permet de coordonner les réponses notamment lors de moments clés comme le développement des organes (Perez-Armendariz *et al.*, 2001; Houghton, 2005). Ces canaux sont impliqués dans la régulation de nombreuses tâches cellulaires telles que la prolifération cellulaire, la sécrétion ou la signalisation durant le développement embryonnaire. La stimulation d'une cellule peut ainsi se répandre entre les cellules connectées, permettant des fonctions coordonnées telles que la sécrétion, la contraction ou le mouvement des cils (Goodenough *et al.*, 1996).

Les canaux intercellulaires sont composés d'une paire d'oligomères hexamériques de sous-unités protéiques arrangées de façon radiale afin de former un pore aqueux. Il a été montré que ces protéines chez les vertébrés sont des connexines (Beyer *et al.*, 1987).

Six connexines s'associent autour d'un axe radial pour former un héli-connexon. Chaque héli-connexon d'une cellule s'associe alors avec l'héli-connexon d'une cellule adjacente et forment alors un canal jonctionnel. L'ensemble de tous ces connexons est appelé plaque jonctionnelle. Chaque jonction lacunaire peut contenir plusieurs milliers de canaux intercellulaires (White et Paul, 1999).

Aussi bien chez les rongeurs que chez les humains, les connexines forment une famille de 20 protéines (Lauf *et al.*, 2002). Habituellement, les connexons sont des hétéro-oligomères. Leur composition va déterminer la perméabilité du canal. Chaque connexine est identifiée par son espèce d'origine et sa masse moléculaire en kDa, déduite de la séquence d'ADN clonée. Leur taille est comprise entre 25 et 50 kDa, selon la taille de leur domaine carboxy-terminal (Bruzzone *et al.*, 1996).

Tous les connexons ne sont pas identiques. D'abord, il a été montré que les connexines forment des canaux possédant une sélectivité différente dans la perméabilité aux molécules et aux ions selon le(s) type(s) de connexine(s) qui le compose. Deuxièmement, la formation des jonctions entre les cellules peut être limitée par la compatibilité entre les connexines, cela permet de restreindre la communication entre certaines cellules qui possèdent des voies de différenciation distinctes (Elfgang *et al.*, 1995). Troisièmement, les échanges intercellulaires d'ions et de petites molécules peuvent être unidirectionnels (Nedergaard, 1994). De plus, il existe une régulation dynamique de la communication intercellulaire qui prend place à différents niveaux dans la transcription, la traduction, le ciblage et l'appariement des connexines, qui sont contrôlés par les facteurs de croissance,

les hormones et les neurotransmetteurs via des voies de signalisation encore peu connues. (Brissette *et al.*, 1994 ; Bruzzone *et al.*, 1996).

Les jonctions lacunaires sont intimement liées aux jonctions adhérentes. En effet, afin que les jonctions lacunaires puissent se former, les cellules doivent être suffisamment proches l'une de l'autre. Or les molécules d'adhésion cellulaires sont impliquées dans ce processus de 'couplage' entre cellules et régulent l'expression des connexines (Bennett *et al.*, 1991). Et de même, la formation des jonctions adhérentes est compromise si la formation des jonctions lacunaires est bloquées (Goodenough *et al.*, 1996).

### 2.3.2.2 Les jonctions lacunaires dans l'épididyme

Les jonctions lacunaires ont été identifiées dans l'épididyme lors d'études par microscopie électronique avec cryofracture. Elles ont alors été localisées entre les cellules principales adjacentes de l'épididyme, au niveau apical et le long de la membrane cytoplasmique commune aux deux cellules (Nagano *et al.*, 1982). Différentes connexines sont présentes dans l'épididyme mature de rat. La connexine-43 (Cx43), qui est la connexine la plus abondante de l'épididyme, est localisée entre les cellules principales et les cellules basales (Cyr *et al.*, 1996). Par contre, elle n'est pas présente entre les cellules principales adjacentes. Dans l'épididyme, la Cx43 semble être régulée par les androgènes dans la région du segment initial chez le rat adulte (Cyr *et al.*, 1996) et par les hormones thyroïdiennes dans les régions uniquement proximales de l'épididyme (St-Pierre *et al.*, 2003). La compréhension de cette différence de régulation selon les segments demande encore des approfondissements.

Plus récemment, d'autres connexines ont été identifiées comme étant présentes dans l'épididyme, notamment les Cx26, Cx30.3, Cx31.1 et Cx32 ont été identifiées dans l'épididyme. La Cx26 est localisée entre les cellules principales adjacentes, mais est présente uniquement durant la phase de développement de l'épididyme, elle semble ensuite être remplacée par la Cx31.1. La Cx32 est également présente dans l'épididyme. Elle est localisée entre les cellules principales et les cellules basales mais est absente de la portion distale de la queue de l'épididyme (Dufresne *et al.*, 2003). Ainsi chaque connexine semble avoir un rôle précis à jouer dans l'épididyme (Pointis *et al.*, 2005).

### 2.3.3 Les jonctions serrées

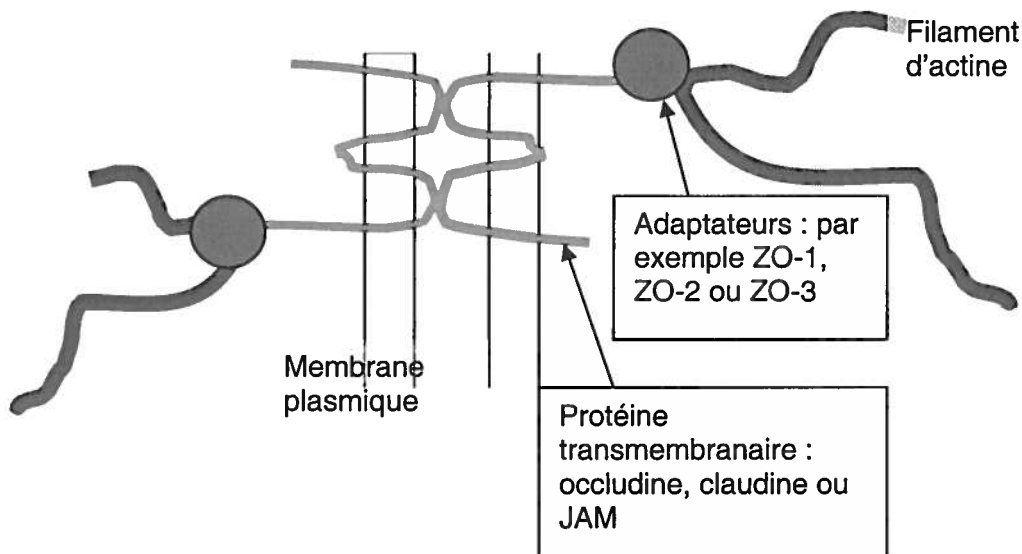


Figure 7 : Représentation d'une jonction serrée

Lorsqu'observées en microscopie électronique, les jonctions serrées apparaissent comme une série de points de fusion apparente des feuillettes externes des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes, où l'espace intercellulaire disparaît (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003 ; Tsukita *et al.*, 2001), tandis que les récentes études en cryofracture ont permis de montrer que les chaînes de jonctions serrées d'une cellule sont associées à ceux de la cellule adjacente (Sasaki *et al.*, 2003). Ces zones de contacts membranaires apparaissent, par cryofracture, sous forme d'un réseau continu de fibres ramifiées et anastomosées qui entoure l'apex de chaque cellule (Gonzales-Mariscal *et al.*, 2003). Ces fuseaux intermembranaires sont formés de polymères de protéines membranaires, les claudines et l'occludine. Ces deux protéines possèdent quatre domaines transmembranaires. De plus, deux autres types de protéines transmembranaires, plus récemment identifiées, sont associés aux jonctions serrées, nommées JAMs (Molécules d'Adhésion Jonctionnelle) et Crumb (Matter et Balda, 2003 ; Zahraoui, 2004). Ces protéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette via des protéines cytoplasmiques.



Vers la fin des années 80, des études biochimiques et d'immunocytochimie ont permis d'identifier une protéine de 225 kDa nommée ZO-1 comme étant le premier polypeptide exclusivement associé aux jonctions serrées (Stevenson *et al.*, 1986), ZO-2 et ZO-3 ont été identifiées plus tard (Gumbiner *et al.*, 1991 ; Haskins *et al.*, 1998).

Dans les cellules épithéliales, les jonctions serrées forment une barrière continue au niveau apical des membranes latérales qui empêche la diffusion de solutés dans le passage paracellulaire en plus de créer une barrière de diffusion au niveau de la membrane plasmique afin de créer et de maintenir les domaines apical et basolatéral (Tepass, 2003 ; Tsukita et Furuse 2002). Elles régulent de cette façon à la fois la perméabilité paracellulaire, mais également la diffusion intramembranaire en restreignant le passage de lipides et de protéines entre la partie apicale et la partie basolatérale de certains composants membranaires, en effet, la composition et le fonctionnement de ces deux pôles diffèrent (Rodriguez-Boulant et Nelson, 1989 ; Kobayashi *et al.*, 1992). De cette façon, les jonctions serrées contribuent au maintien de la polarité cellulaire (Balda et Matter, 1998).

Des études récentes ont montré la complexité des jonctions serrées, qui forment un échafaudage macromoléculaire composé de protéines membranaires et cytoplasmiques essentielles au maintien de l'adhérence cellule-cellule et au contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la polarité cellulaire (Miyoshi et Takai, 2005 ; Van Itallie et Anderson, 2006).

#### 2.3.3.1 Les protéines transmembranaires

Les jonctions serrées sont composées de deux formes de protéines transmembranaires, les claudines et l'occludine. Elles forment le 'squelette' des jonctions serrées.

L'occludine est la première des protéines transmembranaires à avoir été identifiée dans les jonctions serrées (Furuse *et al.*, 1993). C'est une protéine de 65 kDa qui comprend quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires. Il a été démontré que l'occludine était localisée uniquement au niveau des jonctions serrées, elle serait donc incorporée directement et que l'intensité du marquage de l'occludine était directement corrélée avec le nombre de jonctions serrées (Saitou *et al.*, 1997). Cependant, il a été montré si des cellules souches étaient déficientes pour occludine, les jonctions serrées se formaient normalement et des études de cryofracture ont permis de démontrer

que les jonctions serrées n'avaient pas une morphologie différente (Saitou *et al.*, 1998 ; 2000). De plus, dans les testicules humains, même si ils possèdent des jonctions serrées, entre les cellules de Sertoli l'occludine n'est pas détectée (Moroi *et al.*, 1998). Ceci a permis d'identifier une seconde protéine transmembranaire jouant un rôle crucial pour la formation des jonctions serrées (Furuse *et al.*, 1998), la claudine (Cldn), qui n'avait aucune similitude de séquence avec l'occludine. Les claudines sont en fait une famille de protéines dont plus de vingt membres ont été identifiés jusqu'à maintenant (Morita *et al.*, 1999 ; Tsukita et Furuse, 1999b). Il semblerait que les claudines soient le véritable 'squelette' des jonctions serrées. En effet, par microscopie électronique, les claudines semblent être presque toujours exclusivement localisées au niveau des jonctions serrées (Morita *et al.*, 1999b ; Morita *et al.*, 1999c), et de plus, l'occludine n'est pas capable de former seule des réseaux aussi organisés, tandis que les claudines sont capables de reformer des réseaux de jonctions serrées lorsqu'on transfectent des fibroblastes avec le gène de Cldn-1 ou Cldn-2 (Furuse *et al.*, 1998). Chaque claudine va entraîner une certaine perméabilité des jonctions, ainsi selon les organes le patron d'expression va différer pour lui conférer une perméabilité propre (Van Itallie et Anderson, 2006).

Un troisième acteur a ensuite été identifié comme faisait partie des protéines transmembranaires de jonctions serrées, il s'agit de JAM (pour Junctional Adhesion Molecules). Les protéines JAM, qui sont composées de trois protéines, possèdent un seul domaine transmembranaire. Contrairement aux claudines et à l'occludine, JAM est exprimée dans les plaquettes et les leucocytes, ce qui nous amène à penser que cette protéine aurait un double rôle. En effet, cette protéine serait, en plus de son rôle au niveau des jonctions, impliquée au niveau immunitaire (Martin-Padura *et al.*, 1998 ; Ebnet *et al.*, 2004). Crumb (Crb), une protéine présentant un domaine transmembranaire unique, a elle été récemment identifiée comme faisant partie des protéines transmembranaires des jonctions serrées. Crb est exprimée dans les neurones, les cellules épithéliales et les cellules photoréceptrices (Knust et Bossinger, 2002). Enfin, récemment une nouvelle protéine a été découverte, la tricelluline. Elle est spécifique aux jonctions serrées qui prennent place entre trois cellules adjacentes. Cependant si l'expression de cette protéine était supprimée par des ARN d'interférence, les jonctions serrées tricellulaires, mais aussi bicellulaires étaient désorganisées, et de plus l'intégrité de la

barrière était compromise. Cette protéine joue donc un rôle primordial dans les jonctions serrées (Ikenouchi *et al.*, 2005).

### 2.3.3.2 Les protéines cytoplasmiques

Les protéines membranaires constituent le noyau d'un échafaudage moléculaire relié à une multitude de protéines cytoplasmiques. Celles-ci peuvent être réparties en deux groupes. Le premier groupe est composé de protéines à domaine PDZ telles que Zonula-occludens-1 (ZO-1), ZO-2 et ZO-3 ; MUPP1 (pour *Multi-PDZ domain protein 1*), Par-3 et Par-6, MAGI-1 à -3 (pour *membrane associated guanylate kinase with inverted domain structure*). Les domaines PDZ sont capables de reconnaître un motif particulier situé à l'extrémité C-terminale des protéines membranaires (Matter et Balda, 2003). Ce sont des adaptateurs moléculaires permettant la liaison des protéines membranaires avec le cytosquelette d'actine ou à des protéines régulatrices.

Le second groupe de protéines cytoplasmiques comprend lui des protéines régulatrices, tels que par exemple Cdc42, cinguline, symplekine ou ZONAB (Schneeberger et Lynch, 2004).

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement à ZO-1. ZO-1 est une protéine cytoplasmique qui est impliquée à la fois dans la formation des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. Ce fut la première protéine impliquée dans les jonctions serrées à être identifiée (Stevenson *et al.*, 1986). Cette protéine, d'un poids de 225 kDa appartient à la famille des MAGUKs (Membrane-Associated Guanylate Kinases), et elle a pour propriété de s'associer directement aux filaments d'actine ainsi qu'aux protéines cytoplasmiques de la jonction serrée (Fanning *et al.*, 1998). Cependant, elle co-localise d'abord avec E-Cad au niveau de la jonction d'adhérence (Itoh *et al.*, 1991 ; Itoh *et al.*, 1993). Puis, lorsque les jonctions adhérentes sont formées, les protéines des jonctions serrées sont recrutées. ZO-1 co-localise alors avec les claudines et occludine à mesure que les jonctions serrées migrent vers le pôle apical. ZO-1 a été détectée dans l'épididyme. Cette protéine est localisée chez le rat Wistar principalement dans le segment initial de l'épididyme, ainsi que dans la tête (Levy et Robaire, 1999) au niveau des jonctions serrées, tandis que sa localisation est uniquement cytoplasmique dans la région de la queue. De plus, il a été montré que chez les rats âgés son expression disparaît presque complètement, ce qui était concomitant avec une baisse de l'expression

de E-Cad et une disparition de l'occludine. Il en résultait d'ailleurs une augmentation de la perméabilité au niveau des jonctions serrées.

### 2.3.3.3 Mise en place et régulation

La mise en place des jonctions serrées est subséquente à celle des jonctions adhérentes. Suite à la liaison de deux E-Cad provenant de cellules adjacentes, on observe alors la mise en place d'un complexe jonctionnel qui comprend les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Suit une cascade complexe débutant par l'activation de protéines régulatrices comme les petites protéines G Cdc42 ou Rab13, puis il y a stabilisation des contacts intercellulaires et activation de la protéine kinase C atypique (PKCa). Cette dernière va jouer un rôle déterminant dans la régulation de l'assemblage des jonctions serrées. La PKCa va ensuite former un complexe avec Par-3 et Par-6. Par-6 contient un domaine CRIB (*Cdc42/rac interactive binding*) capable de se lier à la forme active de Cdc42, qui régulerait l'activation du complexe Par6/Par3/PKCa nécessaire pour promouvoir la maturation des jonctions serrées fonctionnelles (Cereijido *et al.*, 2000 ; Itoh *et al.*, 2001).

Chez les mammifères, la protéine JAM sert de point d'ancrage à Par-3, permettant ainsi le recrutement du complexe Par-6/Par-3/PKCa au niveau des jonctions serrées (Itoh *et al.*, 2003). Ce complexe va stimuler la formation de deux jonctions, adhérente et serrée, séparées et matures. La PKCa est régulée négativement par la protéine phosphatase 2A (PP2A), qui la déphosphoryle. Ainsi, les épisodes de phosphorylation/déphosphorylation, via la PKCa et la PP2A, sont primordiaux dans l'assemblage et le désassemblage des jonctions serrées (Dodane et Kachar, 1996).

Finalement, Rac, Rho et Rab, qui sont trois familles appartenant aux groupes des petites protéines G, sont impliquées dans la régulation des jonctions serrées via des mécanismes à la fois morphologiques et biochimiques (Bruewer *et al.*, 2004 ; Mruk *et al.*, 2005). Étant donné le rôle crucial de Rho et de Rac dans la dynamique du cytosquelette d'actine et l'importance de ce dernier dans l'établissement et le maintien de l'intégrité des jonctions serrées, il est probable que ces deux protéines G altèrent localement le réseau d'actine-myosine requis pour l'immobilisation de complexes macromoléculaires au niveau des jonctions serrées (Jou *et al.*, 1998).

Le calcium joue également un rôle de régulateur des jonctions serrées. Premièrement il est impliqué dans la mise en place des jonctions adhérentes, dont la formation est étroitement liée à celle des jonctions serrées. Mais de plus, si on enlève le calcium du milieu cellulaire, alors les jonctions serrées ne sont pas formées, les cellules ne sont alors pas polarisées. Le calcium est également important dans la maintenance des jonctions serrées puisque leur perméabilité peut être modulée avec du calcium (Martinez-Palomo *et al.*, 1980 ; Cereijido *et al.*, 2000).

Enfin, l'expression de certaines claudines a été démontrée comme étant dépendante des androgènes chez le rat. Gregory *et al.* (2001) ont mis en évidence la régulation de l'immunolocalisation de Cldn-1 par la testostérone dans le segment initial de l'épididyme, par contre dans les autres segments l'orchidectomie n'avait pas d'effet sur Cldn-1. Récemment Meng *et al.* (2005) ont mis en évidence une régulation par la testostérone de la Cldn-3 dans le testicule via les récepteurs aux androgènes situés dans les cellules de Sertoli.

#### 2.3.3.4 La barrière hémato-épididymaire

La barrière hémato-épididymaire est une composante essentielle de la fonction reproductrice masculine. En effet, elle va permettre de préserver un environnement luminal spécifique dans cet organe, processus primordial pour développer des gamètes fonctionnels. Le fluide séminal de l'épididyme provient du testicule et contient de l'eau ainsi que divers ions, protéines et autres molécules ainsi que les spermatozoïdes. La composition du fluide séminal variera au long de sa progression dans le canal épididymaire. De plus, la barrière hémato-épididymaire joue un rôle protecteur puisqu'elle permet de protéger les gamètes qui sont antigéniques d'une attaque du système immunitaire ainsi que de xénobiotiques ou de produits toxiques (Hinton, 1995). Friend et Gilula (1972) furent les premiers à décrire l'anatomie de la barrière hémato-épididymaire, décrivant des jonctions serrées entre les cellules principales adjacentes de l'épididyme qui empêchait le passage de traceurs venant de la circulation sanguine. Puis sa présence fut confirmée quand Suzuki et Nagano (1976), par des études de cryofracture, ont mis en évidence le réseau de jonctions serrées entre les cellules principales de l'épididyme. De plus, ils montraient que le nombre et la complexité de ces jonctions

variaient le long de l'organe. Mais la démonstration de la fonctionnalité de la barrière fut démontrée par Hoffer et Hinton (1984) qui ont mis en évidence que le lanthanum et l'inuline, deux composés utilisés pour évaluer la perméabilité des jonctions serrées, étaient incapables de franchir les jonctions serrées pour arriver jusque dans la lumière. Des études menées par Agarwal et Hoffer (1989) avaient mis en évidence qu'à partir du jour quatorze chez le rat, le nombre de jonctions étanches augmente. De plus, il était avancé que la formation de la barrière hémato-épididymaire dans la tête de l'épididyme était complète à l'âge de 18 jours et à l'âge de 21 jours dans l'ensemble de l'épididyme. Mais cette certitude a récemment été mise en doute lorsque Guan *et al.* (2005) ont pu montrer la présence de jonctions fonctionnelles dès le jour 7, puisqu'elles stoppaient la progression du traceur utilisé pour vérifier leur perméabilité. Cependant l'intégrité de la barrière ne sera pas maintenue durant toute la vie de l'animal. En effet, Levy et Robaire (1999) ont mis en évidence une perte de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la barrière hémato-épididymaire quand les rats devenaient plus âgés. Cette baisse était imputable à des modifications au niveau des protéines jonctionnelles composant la barrière.

Dans l'épididyme, la claudine-1 (Cldn-1) est présente ainsi que les claudines (Cldns) -2, -3, -4, -5 -7, -8,- 9, -11 ainsi que la Cldn-16. (Gregory et Cyr, 2006). Cependant leur distribution varie en fonction des régions de l'épididyme, par exemple la Cldn-16 est, chez les rats adultes, présente uniquement dans le segment initial. Dans une autre souche de rat, Guan *et al.* (2005) ont montré la présence de ces différentes claudines en plus de la Cldn-10. Cependant, chez les rats Wistar, la Cldn-6 et la Cldn-9 n'étaient présentes chez les rats âgés de 7 jours mais pas chez les adultes. La Cldn-1 est présente dans l'épididyme au niveau des jonctions serrées mais aussi a été mise en évidence par immunocytochimie, le long de la membrane latérale des cellules principales, entre les cellules principales et les cellules basales (Gregory *et al.*, 2001). Des études faites dans le tractus gastro-intestinal montrent que c'est également le cas pour d'autres claudines dans ces organes. Ainsi, cela pourrait constituer des réserves de claudines avant que celles-ci ne soient incorporées dans les jonctions serrées (Rahner *et al.*, 2001). L'occludine est présente dans l'épididyme et son expression varie en fonction des segments (Levy et Robaire, 1999). En effet, elle est exprimée de façon particulièrement importante dans la

tête et la queue. De plus, tandis que son expression augmente encore chez des rats âgés, dans tous les autres segments de l'épididyme son expression décroît avec l'âge.

Il a été de surcroît mis en évidence par DeBellefeuille *et al.* (2003), que durant la mise en place de la barrière hémato-épididymaire, ZO-1 et  $\beta$ -cat étaient très solidement associées et que ce lien diminuait à mesure que la mise en place de la barrière était complétée.

## 2.4 Régulation hormonale de l'épididyme

### 2.4.1 Régulation par les androgènes

Les fonctions luminales et épithéliales de l'épididyme sont régies par un contrôle hormonal complexe. Les androgènes sont particulièrement importants lors du développement embryonnaire, lors de la différenciation des organes, mais également lors du développement post-natal. En effet une castration entraîne une atrophie de l'épididyme (Karkun *et al.*, 1974 ; Fan et Robaire, 1998), même si le phénomène est moins important que pour d'autres glandes accessoires telles la prostate ou les vésicules séminales (Brooks, 1979) . On observe une baisse du diamètre de la lumière ainsi qu'une réduction de la hauteur des cellules, notamment dans les cellules principales qui semblent plus susceptibles que les autres aux niveaux d'androgènes et notamment leur activité sécrétoire en est diminuée, elles perdent même la majorité de leur microvilli (Ratna-Kumar *et al.*, 1988). Les spermatozoïdes quant à eux, sont non motiles, n'ont plus de pouvoir fécondant et meurent (Dyson et Orgebin-Crist, 1973; Chaturapanich *et al.*, 1992 ; Akhondi *et al.*, 1997 ; Robaire et Henderson, 2006). Cependant, si les niveaux de testostérone sont restaurés, cela permet de renverser le phénomène sauf dans le segment initial (Palladino et Hinton, 1994 ; Robaire *et al.*, 1977).

Comme pour les autres organes qui dépendent des niveaux d'androgènes circulants comme la prostate ventrale ou les vésicules séminales, l'action des androgènes dans l'épididyme est effectuée par la DHT. Sa présence a été démontrée en 1972, suite à sa détection dans le noyau de cellules de l'épididyme après avoir injecté de la testostérone (Tindall *et al.*). De plus, tel que démontré en 1976 par Orgebin-Crist *et al.*, la DHT est plus efficace que la testostérone pour maintenir les fonctions épididymaires *in vitro*. Ainsi, la DHT est l'androgène qui permet à l'épididyme de conserver sa structure et d'assurer ses fonctions de maturation et de stockage des spermatozoïdes (Robaire et Hermo, 1988). La testostérone est convertie en DHT par la 5 $\alpha$ -réductase (Inano *et al.*, 1969). La 5 $\alpha$ -

réductase est très importante dans l'épididyme (Normington et Russell, 1992). De plus si les rats sont en état de déficience pour les androgènes cela entraîne une baisse de l'activité de l'AR et de la 5  $\alpha$ -réductase, ainsi les mécanismes d'action des androgènes seraient inefficaces lors d'un retrait des androgènes (Zhu *et al.*, 2000) dans l'épididyme. Il existe deux isoformes de 5 $\alpha$ -réductase, qui sont tous deux présents en abondance dans l'épididyme. Ces isoformes sont présents exclusivement dans les cellules principales, mais qui possèdent chacun une distribution et une régulation propre (Viger et Robaire, 1996). Lors d'études faites avec le PNU157706, un inhibiteur des deux isoformes de la 5 $\alpha$ -réductase, il a été démontré que l'utilisation de ce produit entraînait d'importants effets sur l'expression de différents gènes. Ces derniers étaient notamment impliqués dans tous les processus essentiels pour la formation de l'environnement luminal spécifique de l'épididyme, indispensable à la maturation des spermatozoïdes. L'exposition au PNU157706 avait également des effets sur les spermatozoïdes, tant au niveau de leur maturation que de leur motilité. En effet, ces spermatozoïdes perdaient leur pouvoir fécondant (Henderson *et al.*, 2004 ; Henderson et Robaire, 2005).

#### 2.4.2 Autres facteurs de régulation

En plus des androgènes, d'autres facteurs jouent un rôle dans la régulation de l'épididyme, tels que la prolactine (Jabbour *et al.*, 1998), ainsi que l'acide rétinoïque (Akmal *et al.*, 1996 ; Sundaram *et al.*, 1998). L'étude des œstrogènes dans le système mâle est récente et semble ambivalente. Tandis que Hess *et al.* ont montré en 1997a, que chez des souris déficientes pour les récepteurs à l'œstrogène, il y avait un effet sur la réabsorption du fluide luminal dans la tête de l'épididyme. Il en résulte l'infertilité puisque les spermatozoïdes sont alors moins concentrés que la normale. Cependant l'inverse, soit un excès d'œstrogènes, mène au même résultat (Carreau, 2003). L'épididyme possède des récepteurs spécifiques pour les œstrogènes (Hess *et al.*, 1997b). Chez des souris déficientes pour ER $\alpha$ , leur épididyme est affecté, tel que l'apparition de cellules apicales, étroites et claires anormales et elles sont infertiles. (Hess *et al.*, 2000). Chez le rat, même si les résultats obtenus étaient différents, puisque selon les études ER $\alpha$  est principalement présent dans le segment initial, tandis que les autres régions montrent un marquage immunocytochimique moins important (Hess *et al.*, 1997a) ou bien



totallement absent dans l'épididyme (Fisher *et al.*, 1997 ; Hess 2003), la technique de RT-PCR a permis de confirmer sa présence dans les tissus de l'épididyme (Saunders *et al.*, 2001). Puis a été faite la découverte d'une seconde forme, ER $\beta$ , qui nécessite encore des investigations quant à son action, et qui elle aussi présente dans l'épididyme (Hess *et al.*, 1997a ; Hess, 2003). Cependant, des souris déficientes pour ER $\beta$  sont fertiles et possèdent un épидидyme (Krege *et al.*, 1998). La présence de l'aromatase, qui sert à la conversion des androgènes en œstrogènes a été démontré par immunohistochimie dans de nombreuses espèces, notamment chez le rat et l'humain (Janulis *et al.*, 1998; Lambard *et al.*, 2004) dans les spermatozoïdes qui traversent l'épididyme, au niveau de la gouttelette cytoplasmique. Le marquage décroît à mesure de la progression des spermatozoïdes dans le canal épидидymaire. Par contre, l'aromatase ne semble pas présente dans l'épididyme, puisque lors d'expériences menées par Schleicher *et al.* (1989) aucune aromatisation de la testostérone n'a été observée, ainsi ce serait la production des œstrogènes par les spermatozoïdes qui serait leur première source dans la lumière de l'épididyme.

## 2.5 Les lignées cellulaires d'épididyme

Malgré l'importance de cet organe dans la reproduction, peu de lignées cellulaires épидидymaires existent. Dans le début des années 80, différents laboratoires mirent au point une lignée des lignées à partir de cellules épithéliales épидидymaires de rats, provenant soit d'un âge particulier (Kierszenbaum *et al.*, 1981), soit provenant uniquement de la tête de l'épididyme (Kleinfelter *et al.*, 1982). Le problème essentiel de ces lignées était leur faible durée de vie. Une nouvelle lignée a été mise au point par Araki *et al.* (2002) à partir de cellules épидидymaires de souris qui ont été immortalisées à l'aide du gène de l'antigène grand T-SV40. Cette lignée est non seulement stable pendant plus de 6 mois, mais elle exprime des caractéristiques des cellules principales de l'épididyme. De plus, elles sont sensibles à la température et ne croient que lorsqu'elles sont à une température de 33°C, température où se trouve l'épididyme dans le corps des mammifères. Des lignées de cellules épithéliales d'origine canines et murines ont également été immortalisées par Kirchhoff *et al.* (2004). Britan *et al.* (2004) ont eux aussi développé et caractérisé une lignée de cellules épидидymaires murines qui sont polarisées et possèdent des complexes jonctionnels. Tandis que l'équipe de Tabuchi

(2005) a réussi à développer une lignée qui ne croit qu'à 33°C qui exprime des protéines spécifiques de l'épididyme, telles SGP-2, mais également les récepteurs pour les androgènes et pour l'acide rétinoïque. Cependant la première lignée immortalisée de cellules épидидymaires de rat a été développée et caractérisée dans notre laboratoire (Dufresne *et al.*, 2005). Les cellules RCE possèdent les mêmes caractéristiques que des cellules principales épидидymaires de rats *in vivo*. Bien que ces cellules ne semblent pas répondre aux androgènes, elles possèdent cependant l'ARNm pour le récepteur aux androgènes, de même que pour celui aux œstrogènes. Elles expriment de plus de nombreuses protéines de jonctions, tant pour les jonctions adhérentes comme E-Cad, que pour les jonctions serrées comme les Cldns, de même que certaines Cxs.

### Section 3. La prostate

Durant le développement fœtal, la corde urogénitale se différencie en la prostate, le pénis et le scrotum, suite à une réduction de la testostérone fœtale en DHT (Cunha *et al.*, 1987). La prostate appartient au groupe des glandes accessoires du système reproducteur. Chez le rat, elle est située immédiatement en dessous de la vessie et entoure la partie proximale de l'urètre. Sa croissance et sa régression dépendent du niveau d'androgènes circulants. Environ 30% du fluide séminal provient de la prostate (Flickinger, 1971). Ce dernier possède un pH acide et est composée de peu de protéines contenant surtout des acides aminés libres. Le magnésium, le zinc, le calcium et le citrate présents dans le liquide séminal proviennent en majorité de la prostate (Janulis et Lee, 1999). La nécessité de la prostate est remise en cause depuis qu'il a été montré que les spermatozoïdes de l'épididyme sont capables de féconder l'ovule et que l'ablation de la prostate ventrale n'abolit pas la fertilité masculine (Queen *et al.*, 1981).

Une protéine caractéristique de la prostate est l'antigène spécifique de la prostate (PSA), cette protéine est recherchée et suivie lors de dépistage de tumeurs prostatiques (Gretzer et Partin, 2003).

#### 3.1 Structure

La prostate est une glande tubulo-alvéolaire qui est composée de canaux doublés d'un épithélium prismatique pseudo-stratifié. Elle est formée de deux composantes, une composante glandulaire formée d'un système de canaux ramifiés terminés par des acini glandulaires, chaque glande étant revêtue par une double couche de cellules et d'une capsule fibro-élastique, qui est la composante stromale constituée de cellules musculaires lisses (Hayashi *et al.*, 1991 ; Hayward et Cunha, 2000).

Selon le modèle de McLean, trois bourgeons se détachent de l'urètre et vont être à l'origine de trois zones glandulaires distinctes. La zone périphérique contient la plupart des canaux et est le lieu de départ des carcinomes, elle correspond à la partie postérieure de la prostate. La zone centrale, qui constitue la base de la prostate, contient elle aussi un nombre important de canaux et est traversée par les canaux éjaculateurs. Enfin il existe une zone transitionnelle, constituée de deux territoires situés de part et d'autres de

l'urètre prostatique et qui est le site d'initiation des hyperplasies bénignes de la prostate (BPH) (McNeal, 1988).

Ces trois zones peuvent également être identifiées comme trois différents lobes, qui sont appelés lobe ventral, lobe dorsal et lobe latéral relativement à leur position vis-à-vis de l'urètre (Kumar et Majumder, 1995). Chacun des lobes a des fonctions particulières et a une réponse différente aux androgènes comme nous le verrons plus loin. (Prins 1989; Banerjee *et al.* 1993; Banerjee *et al.* 1995).

### 3.2 Types cellulaires

Glandes et canaux excréteurs consistent en un épithélium simple cylindrique. Les alvéoles glandulaires sont plissées et très ramifiées et pourvue d'une large lumière. L'épithélium est constitué de cellules glandulaires claires au noyau basal arrondi, et elles possèdent des micro-villosités irrégulières. Un tissu conjonctif riche en vaisseaux remplit l'espace entre les alvéoles (Hayward et Cunha, 2000).

Les cellules épithéliales qui tapissent les canaux prostatiques consistent en une double couche de cellules. Tout d'abord des cellules basales situées à la partie externe de la glande. Ce sont de petites cellules indifférenciées riches en kératine. Chez le rat elles représentent moins de la moitié des cellules épithéliales (El-Alfy *et al.*, 2000). Ces cellules ont un noyau large irrégulier avec un petit cytoplasme. Leur rôle principal est leur capacité de prolifération (Evans et Chandler 1987; Bonkhoff *et al.*, 1994). On suppose que les cellules basales, seraient les cellules souches de la prostate et donneraient ensuite des cellules sécrétantes.

La majorité de l'épithélium est constituée des cellules muco-sécrétantes situées du côté endoluminal de la glande et dont la sécrétion s'accumule dans la lumière glandulaire. Leur turn-over est très lent et elles sont remplacées afin de maintenir l'homéostasie de l'organe. Ce sont de hautes cellules, cylindriques qui sont complètement différenciées, connectées ensemble par des molécules d'adhésion cellulaire. Leur noyau est situé à la base de la cellule. En plus des cellules muco-sécrétantes et basales, il existe un troisième type de cellules : les cellules neuroendocrines (cellules endocrines/paracrines) qui s'observent dans les acini et les canaux excréteurs de la prostate et joueraient un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire (Guthrie *et al.*, 1990).

La membrane basale sur laquelle reposent les cellules épithéliales sert d'interface avec le tissu stromal. Le stroma est composé de fibroblastes, de cellules musculaires lisses, d'axones, de capillaires et de cellules endothéliales. Les cellules stromales jouent un rôle central pour déterminer la destinée des cellules épithéliales. En effet, bien que les androgènes aient un rôle mitogènes dans la prostate *in vivo*, ils n'ont pas d'effets sur des cellules épithéliales en culture. Il est nécessaire de pratiquer une co-culture avec les cellules stromales pour induire une réponse mitogénique dans des cellules épithéliales isolées (Isaacs, 1987 ; McNeal *et al.*, 1990).

### 3.3 Régulation hormonale

Les androgènes produits dans les testicules sont indispensables à la fois durant l'embryogenèse pour promouvoir la différenciation de la glande prostatique, mais également pour promouvoir sa croissance durant le développement post-natal (Cunha *et al.*, 1987 ; Kumar et Majumder, 1995). Dans la prostate mature, les androgènes agiraient principalement dans le muscle lisse de la prostate, où le récepteur AR est exprimé, afin de maintenir un épithélium différencié (Nemeth *et al.*, 1997). En effet, le retrait des androgènes, par orchidectomie, conduit à un phénomène appelé autophagie, caractérisé par une accélération de l'involution des cellules et d'importants changements métaboliques et entraîne également des changements dans la conformation de l'épithélium, notamment les microvilli qui disparaissent et mènent finalement à l'apoptose (Sugimura *et al.*, 1986 ; Mirosevich *et al.*, 1999). Les cellules basales chez le rat et l'humain n'exprimeraient pas l'AR (Wernert *et al.* 1988, Masai *et al.* 1990, Mobbs et Lin 1990, Ruizeveld de Winter *et al.* 1990, Zegers *et al.* 1991) bien qu'une étude ait identifié un marquage positif dans certaines cellules basales humaines cancéreuses mais aussi normales (Bonkhoff et Remberger, 1993). Les cellules luminales expriment l'AR et suite à une castration une importante apoptose est observée dans ces cellules (Isaacs *et al.* 1992). Une étude de Mirosevitch *et al.* (1998) a démontré que la testostérone avait un rôle direct et indirect sur la prostate ventrale. En effet, les cellules luminales qui possèdent l'AR et celles qui ne le possèdent pas, dans des souris normales comme dans des souris castrées puis traitées avec de la testostérone, montraient toutes une activité proliférative. Par contre, les cellules basales n'affichaient pas d'activité de prolifération.

Les androgènes exercent différents mécanismes qui vont réguler l'équilibre entre la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Huynh *et al.*, 2001 ; Cunha *et al.*, 2004). Cependant, le développement de la prostate ventrale est particulièrement dépendant des androgènes circulants tandis que les autres lobes y sont moins sensibles. Ainsi, lors de la castration de rat, une atrophie de la prostate ventrale va très vite être observée (Prins *et al.*, 1991, Kwong *et al.*, 1999). La testostérone agit comme une prohormone dans la prostate. En effet, il a été montré que si des individus possèdent une déficience dans la 5 $\alpha$ -réductase, qui va permettre de transformer la testostérone en DHT, la croissance de la prostate est quasi-inexistante (George *et al.*, 1991). De plus, une inhibition par des agents pharmacologiques de la 5 $\alpha$ -réductase mène à une diminution des niveaux de DHT dans la prostate à ceux retrouvés dans des animaux castrés (Rittmaster, 1997). La prostate diminue alors de taille, malgré un niveau normal de testostérone dans le sérum (Rittmaster, 1994). A mesure que les niveaux de DHT dans la prostate diminuent, ceux de testostérone augmentent, mais malgré de faibles niveaux de DHT la prostate ne s'atrophie pas autant que chez des animaux castrés (Rittmaster *et al.* 1995 ; Rittmaster *et al.* 1996). La 5 $\alpha$ -réductase est localisée à la fois dans le compartiment épithélial et dans le compartiment stromal.

La dépendance aux androgènes des cellules épithéliales est évidente puisque suite à un retrait des androgènes, on observe une baisse de 90% du nombre de cellules, de 80% du volume et d'une réduction de 60% de leur hauteur (English *et al.*, 1987). Le récepteur aux androgènes est présent dans les cellules épithéliales luminales, les cellules des muscles lisses ainsi que dans un pourcentage variable de cellules des lobes ventraux, latéraux et dorsaux de la prostate de rat adulte (Prins *et al.*, 1991). Les cellules luminales épithéliales du lobe ventral, sont apparues comme plus intensément marquées, lors d'études d'immunolocalisation, que celles des lobes dorsaux ou latéraux. Par contre, pour les trois lobes, les cellules basales et les cellules endothéliales ne présentent pas de marquage pour l'AR. Bien que certaines cellules stromales des lobes ventraux et dorsaux présentent un marquage positif du récepteur aux androgènes, la majorité est négative. La conversion de la testostérone en DHT mène à un complexe stéroïde-récepteur plus stable qui potentialise les fonctions de la prostate ainsi que sa croissance (Grino *et al.*, 1990; Deslypere *et al.* 1992; Zhou *et al.* 1995). En effet, en utilisant des AR recombinant dans des

cellules COS, il a été montré que le complexe testostérone-AR se dissociait trois fois plus vite que celui avec la DHT (Zhou *et al.*, 1995). Cependant, une inhibition de la 5 $\alpha$ -réductase chez des animaux castrés et non-castrés a permis de mettre en évidence que la testostérone est plus puissante que la DHT pour stimuler l'expression de beaucoup de gènes androgène-dépendants (Dadras *et al.*, 2001).

Si les testicules sont responsables de la production des androgènes qui sont primordiaux pour le développement de la prostate, les testicules secrètent également des facteurs non-androgéniques, de nature protéique qui vont travailler de concert avec les androgènes pour promouvoir le développement de la prostate (Lee *et al.*, 1997).

De plus, il a été démontré que les œstrogènes jouaient aussi un rôle dans le développement de la prostate ventrale, mais que leur récepteur, contrairement à celui des androgènes majoritairement situé dans l'épithélium prostatique, étaient localisés dans le tissu stromal en grande majorité (Jung-Testas *et al.*, 1981). Ainsi, le tissu stromal serait la cible majoritaire des œstrogènes pour contrôler le développement prostatique. Un exemple d'imprégnation négative néonatale, est qu'une brève exposition à des œstrogènes chez des rats mâles résulte en une suppression permanente de la croissance de la prostate et réduit également sa sensibilité à la testostérone lors de l'atteinte du stade adulte (Prins 1992). Les œstrogènes chez les mâles dérivent de la conversion de la testostérone par l'enzyme aromatase P450. Les œstrogènes sont également utilisés de façon thérapeutique pour inhiber l'action des androgènes (i.e. diethylstilbestrol) (Makela *et al.* 1990; Yamashita *et al.*, 1996). Leur action n'est pas de bloquer directement l'action des androgènes mais plutôt de façon indirecte en inhibant le relâchement de LH et ainsi réduire la stéroïdogénèse. Il a été montré que, chez des souris, de faibles doses d'œstrogènes potentialisent la croissance de la prostate tandis que de fortes doses provoquent l'effet inverse (vom Saal *et al.*, 1997). Cependant c'est un rôle à double tranchant puisque les œstrogènes peuvent également induire une hyperplasie nodulaire ou des lésions malignes dans la prostate, et peuvent avoir un effet négatif sur la croissance de la prostate (Harkonen et Makela, 2004), alors que les œstrogènes ont été utilisés comme traitement pour le cancer de la prostate. De plus, une exposition néonatale aux œstrogènes induit une altération de l'adhésion cellulaire ainsi que de la communication cellulaire entre les cellules (Habermann *et al.*, 2002).

### 3.4 Prostate et interactions cellulaires

E-cadhérine est présente dans la prostate ventrale (Takeichi, 1991 ; Graff *et al.*, 1995 ; Paul *et al.*, 1997). Les différentes caténines sont aussi exprimées dans la prostate (Aremas *et al.*, 2000). De nombreuses études ont démontré leur implication lors du cancer de la prostate, ce qui sera exposé dans la section 3.6.

La présence de la Cx43 dans la prostate ventrale humaine est encore controversée. En effet, dans certaines études, cette protéine est détectée, même si les niveaux en sont très bas (El-Hafy *et al.*, 2000), tandis que d'autres affirment qu'elle est indétectable (Meda *et al.*, 1993 ; Mehta *et al.*, 1996 ; Mehta *et al.*, 1999). La Cx32, quant à elle, est localisée dans la prostate ventrale entre les cellules basales et les cellules luminales (Habermann *et al.*, 2002). En fait, il y aurait également une différence au niveau de la localisation, les cellules basales communiqueraient via la Cx43 tandis que les cellules luminales le feraient avec la Cx32 (Habermann *et al.*, 2002). Chez le rat, la Cx43 serait exprimée dans la prostate immature, tandis que la Cx32 serait exprimée dans la prostate des individus adultes (Habermann *et al.*, 2001). La Cx43 serait de plus, contrairement à la Cx32, régulée par les androgènes (Jarred *et al.*, 2000 ; Huynh *et al.*, 2001).

Dans la prostate ventrale, il déjà été démontré que la claudine-1 (aussi nommée SEMP-1) était présente (Swisshelm *et al.*, 1999). De plus, la claudine-3 et -4 ont également été identifiées dans la prostate (Long *et al.*, 2001 ; Nichols *et al.*, 2004), de même que la Cldn-7 (Zheng *et al.*, 2003).

### 3.5 Barrière hémato-prostatique.

Depuis longtemps les barrières hémato-testiculaire et hémato-épididymaire ont été décrites, mais la caractérisation d'une telle barrière dans la prostate ventrale, n'avait reçu jusqu'à très récemment que peu d'intérêt, même si l'existence de jonctions serrées entre les cellules épithéliales de prostate ventrale, avaient été démontrée par des analyses d'ultrasstructure (Douglas *et al.*, 1980 ; Kachar et Pinto da Silva, 1981). Fulmer et Turner (2000) ont démontré l'existence d'une barrière hémato-prostatique qui possède des caractéristiques identiques à la barrière hémato-testiculaire, qui est donc capable de restreindre le passage des molécules inertes, mais également les cellules du système immunitaires tels que les leucocytes. Une étude portant sur des cellules basales de la



prostate a permis de démontrer qu'une barrière sélective formée de jonctions serrées existerait également entre les cellules basales (El-Afy *et al.*, 2000).

### 3.6 Prostate et cancer

Le cancer de la prostate est l'un des plus dévastateurs, il est devenu chez les hommes, depuis les années 90, le cancer le plus fréquemment diagnostiqué au Canada, dépassant le cancer du poumon (Levy *et al.*, 1997 ; McDavid *et al.*, 2004). Le cancer de la prostate, comme tous les cancers, est associé à des cellules immortelles, qui perdent leur inhibition de contact et leur capacité de communiquer avec les autres cellules (Budunova et William, 1994 ; Hanahan et Weinberg, 2000 ; Huang *et al.*, 2001 ; Habermann *et al.*, 2002). En culture, les cellules tumorales ne requièrent que de faibles concentrations de milieu nutritif. Ces caractéristiques montrent l'indépendance des cellules tumorales vis-à-vis des facteurs de croissance contenus dans le milieu, d'une part, et de l'environnement cellulaire, d'autre part. De plus, il a été démontré que des protéines de jonctions adhérentes, telles que E-Cad et  $\beta$ -caténine, sont modulées lors d'un cancer de la prostate. En effet, il a été démontré que lors d'un adénocarcinome, les niveaux de E-Cad ainsi que des caténines  $\beta$ - et  $\alpha$ - étaient diminués. Tandis que si l'on pratique une thérapie anti-androgénique, il est possible de renverser cette baisse et les niveaux d'expression de ces protéines revient à la normale (Patriarca *et al.*, 2003 ; Jaggi *et al.*, 2005). Ainsi E-Cad est considérée comme un bon biomarqueur de cancer de la prostate. En effet, durant le processus de cancérogenèse, tandis que E-Cad est inactivée, on observe le clivage de E-Cad en deux fragments, selon un mécanisme calcium-dépendant, et l'accumulation des ces fragments dans les tumeurs (Girolodi et Schalken, 1993 ; Rios-Doria *et al.*, 2003). Plus récemment, un test de mesure de l'expression d'un fragment de E-Cad dans le sérum s'avère être un bon indicateur prédictif de la progression du cancer (Kuefer *et al.*, 2005). Lors d'un cancer il y a une perte de la communication intercellulaire, et donc une baisse de l'expression des connexines (Tsai *et al.*, 1996 ; Saladino *et al.*, 2002), ainsi Tanaka et Grossman (2004) ont démontré qu'une expression forcée de la cx26 dans des cellules cancéreuses de prostate permettait de freiner leur croissance. Cependant, des études ont pu récemment montrer une corrélation entre une expression croissante de la cx26 et la progression de cancer de la prostate (Tate *et al.*, 2006), qui serait indépendante des

jonctions lacunaires et jouerait plutôt un rôle dans l'adhésion cellulaire.

De plus, la claudine-3 et -4 ont également été identifiées dans la prostate, et leur niveau d'expression semble augmenter dans les adénocarcinomes en développement (Long *et al.*, 2001 ; Nichols *et al.*, 2004). Leur détection pourrait représenter une voie prometteuse de diagnostic et également de thérapie (Morin, 2005). Il a également été montré que la Cldn-7 est capable de réguler l'expression de la PSA dans les cellules cancéreuses humaines LNCaP et que ce processus serait sous le contrôle des androgènes (Zheng *et al.*, 2003). Ainsi les claudines semblent une nouvelle piste pour une détection précoce de certaines formes de cancer de la prostate.

## Section 4. Les contaminants environnementaux

Depuis plusieurs décennies, une baisse dans les comptes de spermatozoïdes ainsi que dans la qualité du sperme des hommes a été observée (Carlson *et al.*, 1992; Irvine, 1994 ; Swan *et al.*, 2000 ; Jouannet *et al.*, 2001), de même qu'une très forte augmentation des anomalies du système urogénital (Toppari *et al.*, 1998). De nombreux facteurs peuvent être mis en cause, tels que l'alimentation (Iammarrone *et al.*, 2003 ; Sinawat, 2000). Cependant, une grande proportion est imputable à des facteurs indéterminés. C'est pourquoi diverses études ont été menées afin de vérifier si l'exposition à des contaminants environnementaux pouvait être une cause d'infertilité chez l'homme. Une catégorie particulière de ces produits pourrait notamment être mise en cause : les substances perturbatrices du système endocrinien (Sharpe, 2000 ; Lombardo *et al.*, 2005).

### 4.1 Les perturbateurs endocriniens

Les systèmes endocriniens ont des mécanismes complexes, servant à coordonner et à contrôler la communication interne entre les cellules. Leur action est menée par le biais d'hormones qui vont servir de messagers chimiques (Hiller-Sturmhofe et Bartke, 1998). Ces messagers, interagissent avec des récepteurs présents sur la membrane plasmique, dans le cytoplasme ou dans le noyau des cellules, et mènent ensuite à des réponses au niveau des fonctions biologiques telles la croissance, le développement ou encore la reproduction (Environnement Canada). Un grand nombre de substances qui sont présentes dans l'environnement peuvent avoir un effet perturbateur en gênant la communication normale entre le messager et son récepteur, et en induisant ainsi une réponse anormale (Tableau 1). Des effets très minimes peuvent ensuite avoir d'importantes conséquences sur la croissance, le développement, le comportement ou la reproduction, et ces effets peuvent également se répercuter sur les générations suivantes. Les substances perturbatrices des systèmes endocriniens peuvent agir de différentes façons (Iatropoulos, 1994 ; Brevini *et al.*, 2005) :

- Elles peuvent agir comme une hormone naturelle et se lier à un récepteur, ce qui donne lieu à une réponse similaire, appelé agoniste, par la cellule.
- Elles peuvent se lier à un récepteur et empêcher une réponse normale, c'est-à-dire donner lieu à une réponse antagoniste.

- Une substance peut gêner le mécanisme par lequel les hormones naturelles et les récepteurs sont synthétisés et contrôlés.

Tableau 1 : Liste des perturbateurs endocriniens et de leurs effets

Sources de contamination	Catégorie	Substances	Effets
Incinération et mise en décharge	Composés polychlorés	Dioxines, BPC	Effets sur les spermatozoïdes, cryptorchidisme.
Ruissellement agricole et transport atmosphérique	Pesticides organochlorés (sont maintenant presque tous interdits)	DDT, Dieldrine, lindane	Effets sur le nombre de spermatozoïdes, action œstrogénique ou anti-œstrogénique (lindane).
Ports	Organo-étains (agents anti-salissures)	TBT	Effets sur les androgènes, les œstrogènes, la reproduction
Effluents industriels et municipaux	alkylphénols	nonylphénol	Effets sur les androgènes et la reproduction. Effets œstrogéniques
Effluents industriels	Phtalates	Phtalate de dibutyle, phtalate de benzyle et de butyle	Effets anti-androgéniques, atrophie testiculaire, baisse de la fertilité
Ruissellement agricole et Effluents municipaux	Hormones naturelles (produites par les animaux) et stéroïdes synthétiques (venant des contraceptifs)	17 $\beta$ -œstradiol, estrone ; éthynyl œstradiol, testostérone	Effets sur le développement des organes reproducteurs et sur les spermatozoïdes
Nourriture	phytoœstrogènes	Isoflavones, ligans, coumestans	Baisse du nombre de spermatozoïdes, surcroissance de la prostate Atrophie de l'épididyme

Les perturbateurs endocriniens induisent, comme tout produit toxique (Steiner et Anderson, 2000), une modification du patron d'expression des gènes, que ce soit dans un organe ou un tissu en particulier (Naciff et Daston, 2004). Par exemple, une

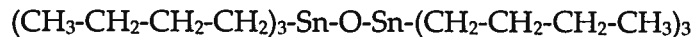
exposition aux dioxines va induire une diminution significative de l'expression de gènes spécifiques des testicules en développement (Yamano *et al.*, 2005). Ces analyses de profil d'expression génique suite à une exposition, vont permettre non seulement de déterminer des biomarqueurs pour mettre en évidence un effet des perturbateurs endocriniens, mais également de mettre en évidence des voies d'action des produits (Gray, 1998 ; Min *et al.*, 2003 ; Ishido *et al.*, 2005, Leffers *et al.* , 2006).

## 4.2 Le tributylétain

### 4.2.1 Généralités

Les polluants qui résistent à la biotransformation et qui s'accumulent le long de la chaîne alimentaire, sont des produits particulièrement préoccupants, parce qu'ils sont consommés ou absorbés par les organismes marins et les poissons, qui sont ensuite consommés par les humains. Le tributylétain (TBT) fait partie de cette catégorie de produits (Stab *et al.*, 1996). Le TBT appartient à la famille des organo-étains.

Sa structure chimique est la suivante :



Ceci représente sa forme oxydée (ou oxyde de TBT), mais c'est la forme sous laquelle il est présent dans la nature puisque sa forme réduite est très instable.

### 4.2.2 Utilisations et dispersion dans l'environnement

Le TBT est utilisé, à cause de ses propriétés de biocide, comme produit anti-salissure dans les peintures pour coques de bateaux afin d'empêcher que les balanes, les algues et autres micro-organismes n'adhèrent sur les navires (OMS, 1990). Le TBT est également utilisé comme fongicide dans le traitement et la conservation du bois, comme anti-fongique et désinfectant pour les textiles et dans les circuits de refroidissement des eaux industrielles (Winship K. A., 1988) et même dans les couches pour bébés. Ce produit, de par ses utilisations, contamine notre alimentation et notre eau potable. À mesure que la peinture des bateaux s'écaille, les produits chimiques qui la composent sont relargués dans l'eau de mer et s'accumulent dans les sédiments. Ces sédiments peuvent être ingérés par les organismes aquatiques. Les organo-étains sont des produits connus pour être bioaccumulables il en résulte une concentration le long des chaînes alimentaires (Evans et Laughlin, 1984 ; Laughlin *et al.*, 1986 ; Sudaryanto *et al.*, 2004 ; Viglino *et al.*,

2006). Le facteur de bioconcentration a été évalué comme pouvant aller de 410 à 2400 fois (Fent, 1996). Le TBT a été démontré comme étant bioaccumulable dans les organismes marins, tels que les poissons (Kannan, 1996 ; Shawky, 1998, Harino, 2000), les oiseaux marins (Kannan, 1998), les mammifères marins (Kannan, 1999) et les mollusques (Edbon, 1989 ; Shim, 1998) à des concentrations allant jusqu'à 2,2 µg/g de tissu. Il a été montré par Stab *et al.* (1996) que les organes d'accumulation étaient le foie et les reins.

En conditions aérobies, le tributylétain met d'un à trois mois pour être dégradé, mais en condition anaérobie, ce composé est capable de persister pendant plus de deux ans (Takahashi *et al.*, 1999).

#### 4.2.3 Métabolisation

Lors de son accumulation dans les sédiments le TBT va être métabolisé en dibutylétain (DBT) et en monobutylétain (MBT) soit par les microorganismes, soit de façon abiotique. Dans les organismes vivants, le TBT, qui possède un faible taux d'absorption par le tractus gastro-intestinal, il est rapidement métabolisé par les monooxygénases cytochrome P450 du foie, enzymes qui servent à hydroxyler les xénobiotiques. Il a été montré que TBT est métabolisé DBT et MBT chez le rats (Iwai *et al.*, 1981 ; Ohhira *et al.*, 2003). Cependant c'est le TBT qui présente la plus forte toxicité, même si des tests de tératogénèse ont montré que DBT est plus tératogène que le TBT, notamment durant la période d'organogénèse (Noda *et al.*, 1992a ; Noda *et al.*, 1992b) Cependant, cette biotransformation est partielle, ainsi le TBT sera quand même distribué au sein de l'organisme malgré la formation de ses métabolites (Snoeij, 1987). Ainsi dans les organes d'accumulation comme le foie et les reins on retrouvera en plus du TBT de fortes concentrations de DBT et MBT (Stab *et al.*, 1996).

#### 4.2.4 Effets sur les organismes marins

De par sa principale utilisation, la plupart des études menées à ce jour pour connaître les risques associés au TBT, ont été faites sur des organismes marins. Les organo-étains sont toxiques, même à faible concentration, pour les espèces marines. Les effets de perturbations du système endocrinien par le TBT apparaissent clairement chez certains organismes marins, qui développent des organes génitaux multiples (Gibbs et Bryan, 1986). Par exemple, les femelles des pourpres de l'Atlantique (famille des Muricidae) qui

développent, suite à une exposition de moins de 0,5 ng/l de TBT, un imposex. Ce dernier est caractérisé, chez ces femelles, par la croissance d'un micropénis qui bloque l'oviducte empêchant ainsi la reproduction de l'espèce, et entraînant des diminutions de population voire leur extinction locale (Bailey et Davies, 1988). Le même phénomène de masculinisation a également été observé chez les poissons (Shimasaki *et al.*, 2003). De plus le TBT a été démontré comme étant toxique pour les spermatozoïdes des carpes et des poissons chats (Rurangwa *et al.*, 2002). Enfin lors de l'exposition de spermatozoïdes d'oursins à des sédiments marins, le contenu des sédiments s'est révélé toxique pour cette espèce (Geffard *et al.*, 2001).

Il a également déjà été montré que le TBT inhibait l'activité de l'aromatase Cyt P450, qui convertit les androgènes en œstrogènes, il y a alors une augmentation du niveau d'androgènes non convertis (Spooner *et al.* 1991 ; Bettin *et al.*, 1996) qui pourraient entraîner des désordres dans le développement des organes ainsi que dans la régulation des phénomènes androgènes dépendants, et pourrait expliquer les imposex puisque les animaux développent alors des profils hyper androgéniques.

Il a été montré par Gooding *et al.* (2001), que chez les gastropodes une des cibles de la toxicité du TBT serait sur la régulation des stéroïdes par estérification de la testostérone en acides gras. Mais il n'a pas été montré encore que ce phénomène avait lieu chez les mammifères.

#### 4.2.5 Effets sur les mammifères

##### 4.2.5.1 Effets généraux et dose journalière acceptable

Les mammifères sont également sujets aux effets toxiques du TBT. Nous savons que les organo-étains présentent un risque aussi pour les mammifères, ils sont notamment capables de perturber le système endocrinien (Krajnc *et al.*, 1984). Mais surtout le TBT est un puissant immunotoxique, puisque le système immunitaire est affecté à de plus faibles doses que celles auxquelles les autres organes sont sensibles (Boyer, 1989 ; Smialowicz, 2002).

Les humains exposés accidentellement ou professionnellement sont victimes de crises, d'épisodes de douleur violente et de perturbations psychiatriques (Fortemps *et al.*, 1978 et Ross *et al.*, 1981).

Des marins exposés aux poussières de TBT et à ses vapeurs ont développé des problèmes respiratoires, ont eu une irritation de la peau, des maux de tête et des maux d'estomac (WHO, 1990). Une exposition au TBT peut entraîner une irritation des yeux, de la peau, des muqueuses et une exposition prolongée est susceptible de créer des dommages au foie et aux reins. Les humains sont majoritairement exposés au TBT en ingérant des fruits de mer. Certaines études (Kannan *et al.*, 1995a) ont démontré que les niveaux contenus dans les fruits de mer étaient inférieurs à la dose journalière acceptable (DJA) fixée pour le TBT à 0,25µg/kg de poids corporel suite à des évaluations immunotoxicologiques (Penninks, 1993). Mais d'autres études ont montré que certains produits notamment en provenance de pays asiatiques, ou les poissons en Australie avaient des teneurs plus élevées en TBT (allant jusqu'à 416 ng/g) et donc ces produits représentaient un risque pour les consommateurs (Kannan *et al.*, 1995b ; Forsyth et Casey, 2003). D'autre part, une consommation répétée peut entraîner, à cause de son facteur de bioaccumulation, un dépassement de la DJA et présente notamment un risque pour les femmes enceintes, comme il a été montré chez les Polonais (Kannan et Falandysz, 1997).

#### 4.2.5.2 Effets sur le système reproducteur

Différentes études ont été menées sur des rats pour évaluer les effets du TBT sur le système reproducteur et le développement. Selon des études menées, le TBT fait décroître la taille des portées chez les rats suite à une exposition de 100 mg/kg aux jours 0-3, 4-7 et 7-15 de la gestation, et le TBT semble avoir son pire effet durant la période de pré implantation, bien que des pertes aient également été observées durant le début de la post-implantation. Les rats survivants montrent, à la naissance, une perte de poids et une forte fréquence d'anomalies du squelette (Ema *et al.*, 1995 ; Ema *et al.*, 1997). Harazono *et al.* (1998) ont montré que suite à une exposition durant les jours 0 à 7 de la gestation allant de 8 à 16 mg/kg, on observait une augmentation dose-dépendante du nombre d'échecs de grossesse, évalué par l'absence de site d'implantation.

Une autre étude a montré qu'une exposition durant la gestation à 10 ou 20 mg/kg de rats entraînait des lésions aux testicules et aux ovaires en développement ainsi qu'à la structure du squelette de la progéniture (Adeeko *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré qu'une exposition au TBT durant la période pubertaire, pour des doses comprises entre 5



et 20 mg/kg, menait à de graves conséquences sur le système reproducteur des rats exposés. Non seulement différents organes, tels l'épididyme, la prostate et les vésicules séminales, avaient leur poids significativement baissé, mais en plus différents paramètres caractérisant les spermatozoïdes (concentration, motilité, mouvement de la tête) étaient affectés. (Yu *et al.*, 2003 ; Grote *et al.*, 2004). De plus, le TBT est un inhibiteur de la production d'ATP mitochondriale. En effet, il peut inhiber F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, un des composants des pompes ioniques transmembranaires. Ceci pourrait avoir un effet dramatique sur le comportement et le fonctionnement des spermatozoïdes (von Ballmoos *et al.*, 2004).

#### 4.2.5.3 Effets sur les barrières

Lors d'une étude de Hara *et al.* (1994), des rats étaient exposés oralement à 0,05 ml/kg de poids corporel de TBT. Les auteurs ont mis en évidence l'ouverture des jonctions serrées qui forment la barrière hémato-encéphalique, en observant au microscope le passage du lanthanum au travers des jonctions chez les animaux exposés, alors que ce n'était pas le cas chez les animaux contrôle. Cela indique qu'une exposition au TBT pourrait entraîner des conséquences sur les barrières hémato-testiculaire ou hémato-épididymaire, qui protègent les spermatozoïdes lorsqu'ils se développent et deviennent matures, même si cela n'a jamais été encore investigué. De cette façon, il deviendrait possible que les spermatozoïdes soient exposés à une attaque immunitaire s'ils ne sont plus protégés par ces deux barrières. Ce phénomène aurait lieu, car le TBT remplacerait le calcium dans les jonctions serrées et les rendraient alors perméables. Une autre étude a démontré dans des cellules d'intestin, une exposition au TBT entraînait une augmentation de la perméabilité des cellules (Tsukazaki *et al.*, 2004) et des dommages au cytosquelette d'actine étaient également observés.

#### 4.2.5.4 Effets sur les hormones et leur régulation

Le TBT exerce ses effets sur différentes hormones qui sont impliquées dans le développement et la régulation du le système reproducteur. En effet, Krajnc *et al.* (1984) ont notamment montré que, suite à une exposition de 80 mg/Kg chez des rats, on observait une baisse de leur niveau de TSH, une augmentation de la concentration de LH, tandis que les niveaux de FSH et de corticostérone n'étaient pas affectés. Ils

montraient également par immunocytochimie qu'il y avait une baisse dose-dépendante du nombre de cellules hypophysaires produisant de la TSH. Par contre, lors d'exposition de rats au TBT durant la période de puberté, les profils hormonaux pour la testostérone et LH étaient diminués (Yu *et al.*, 2003 ; Grote *et al.*, 2004).

De plus, lors de l'exposition de cellules de Leydig de cochon à des concentrations de TBT allant de 0,1 à 0,3  $\mu\text{M}$ , cela entraînait une suppression des concentrations intracellulaires d'AMPc, probablement en inhibant l'activité de l'adénylate cyclase. Bien que les mécanismes d'action soient encore à déterminer, les données ont montré qu'une baisse de l'AMPc intracellulaire entraîne la suppression de la production de testostérone via des baisses au niveau de la transcription du cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-20 lyase et de la protéine de régulation accrue de la stéroïdogénèse (StAR) (Nakajima, 2005). D'autres mécanismes possibles existent également via lesquels le TBT pourrait inhiber la production de testostérone : régulation des concentrations de gonadotrophine et de sa liaison à son récepteur, régulation ou modification des facteurs de transcription, la régulation de la transcription ou de la traduction ou l'inhibition directe des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la testostérone. En effet, il a été montré que chez les mammifères, comme chez les mollusques, l'inhibition de l'aromatase qui convertit les androgènes en œstrogènes entraînait des profils hyper-androgéniques chez le rat (Ashby et Lefevre, 1997 ; Robertson *et al.*, 1999). Omura *et al.* (2001) avançaient cette hypothèse pour expliquer une baisse dans le poids des testicules, des épидидymes et de la prostate ventrale dans les rats de la génération F1, suite à une exposition au TBT.

Les androgènes sont d'importants régulateurs du développement, de la croissance et du maintien du système reproducteur mâle (Cunha *et al.*, 1987). L'activité biologique des androgènes se fait via le récepteur aux androgènes. Tandis que la liaison des stéroïdes à leur récepteur respectif est connue pour être un événement très spécifique, certains contaminants environnementaux peuvent aussi agir comme des ligands pour ces récepteurs et perturber l'activité normale des hormones stéroïdiennes. Yamabe *et al.* (2000), ont montré qu'une exposition de cellule LNCaP à 100nM de TBT entraînait une activation de la transcription dépendante des androgènes ainsi qu'une prolifération cellulaire, mais qui est indépendante d'une liaison au récepteur AR. Pourtant Satoh *et al.* (2001) ont montré que le TBT était très fortement lié à l'AR humain, mais qu'il n'avait aucune affinité pour le récepteur aux œstrogènes, lors d'expériences de compétition de

liaison. De plus le TBT est capable d'agir sur les différentes enzymes qui servent à la conversion des stéroïdes. En effet il a été montré récemment que le TBT inhibait l'activité de la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde deshydrogénase, qui permet la formation de la testostérone à partir de son précurseur l'androstenedione (Ohno *et al.*, 2005). En 2002, Doering *et al.* avaient montré que le TBT inhibait l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase, enzyme qui permet de transformer la testostérone en DHT. Par contre dans cette étude aucun effet n'avait été noté sur la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde deshydrogénase. Enfin le TBT agit aussi lors de la conversion des androgènes en œstrogènes, notamment parce qu'il est capable d'inhiber l'activité de l'aromatase P450 (Heidrich *et al.*, 2001 ; Cooke, 2002).

## Objectif de recherche

La baisse de la qualité des spermatozoïdes ainsi que l'augmentation de l'incidence des maladies du système reproducteur sont particulièrement préoccupantes. Il devient nécessaire de s'intéresser aux effets des perturbateurs endocriniens sur le système reproducteur des mammifères.

De plus, au regard de la littérature, peu d'études se sont intéressées aux effets à long-terme du TBT sur le développement du système reproducteur, suite à une exposition *in utero* à ce produit. Enfin, si l'effet du TBT a déjà été démontré sur la barrière hémato-cervicale, ses effets sur les barrières du système reproducteur n'ont jamais été étudiés.

L'objectif de la présente étude était donc de déterminer les effets d'une exposition *in utero* au TBT chez des rats mâles une fois ces individus devenus adultes, et notamment de vérifier si les complexes jonctionnels existants dans le système reproducteur pouvaient être une cible du TBT.

## LES ARTICLES



## Chapitre 2 : Effets du TBT sur le développement du système reproducteur

Cet article doit être soumis.

Pour cet article, j'ai participé aux analyses de sperme par la méthode CASA, j'ai fait les analyses ainsi que les statistiques. J'ai également réalisé la mesure des niveaux de testostérone, j'ai fait les tableaux correspondants aux données de macro-réseaux et enfin j'ai rédigé le texte de l'article correspondant à mes résultats. J'ai également participé aux différentes révisions et aux corrections finales de l'ensemble de l'article. Pour cet article les trois premiers auteurs sont considérés comme ayant une participation égale dans la réalisation des expériences et l'écriture.





## Résumé

Le Tributylétain (TBT) est un produit anti-salissure, qui est utilisé dans les peintures pour les coques de bateau, ainsi que comme agent biocide dans diverses industries. Lors de cette étude, nous cherchions à déterminer les effets d'une exposition *in utero* sur les gonades de rats adultes. Des femelles gravides furent exposées par gavage à différentes doses de TBT (0, 2,5, 10 and 20 mg/kg de poids corporel) durant toute leur gestation. Les petits furent examinés lors de leur naissance et des malformations furent recherchées lors qu'ils atteignirent l'âge adulte. Chez les mâles, l'analyse par microscopie des testicules a permis de mettre en évidence des inclusions lipidiques dans le cytoplasme des cellules de Sertoli chez les rats exposés. De plus, des spermatozoïdes anormaux, qui présentaient des altérations de leur membrane nucléaire et de leur acrosome, ont été détectés par microscopie électronique dans les tubules séminifères des rats exposés. L'analyse assistée par ordinateur des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme a permis de mettre en évidence une baisse de 15 à 21% de la motilité, ainsi qu'une baisse de la motilité progressive et une augmentation de la vitesse moyenne chez les rats exposés au TBT. Chez les femelles, un retard significatif de l'ouverture du vagin et de l'apparition du premier cycle œstral était dénoté pour les deux plus hautes doses. De plus, une baisse dose-dépendante du nombre de corps jaunes dans les ovaires des adultes. Des analyses par macro-réseaux ont permis de détecter des changements dans la régulation de nombreux gènes testiculaires et ovariens chez les animaux exposés au TBT. Notamment, les gènes androgènes-dépendants étaient surexprimés dans les testicules, tandis que les gènes reliés à la protéolyse étaient régulés à la baisse dans les ovaires. L'ensemble de ces résultats démontre qu'une exposition prénatal au TBT induit des altérations permanentes des gamètes mâles et affecte la capacité ovulatoire des rats femelles adultes.



*In utero* Exposure to Tributyltin Chloride: Long-Term Consequences on Postnatal Development in the Sprague-Dawley Rat

Osama Kishta<sup>1</sup>, Johanna Barthelemy<sup>5</sup>, Adedayo Adeeko<sup>2</sup>, Mary Gregory<sup>5</sup>, Daniel G. Cyr<sup>5</sup>, Daming Li<sup>2</sup>, Trang Luu<sup>2</sup>, Louis Hermo<sup>1</sup>, James R. Brawer<sup>1</sup>, Bernard Robaire<sup>2,3</sup>, Barbara F. Hales<sup>2</sup>, and Carlos R. Morales<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Anatomy and Cell Biology, <sup>2</sup>Pharmacology and Therapeutics, <sup>3</sup>Obstetrics and Gynecology, McGill University, <sup>5</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Montreal, P.Q., Canada

Running Title: Maternal tributyltin exposure affects progeny

Mailing Address

Dr. Bernard Robaire  
Department of Pharmacology and Therapeutics  
McGill University  
3655 Drummond, Suite 1325, Montreal Quebec, Canada, H3G 1Y6  
Phone: 514 398-3630; Fax: 514 398-7120; E-mail:  
brobair@pharma.mcgill.ca

## ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is used as an antifouling agent in marine paints, as a biocide in agriculture and as an industrial heat stabilizer. In the present study, we investigated the effects of *in utero* TBT exposure on adult rat gonads. Gravid rats were treated with TBT (0, 2.5, 10 and 20 mg/kg body weight), by gavage throughout gestation. Pups were examined at birth and monitored to adulthood for anatomical malformations. Light microscopy of treated testes revealed lipid inclusions in the cytoplasm of Sertoli cells of TBT-treated rats. Electron microscopy revealed abnormal spermatozoa in the seminiferous tubule of treated animals exhibiting alterations of the nuclear membrane and acrosome. Cauda epididymal sperm analysis demonstrated that motility was decreased by 15% and 21% in the highest dose groups. Average track speed of the sperm was also increased in the treated groups. In females, significant delays were observed in both vaginal opening and in the onset of the first vaginal estrus cycle at the two higher doses. In adult ovaries, there was a dose-dependant decrease in the number of corpora lutea. The incidence of large Graafian follicles (600  $\mu\text{m}$  or larger) was less prominent in TBT-treated rats than in controls. Gene expression analysis detected changes in the regulation of several testicular and ovarian genes in treated rats. Interestingly, steroid-related genes were upregulated in the testis while proteolysis-regulating genes were downregulated in the ovary. These results indicate that prenatal exposure to TBT produced permanent alterations in male gametes and affects the ovulatory capacity of adult female rats.

## INTRODUCTION

Among the organotin compounds (trimethyltin, triethyltin, tributyltin and triphenyltin), tributyltin/TBT/  $\text{Sn}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$  is the most toxic and commonly used (Fait *et al.*, 1994). TBT is the active ingredient of biocides (Lau, 1991) and is an antifouling agent added to paints used on boats, docks, fishnets, and buoys to discourage the growth of marine organisms such as barnacles, bacteria, tubeworms, mussels and algae (Voulvoulis *et al.*, 2002). TBT compounds have also been employed as plastic stabilizers, wood preservatives, and textile disinfectants (Fait *et al.* 1994; Piver, 1973). TBT accumulates in the food chain and is eliminated slowly (Lau, 1991). TBT has been shown to induce apoptosis at low concentrations and necrosis at higher concentrations in the human Hut-78 and Jurkat T-lymphocyte cell lines (Stridh *et al.*, 1999). It produces a variety of immunotoxic effects including atrophy of the thymus and spleen, a decrease in T-lymphocyte populations, suppression of natural killer cell activity, and lowered resistance to infections in rats and mice (Ghoneum, 1990; Delong and Rice, 1997, Whalen *et al.*, 1999).

TBT has also been shown to exert a variety of deleterious effects on reproductive function. Exposure to either triphenyltin acetate or tributyltin chloride disrupts spermatogenesis in rats (Snow and Hay, 1983). Triphenyltin and other tri-substituted organotins induce chromosomal aberrations as well as abnormalities in sperm heads in mice (Snow and Hay, 1983; Hamasaki *et al.*, 1992). Imposex, the masculinization of female sex organs in some mollusks (dogwhelk gastropods) is also a well-known effect of TBT at relatively low concentrations (ng/L) (Baily and Davies, 1988; Harrison *et al.*, 1997; Sekizawa, 1998; Folsvik *et al.*, 1999 and Vos *et al.*, 2000). Saitoh *et al.* (2001) suggest that TBT-induced imposex in gastropods results from a decreased conversion of

androgens to estrogens and consequently increased androgen/estrogen ratio. TBT inhibits aromatase activity and decreases P450arom mRNA at the transcriptional level in human granulosa-like tumor cell line KGN (Saitoh *et al.*, 2001). Cooke (2002) showed that TBT is a competitive inhibitor of human aromatase in vitro. TBT has also been implicated in increased anogenital distance, delayed vaginal opening, and impaired estrous cyclicity in rats that are exposed during pre-natal and post-natal development (Ogata *et al.*, 2001). Pre-implantation embryonic loss in rats (Harazono *et al.*, 1996) and post-implantation loss, as well as cleft palate (Ema *et al.*, 1995) also result from TBT exposure. In view of the range of reproductive impairments associated with exposure to TBT, we have explored the effects of prenatal exposure to TBT on the reproductive system of adult rats. The objective of this study was to determine whether or not maternal ingestion of TBT during pregnancy resulted in long-term reproductive defects in the testis and ovary of adult rats. In the present study, various congenital parameters were examined, and LM, EM, sperm motility and gene expression analyses were performed.

## MATERIALS AND METHODS

*Animals and treatment.* Male (300-350g) and female (200-250g) Sprague Dawley rats were purchased from Charles River Canada (St.-Constant, Quebec) and housed in the McIntyre Medical Building Animal Resource Centre of McGill University with a 14 hr light: 10 hr dark cycle. The animals had free access to food (Purina chow 5012, Mondou Feeds, Montreal, Quebec) and water; all animal handling and care followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Virgin female rats in proestrus were mated overnight with males. Successful mating was indicated by the presence of spermatozoa in the vaginal smear on the following morning (day 0 of pregnancy). Pregnant rats were randomly divided into four groups; they were given a daily dose of vehicle (control) or TBT chloride at 2.5, 10 or 20mg/kg by gavage, from day 0 to 21 of pregnancy. Dams were weighed at the initiation of treatment and once every three days thereafter. The volume and dose of TBT administered were adjusted to 5 ml/kg of body weight. All tributyltin chloride solutions were prepared fresh daily. Pups were born on day 22 of pregnancy in all cases and culled to a maximum of four males and four females per litter on postnatal day 2, to eliminate potential variations in postnatal development due to unequal litter sizes. They were monitored for biomarkers of development and weaned on postnatal day (PND) 21. On attaining adulthood, 60 days for females and 90 days for males, rats were sacrificed, testes and ovaries were flash frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for RNA extraction. The gonads of other rats were perfused with normal saline and then with either 5% glutaraldehyde in 0.1% cacodylate buffer or Bouin's fluid for subsequent histological preparations and evaluations.

*Fixation, embedding, sectioning and staining.* Testes and ovaries of 90-day old adult rats from both control and TBT-treated groups were fixed by perfusion in Bouin's solution and stored in 70% alcohol until further dehydration and embedding in paraffin. Sections of testicular tissue (5  $\mu\text{m}$ ) were cut, mounted on glass slides and stained with haematoxylin and eosin (H&E) for histological assessment in the light microscope (LM). Ovaries were cut serially (10  $\mu\text{m}$  each) and stained with H&E. Unstained paraffin sections were used for LM immunocytochemistry. A set of testes and ovaries were fixed by perfusion in 5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (10 minutes). After 10 min perfusion, the tissues were removed, cut into 1  $\text{mm}^3$  pieces, and left in cacodylate buffer overnight. On the following day the tissues were postfixed in osmium tetroxide for 2 hours. The tissues were then dehydrated in a graded series of ethanol (50-100%), 1:1 100% ethanol and 100% propylene oxide, then 100% propylene oxide (15 mins each change). Afterwards, the tissues were placed in Epon and propylene oxide (1:1, 2:1 and 3:1, 6-12 hrs each) and embedded in pure Epon at 55°C for 48 hr. Semithin sections (0.5  $\mu\text{m}$ ) were mounted on glass and stained with toluidine blue for LM. Ultrathin sections (silver interference color) for electron microscopy were mounted on copper grids, and stained with uranyl acetate and lead citrate.

*Light and electron microscopy of testicular tissue.* Spermatogenesis was examined in testicular paraffin sections stained with H&E as well as in Epon sections, stained with toluidine blue. Testicular stained sections were examined by LM in treated and control animals. Particular attention was given to germ cells, Leydig cells and Sertoli cells. The ultrastructure of testicular cells from control and TBT-treated animals was analyzed by EM.



*Immunostaining and quantitation of Leydig cells.* Unstained paraffin sections (5  $\mu\text{m}$ ) of adult testes fixed with Bouin's fixative were deparaffinized in HistoClear™, rehydrated in a graded series of ethanol and kept in a solution of glycine (5.63g in 250 ml. H<sub>2</sub>O) for 5 mins. The sections were subsequently incubated in 5% goat serum for 15 minutes at 37°C and then incubated with an anti-3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) antibody at a dilution of 1:100 in Tris-buffered saline (TBS) at pH 7.4 for 90 mins at 37°C. The antibody was obtained from Dr. Van Luu-Thé (Laval University, Quebec). Details of its preparation and specificity can be found in Pelletier *et al.* (2001). All sections were blocked in 5% goat serum for 15 minutes at 37°C and exposed to the secondary antibody (1:250) for 30 minutes. The sections were then rinsed in 3 changes of Tween (2 min each), stained in diaminobenzidine tetrahydrochloride for 10 minutes, rinsed in 2 changes of distilled water 2 minutes each, stained in methylene blue for 15 seconds and finally dehydrated in ethanol, immersed in xylene and mounted on coverslips with Permount. The specificity of the antibody was verified by incubating the sections without primary antibody or with normal rabbit serum.

Three different fields of the interstitial space were photographed per individual control and experimental testes (10mg and 20 mg TBT, n=6 to 9 animals). To calculate the area, random fields of the interstitial space were outlined and measured on the micrographs for each group using a Zeiss MOP-3 instrument. Leydig cells were identified by their immunostained cytoplasm with 3 $\beta$ -HSD, and their nuclei scored and expressed as number of cells/unit area (0.1 mm<sup>2</sup>). This was accomplished by counting the nucleus of each Leydig cell in a given field and only when 50% or more of each nucleus was visualized in any given plane of section.

*Quantitation of round spermatids and Sertoli cells.* Round spermatids/cross sectional profile area of seminiferous tubules were counted using the paraffin sections of testis, stained with H&E. Four distant cross sections of seminiferous tubules/animal were chosen and the cross sectional profile area of seminiferous tubule was measured using a MOP-3 image analyzer (Carl Zeiss Inc., Munich, Germany). In addition, the nuclei of round spermatids were scored per cross section only when 50% or more of each nucleus was seen in a given plane of section. Sertoli cells/cross section of seminiferous tubules were also scored in 4 distant cross sections and averaged into one value for each animal of the controls and treated groups. Using the paraffin sections of testis, stained with H&E, Sertoli cells were scored only when the nucleolus was visible. All counts were performed at stage I of the cycle of the seminiferous epithelium, since a reduction of spermatids and Sertoli cells at this stage would be noted at any other of the 14 stages of the cycle.

*Assessment of tubular diameter.* Paraffin sections of testis, stained with H&E, were used for this study. Twenty five transversely cut seminiferous tubules were selected per paraffin block/animal and their diameters measured using an ocular micrometer and averaged.

*Semen analysis.* Semen analysis was done as previously described (Aravindakshan *et al.*, 2004). Briefly, adult rats were killed by CO<sub>2</sub> asphyxiation and epididymides were dissected and trimmed of fatty tissue. The left epididymis was clamped at the proximal and distal cauda epididymidis excised, rinsed in prewarm medium and placed in fresh medium. Each cauda was poked with the tip of a scapel blade to permit the release of the sperm into the medium. The sperm-medium suspension was incubated at 37°C for five

minutes, after which 100  $\mu$ l aliquots were diluted with medium and transferred into each of two compartments on a glass cannula for Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) using the Integrated Visual Optical System (IVOS) Motility Analyzer (Hamilton Thorne Research Inc, Beverly, MA). The operational settings of the IVOS were based on those described by Slott et al. (1993) and analyses were done on 30 image frames at a rate of 60 frames per second. For each rat at least five aliquots were prepared for analysis and each cannula was scanned 3-5 times. Data were analysed to obtain information on the percent motile sperm, and kinetic parameters including average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), amplitude of the lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BDF), and two derived parameters : linearity ( $LIN=VSL/VCL \times 100$ ) and straightness ( $STR= VSL/VAP \times 100$ ).

Epididymal spermatozoal concentration was determined using the contralateral epididymis. Cauda epididymidis were dissected and clamped, severed and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  in a 50 ml conical plastic tube. Frozen cauda epididymidis was thawed and diluted in 15 ml of distilled  $\text{H}_2\text{O}$  and then homogenized using a polytron. A 100  $\mu$ l aliquot of the homogenate was diluted with an equal volume of water and added to 1.5 ml eppendorf tubes containing a Hoescht-DNA binding dye (Hamilton-Thorne Research). The tubes containing the sperm were then incubated for 2 min at room temperature and aliquoted into a 20  $\mu$ m cannula. Sperm concentrations were determined using the standard rat IVOS system protocol (Kruger et al., 1995).

*Serum testosterone levels.* Serum testosterone levels were determined by radioimmunoassay using a commercially available kit (ICN Mississauga, ON). Serial dilutions from rats displayed parallelism to the standard curve.

*Quantitation of antral follicles and corpora lutea.* Healthy and atretic antral follicles were identified in the serial paraffin sections of the whole ovary, stained with H&E (Brawer *et al.*, 1986). The diameters of these follicles were measured using an ocular micrometer. Two perpendicular diameters were averaged for each follicle in a section in which the nucleus of the ovum was present. Follicles were classified as atretic if they contained any pyknotic granulosa cells. Corpora lutea were also counted.

*RNA extraction.* Total RNA was extracted from the testes and ovaries of adult progeny of control dams and those treated with 10mg/kg TBT using Qiagen RNeasy Mini kit and protocol (Qiagen, Mississauga, Canada). The quality of the DNase-treated RNA was assessed by spectrophotometric reading and electrophoresis.

*Preparation of radiolabeled cDNA and hybridization.* Total RNA (3.5ug) was reverse transcribed with Moloney-murine-leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT) in the presence of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (Amersham Pharmacia Biotec, Baie d'Urfé, Québec; 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l), as described previously (Adeeko *et. al.*, 2003). Probes were purified with nucleospin columns (Clontech, Palo Alto, CA) and hybridized to Atlas<sup>TM</sup> Rat1.2 Array nylon membranes (Clontech) at 68°C overnight. Hybridization and washing conditions were as described previously (Adeeko *et. al.*, in press). Five replicates per testis and ovary of adult progeny of control and treated dams were sampled.

*Analysis of gene expression.* Hybridization intensity was captured using a phosphorimager (Storm, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) after an overnight exposure of membranes to phosphorimaging intensifying screens. The intensity of each spot was quantified using the Atlas Image™ version 2.0 software; these data were then imported to GeneSpring™ (version 4.0.7, Silicon Genetics, Redwood, CA) for further analysis. To control for experiment-to-experiment variations, the signal intensity for all genes on each membrane was averaged and the intensity of individual genes on that membrane normalized to this average value to give a relative intensity ratio for each gene. A gene was considered as being expressed if its intensity was at least two-fold the background intensity on each individual array and was expressed in at least three out of five replicates. An experiment-to-experiment normalization was done in order to minimize the variation from one experiment to the other: for each replicate array, the raw value of each gene was divided by the median intensity signal on its membrane to generate what is known as the relative intensity for that gene. The expression of a gene was considered altered by treatment when the difference in expression was at least 1.5-fold and consistent in at least three out of five replicates.

*Statistical analysis.* Results were plotted and comparisons between the control and the experimental testes and ovaries, treated *in-utero* with TBT, were analyzed by one way ANOVA. Student “t” test was performed only when one experimental group was compared to its equivalent control group. Significance was established at  $P < 0.05$ . In some cases normality of the data was determined using the Kolmogorov-Smirnov tests while the

Levine median test was done for equal variance. All analyses were done using the SigmaStat computer software (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

## RESULTS

*Pregnancy outcome.* To evaluate the effects of TBT on pregnancy outcome, TBT (2.5, 10 or 20 mg/kg) was given by gavage to dams from day 0 to 21 of pregnancy. The salient effects of TBT exposure on pregnancy outcome and postnatal development are shown in Table 1. Pregnancy failure, evidenced by absence of implantation sites, occurred only in one control rat. No dams (2.5 mg/kg TBT) died during pregnancy; two died postpartum: one (20 mg/kg TBT) on postnatal day (PND) 3, the other (2.5 mg/kg) on PND 21. Dams treated with 20mg/kg TBT showed a significantly lower (79.8% of controls) body weight compared to controls; exposure to TBT had no significant effects on body weight at lower doses. Exposure to a maternal dose of 20 mg/kg TBT significantly reduced the litter size, to 74.15% of the control value; no effects were shown at the lower doses. Only one pup (2.5 mg/kg), had an external malformation, no tail, when examined on PND 2; hematomas were found in 8 pups exposed to a maternal dose of 10mg/kg and 1 pup in the 20 mg/kg group; no pups exposed to lower doses had hematomas. *In utero* exposure to TBT negatively impacted on pup survival in a dose-dependent relationship. While no pups died in the control group and 99.3% survived in the 2.5 mg/kg group, only 82.6 and 15.6% of pups survived by PND 4 at maternal exposures of 10 and 20 mg/kg TBT respectively, among the survivors however, the sex ratio was not different between control and treated.

*Growth rate (body weight).* *In utero* exposure to TBT decreased pups body weight to 93.4, 80.3, 64.5% of the control value at 2.5, 10 and 20 mg/kg TBT respectively, on PND 2 (Fig. 1). However, by PND 9, while pups exposed to a maternal dose of 2.5 mg/kg had similar weights as the control, pups exposed to 10 and 20 mg/kg TBT maintained their lower body weights; these lower weights were maintained to the end of the experiment.

*Pinna detachment, eruption of incisor and eye opening.* In male pups, the age of pinna detachment was significantly delayed from 0.7 to 1.3 days at all doses of TBT. In females, TBT delayed pinna detachment by 0.9 and 1.0 days in the 10 and 20 mg/kg groups. Eruption of incisors was delayed by 1.1 days only in male pups that were exposed to 20 mg/kg TBT; a lower exposure had no effect, nor was this parameter affected in females. *In utero* exposure to TBT had no effect on eye opening in male and female pups with age.

*Pubertal parameters.* *In utero* exposure to maternal doses of 2.5, 10 and 20 mg/kg TBT significantly delayed the age at preputial separation (PPS) by 1.2, 3 and 4 days, respectively. Interestingly, the body weight at which this event occurred was significantly lower only at the highest exposures (10 and 20 mg/kg), being 92.5 and 85.1% of the control body weights, respectively.

Vaginal opening was delayed by 5.5 days at 10 mg/kg and 7.7 days at 20 mg/kg TBT exposures; the body weight at which vaginal opening occurred was not different in the control compared to treated pups. The occurrence of the first estrus was delayed by 5.5 days (10 mg/kg) and 6.9 days (20 mg/kg) compared to control, the first diestrus was

delayed in the same group of rats; however, the length of the estrus cycle was not different between control and treated groups.

*Organ weights.* As shown in Table 2, *in utero* exposure to TBT did not significantly alter the weight of the testis, epididymis, seminal vesicles, adrenal and thyroid glands at any dose studied. The weight of the ventral prostates of rats exposed to a maternal dose of 10 mg/kg TBT was, however, significantly lower than that of controls by about 40%; a similar trend was observed at the 20 mg/kg exposure. *In utero* exposure to TBT did not alter the weight of the ovaries of the adult rats. Although a reduction was observed in uterine weight at 20 mg/kg, this value was not significantly different from control. The weight of the adrenal glands of female progeny was not significantly affected by treatment. Maternal exposure to 20 mg/kg TBT significantly increased the weight of the thyroid glands of the female progeny; the increase shown at the 10 mg/kg TBT dose did not reach significance.

*LM parameters of the testis.* Paraffin sections of testis, fixed in Bouin's and stained with H&E did not show any difference in the morphological appearance of the interstitial space and seminiferous epithelium between treated and control testes. The structure of Sertoli cells, spermatogonia and spermatocytes, exhibited normal features in the TBT-treated animals. However, semithin sections of testis, revealed the presence of lipid droplets in the cytoplasm of Sertoli cells at most of the stages of the cycle, including those where lipids are not normally present (Fig. 2). The tubular diameter, usually used as an index of germ cell loss, did not show differences between the control and treated animals (Fig. 3A) There were no detectable differences in the number of round



spermatids/cross section of seminiferous tubules, number of Sertoli cells/cross section of seminiferous tubules at stage I (Fig. 3A, B) or number of Leydig cells/unit area of interstitial space (Fig. 4).

*Electron microscopy (EM).* Ultrathin sections of testis from animals treated with 10 and 20 mg TBT, stained with lead citrate and uranyl acetate, showed abnormalities in the nuclear membrane of some round spermatids at stage VII of the cycle. These abnormalities were characterized as an excess of nuclear membrane profiles within these cells (Fig. 5). EM also showed some abnormal late spermatids and acrosomes as compared to controls (Fig. 6) as well as acrosome displacement (Fig. 6A, B) and malformations (Fig. 6C).

*Semen analysis.* The average count of spermatozoa in the control group was  $40.10^6$  /ml. For the treated group, the sperm concentrations were  $37 \times 10^6$ ,  $28 \times 10^6$  and  $32 \times 10^6$  /ml respectively (Table 3). The results showed no statistical significant differences between the control and TBT treated rats.

The percent motility is defined as the total number of motile sperm cells divided by the total number of cells counted. The higher dose (10 or 20 mg/kg) group showed a significant decrease in percent motile sperm ( $P \leq 0.05$ ). Progressive motility is defined as the total number of cells where straightness is greater than the threshold standard (50%) and where the average path velocity (VAP) is greater than the standard value for median velocity, divided by the total number of cells counted. All three treatment groups showed

a significant decrease in progressive motility ( $P \leq 0.06$ ) (Table 3). These results suggest that TBT results in a decrease in the straightness of displacement.

There was a significant increase in average path velocity for all TBT exposure doses ( $P \leq 0.05$ ). The average progressive velocity (VSL) is the straight-line distance between the beginning and end of the track divided by the time elapsed. The average track speed (VCL) is a measure of curvilinear velocity. There were no significant differences between the groups for these two parameters. The average path velocity (VAP) for each motile cell was compared to standard values for VAP. Rapid cells are defined as those with VAP > the medium VAP (50  $\mu\text{m/s}$ ); medium cells are those with VAP < medium value but > than low VAP (20  $\mu\text{m/s}$ ); slow cells are those with VAP < the low VAP standard. Static cells are non motile cells. There was a significant increase for the highest dose group in the percentage of rapid cells and static ( $P \leq 0.05$ ).

The beat frequency is measured as the frequency with which the cell track crosses the cell path in either direction (Table 3). There were no differences between control and treatment groups. The lateral amplitude represents the mean width of head oscillation as the cell swims. No differences were observed between TBT and controls.

*Testosterone levels.* Serum levels of testosterone were measured in adult rats. In control rats testosterone level was 1.4 ng/ml. Serum testosterone level was higher in rats treated with 2.5 mg/kg of TBT (1.75 ng/ml). The levels decreased thereafter to 1.0 ng/ml and 0.4 ng/ml in the two highest dose groups. These differences, however, were not statistically significant.

*Morphological parameters of ovaries.* Animals in the 10 mg and 20 mg TBT groups exhibited significant delay of vaginal opening and first vaginal estrus. In the adult ovaries, the mean number of corpora lutea in the 2.5 mg and 10 mg treatment groups did not differ from the controls. However, ovaries exposed *in utero* to 20 mg TBT exhibited significantly fewer corporal lutea than controls ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7A). This number was significant despite the fact that only three animals from this treatment group survived until adulthood. Large antral follicles (diameter 600  $\mu\text{m}$  or larger) were most common in control ovaries and exhibited a trend toward decreased incidence with increasing dose. In the three surviving animals exposed to the 20 mg dose (gestation day 0-19), no large antral follicles were observed (Fig. 7B).

*Gene expression analysis.* As part of our evaluation of the long term effects of *in utero* exposure to TBT on the gonads, the profile of genes expressed in the testes and ovaries of the adult progeny of control and treated (maternal dose: 10 mg/kg TBT) was analyzed. Every ribosomal protein gene present on the membrane was expressed in the testes and ovaries of control and experimental rats; all but ribosomal proteins S4 and L10 were highly expressed (relative intensity  $\geq 5$ ) in the testis; in the ovary S4, S17 were the exception.

The genes that were highly expressed in the gonads of the control and treated rats fall into 3 main categories. 1) Genes that were highly expressed in control and experimental testes and ovaries. *Stress-response:* copper-zinc-containing superoxide dismutase 1, glutathione S-transferase Yb subunit, microsomal glutathione S-transferase (MGST1), cytochrome c oxidase subunit Vb IVa precursor (COX5B), COX4, COX1 and

heat shock 90-kDa protein beta (HSP 90-beta). *Cytoskeletal proteins*: cofilin and beta actin. *Translation factors*: elongation factor 2, eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit. 2) Genes highly expressed in the testis only. *Kinases*: testis lipid-binding protein, type 1 hexokinase, cAMP-dependent protein kinase inhibitor 2, extracellular signal-regulated kinase 3, casein kinase I delta. *DNA repair proteins*: apurinic/apyrimidinic endonuclease and structure-specific recognition protein 1. *Cell division related genes*: proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53. *Metalloproteinases*: dipeptidyl carboxypeptidase I, aminopeptidase B and proteases: cathepsin K and tripeptidylpeptidase D (CPD). 3) Genes highly expressed in the ovary but not the testis. *Steroid metabolism-related*: 20 alpha hydroxysteroid dehydrogenase, cholesterol side-chain-cleavage, annexin V and scavenger receptor class B type I. *Transcription regulator/DNA-binding*: DNA-binding protein inhibitor ID2, ID3 and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3).

In the testes, a total number of 367 identical genes were coexpressed. 59 genes were expressed only in the control animals (Table 5) and 3 only in the TBT treated animals (Table 6). Of these, the expression intensity of 17 genes, representing 4.6% of the gene population was changed by at least 1.5-fold. The analysis revealed that at least 16 genes were upregulated and only 1 gene was downregulated (Table 4). The upregulated genes are A) *metabolic pathways-related*: cytochrome P450 1B1, neuron-specific enolase, dopamine  $\beta$ -hydroxylase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). B) *Proteases/protein degradation-related*: proteasome component C13 precursor, tripeptidylpeptidase II, proteasome activator rPA28 subunit  $\alpha$  and polyubiquitin. C) *G proteins*: guanine nucleotide-binding regulatory, alpha subunit

and guanine nucleotide-binding regulatory, alpha stimulating activity polypeptide. D) *Intracellular transducer*, SHPS-1 receptor-like protein with SH2 binding site. E) *Neurotransmitter receptor*, acetylcholine receptor. F) *Symporter/antiporter*, excitatory amino acid transporter 1. G) *Transcription protein*, elongation factor SIII P15 subunit. H) *Cyclin*, G1/S-specific cyclin D3 and I) Ornithine decarboxylase, involved in polyamine synthesis. The only gene downregulated was adenylyl cyclase type II.

In the ovaries a total of 293 genes were coexpressed in control and experimental rats. The expression intensity of 26 genes, representing 8.9% of this population was changed by at least 1.5-fold. The 10 upregulated genes were A) *Lipid metabolic pathways*: pancreatic lipase related protein-2 precursor, and hormone sensitive lipase. B) *Steroid metabolic pathways*: steroid 5 $\alpha$ -reductase 2, 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and 17 beta-hydroxylase. C) *Growth-related*: insulin-like growth factor-binding protein 3 and early growth response protein 1. D) *Cell adhesion-related kinase*: eph-related receptor tyrosine kinase ligand 2. The genes downregulated in the ovaries were A) *Proteases/protein degradation*: dipeptidyl peptidase I precursor, proteasome activator rPA28 subunit alpha and polyubiquitin. B) *Growth-related*: platelet-derived growth factor receptor alpha, insulin-like growth factor-binding protein 5 precursor and nuclear tyrosine phosphatase. C) *Metabolic pathways*: cytochrome P450 2C11, carbonic anhydrase, phospholipase A2 precursor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2. D) *Cytoskeletal*: cytoplasmic beta-actin. E) *Intracellular communication*: prostaglandin F2 receptor  $\alpha$ isoform regulatory protein and focal adhesion protein-tyrosine kinase. F) *Functionally unclassified* interferon induced protein. G) *G-protein-coupled receptor*: D4 dopamine receptor.

## DISCUSSION

*Anatomical parameters.* This study demonstrated that *in utero* exposure to the environmental contaminant, TBT, impairs postnatal development and has long term effects on gene expression profiles of the adult gonad. Exposure to TBT throughout pregnancy significantly decreased body weight gain in dams only at the highest dose (20mg/kg), which is consistent with our previous report (Adeeko *et al.*, 2003). Others reported that maternal exposure (days 6 to 20 *postcoitum*) to tributyltin oxide at 10 and 12mg/kg, reduced weight gain to 80 and 38% of controls, respectively (Crofton *et al.*, 1989). Dietary exposure of dams to an equivalent daily dose of 10mg/kg tributyltin chloride from gestational day (GD) 0 reduced body weight gain to 68% of control value by GD 14 (Ogata *et al.*, 2001). No effects were seen at lower doses.

Litter size was also reduced significantly at the highest dose of TBT. Since our previous study (Adeeko *et al.*, 2003) showed a significant increase in postimplantation loss in GD 20 dams dosed daily with 20 mg/kg TBT from GD 0-19, it is conceivable that the reduction in litter size shown in the present study resulted from increased postimplantation loss. Pups survival by postnatal day 3 (PND3) was significantly reduced by *in utero* exposure to TBT in a dose-dependent relationship. Only 15.6% of pups survived at the highest dose (20 mg/kg), 82.6% survived at 10mg/kg. When tributyltin oxide (TBTO) was administered by gavage to dams from GD 6 to 20 at 10 mg and 16 mg/kg, pups survival was reduced to 36.7 and 0%, respectively, by PND3 (Crofton *et al.*, 1989). Although the mechanisms underlying TBT-induced fetal and neonatal lethality are not known, previous reports (Itami *et al.*, 1990; Adeeko *et al.*, 2003) showed that *in utero* exposure to TBT altered placental:fetal size ratio, the primary determinant of longevity. Fetuses with either a disproportionately small or large placenta have an increased

standardized mortality ratio (Godfrey and Robinson, 1997). Therefore, TBT-induced perinatal mortality may be linked to an altered placental:fetal ratio. It is also possible that delayed skeletal development and skeletal malformations of the ribcage resulted in breathing difficulties in neonates and hence failure to thrive. In addition, TBT has been shown to be toxic to various cell types (Zucker *et al.*, 1988; Sibert *et al.*, 2004) and this could result in multiple organ-malfunction and neonatal mortality.

*In utero* exposure to TBT significantly reduced pups body weight on PND2 even at the lowest (2.5 mg/kg) exposure. However, while pups exposed to this lowest maternal dose had caught up with their control counterparts by PND 9, pups exposed to higher doses retained smaller weights into adulthood. In previous reports, maternal exposures to a daily dietary equivalent dose of approximately 10 mg/kg TBT reduced body weights in the F1 and F2 progeny before and after the weaning period (Ogata *et al.*, 2001; Omura *et al.*, 2001). There are no reports of lactational transfer of TBT. However, the indications are that if any lactational transfer of TBT occurs, its quantities and/or effects must be significantly lower than *in utero* exposure because TBT-induced reduction in neonatal body weight was reversed during lactation in pups exposed to a maternal dose of 2.5 mg/kg.

Male pups were more susceptible than females to a delay in pinna detachment and eruption of incisors by TBT. Balano preputial separation (BPS) was significantly delayed at all TBT doses studied; the weights at which this event occurred were significantly lower than controls only at 10 and 20 mg/kg TBT exposures. BPS is an androgen-dependent event occurring before the pubertal rise in androgens (Korenbrot *et al.*, 1977). Aromatization of testosterone is not thought to be involved at the site of separation of the prepuce from the glans penis (Korenbrot, 1977), consequently, other mechanisms apart

from the TBT inhibition of aromatase must be involved. Doering *et al.* (2002) demonstrated that TBT chloride inhibits types 1 and 2 isoforms of human 5 $\alpha$ -reductase with a potential to inhibit the formation of dihydrotestosterone. 5 $\alpha$ -reductase deficiency has been implicated in some cases of isolated hypospadias (Silver and Russell, 1999). Interestingly, one male exposed to 10 mg/kg TBT developed features of isolated hypospadias. Thus, tributyltin may act as an endocrine disrupter, inhibiting the conversion of testosterone to dihydrotestosterone and hence demasculinization of the male reproductive system.

Compared to controls, vaginal opening was significantly delayed at 10 and 20 mg/kg (5.5 and 7.7 days, respectively) but not at the lowest dose. Whole life dietary exposure of rats to an equivalent of 10 mg/kg TBT delayed vaginal opening by about 6.2 days compared to controls (Ogata *et al.*, 2001) and, consistent with the results of the present study, the body weight at which this occurred was not different from controls. In another study, female rats exposed prenatally to 10 mg/kg/day TBTO had a 2-day delay in vaginal opening compared to controls (Crofton *et al.*, 1989). Clearly, the different compounds of TBT exhibit varying effects on vaginal opening; in this case the chloride had a greater negative impact than the oxide. The age at vaginal opening in the controls from these three studies were similar. The opening of the vagina, an indication of the onset of puberty in the rat is preceded by a pubertal rise in 17 beta-estradiol secretion (Rivest, 1991). *In utero* exposure to TBT must delay this process. Vaginal opening is normally accompanied by the first ovulation and followed within a day by an estrus phase (Rivest, 1991). *In utero* exposure to TBT (10 and 20 mg/kg) significantly delayed both the first estrus and diestrus; however, the length of first estrus cycle remained unaltered. It remains to be determined whether the observed delay in these pubertal events is a direct



effect of organotin or an indirect effect of retarded growth involving signaling at different levels.

The thyroid glands of adult female progeny of dams gavaged 20 mg/kg TBT during gestation weighed significantly more than controls and low dose groups. Although the thyroid status of these rats was not assessed, their large size is reflective of overstimulation by TSH. Interestingly, the thyroid gland weight of their male litter mates was not significantly different from controls and underscores the sex-specific effects of *in utero* exposure to toxins in the environment.

In male rats, four androgen-dependent organs (testis, epididymis, seminal vesicles and ventral prostate) were weighed at sacrifice. Of these, the ventral prostate was the only organ showing a significant decrease in weight after *in utero* exposure to TBT. Whole life dietary exposure to TBT has been reported to cause a reduction in the weight of the testis, epididymis and ventral prostate (Omura *et al.*, 2001). In the present study, the weights of the adrenal and thyroid glands were not significantly changed by *in utero* exposure to TBT, indicating that TBT effects are organ-specific.

TBT exposure resulted in a significant decrease in paired testes weight at the highest exposure dose, but no effect was observed on epididymal weight. The most dramatic effect was observed on ventral prostate weights, which were decreased by half at the two highest doses. While ventral prostate weights can be altered by changes in circulating levels of androgens, there were no significant differences in serum testosterone between TBT treated rats and untreated controls. These results suggest a direct effect of TBT on the development of the ventral prostate.

While there were no significant differences in sperm numbers between experimental groups, there was a tendency towards lower total sperm concentration.

Various parameters of sperm motility were measured, and the results show that following *in utero* exposure to TBT, the spermatozoa of adult male offspring exhibited lower percent motility at the highest treatment group. It has been suggested that percent motility is one of the most sensitive parameters for measuring the effects of toxicants on spermatozoa (Horimoto *et al.*, 2000).

We also observed a significant decrease in the percentage of progressive sperm for all the treatment groups. Sperm must not only be motile, but must also exhibit linearity and forward progression in their trajectory, in order to maximize their chances for fertilization, and a decrease in progressive motility is representative of adverse effects on sperm motion (Kato M. *et al.*, 2001). Sperm analysis can pinpoint functional sperm deficiencies and help to address cellular-molecular bases of toxicant-induced male infertility (Perreault *et al.*, 2001). An analysis of the velocity parameters showed a significant increase, for all the treatment groups, of the VAP. This suggests that the spermatozoa in TBT-treated rats may be hyperactivated, which could explain why the spermatozoa in the treatment groups are less progressive. Sperm hyperactivation usually occurs in the oviduct (Suarez *et al.*, 1991), but if so the lateral amplitude of the head should also increase. But this effect was not observed. The present observations would suggest that sperm maturation was altered by *in utero* exposure to TBT. This observation is particularly interesting since pubertal exposure to TBT has been reported to decrease sperm motility, but did not affect sperm VAP (Yu *et al.*, 2003); indicating that the exposure period is critical for TBT to exert an effect on developing germ cells.

Other sperm motility parameters, such as beat frequency of the tail of the spermatozoa and the lateral amplitude of their head, were unaffected by TBT exposure. It has recently been shown by Rurangwa *et al.* (2002) that exposure to TBT causes a

significant decrease in the sperm motility in African catfish and common carp. This suggests that the effects of TBT may transcend different vertebrate groups.

A possible explanation for the effects observed on the various sperm parameters may be related to changes in the composition of lumen of the epididymis resulting from alterations to the blood-epididymal barrier (Cyr *et al.*, 2002). It has been shown by Hara *et al.* (1984) that after exposure to TBT the blood-brain barrier became leaky. It is conceivable that TBT exerts the same effect on the various barriers of the male reproductive tract, potentially affecting various sperm parameters.

*LM and EM parameters.* Recently, we have shown that gestational administration of TBT (10 and 20 mg/kg) to pregnant rats resulted in degenerative changes in Sertoli cells and a reduction in germ cells in ovaries of fetal gonads. In the present study, we examined if the insult observed in the fetal gonads as a consequence of prenatal exposure to TBT, resulted in permanent damages in the adult testes and/or ovaries. The present study suggests that this was the case in both organs.

LM examination revealed the presence of lipid inclusions in the cytoplasm of Sertoli cells in most of the stages of the cycle, including those stages where lipids are not normally present. A similar effect has been observed in the Sertoli cells of fetal gonads pretreated with 10 and 20 mg TBT. The persistence of lipid inclusions in the Sertoli cells of the adult testes may indicate a permanent alteration in the adult gonads. However, the potent inhibition of the mitochondrial oxidative phosphorylation by TBT is a well known effect of this compound which leads to the accumulation of acetyl-CoA and hinders the transport of fatty acids to the mitochondria resulting in the accumulation of lipids in the cytoplasm (Wada *et al.* 1982; Aldridge, 1976; Aldridge *et al.*, 1977).

In our study, neither tubular diameter of the seminiferous tubules, nor the number of round spermatids/cross section at stage I exhibited a change in the TBT-treated versus control. Likewise, there was no change in the number of Sertoli cells/cross section at stage I of the cycle of the seminiferous epithelium or in the number of Leydig cells/unit area of the interstitial space. This may be attributed to one or more of the following possibilities: 1) TBT induces subtle molecular changes undistinguishable at the LM level; 2) Adult tissues recover from the adverse effects of TBT during prenatal exposure; 3) Prenatal exposure to TBT does not produce morphological and/or structural adverse effects. In our previous study on fetal gonads we discarded the third possibility by demonstrating a number of morphological alterations in the fetal gonads as a result of TBT exposure.

The ultrastructural analysis of the seminiferous epithelium revealed abnormalities in the nuclear membrane, particularly, in step 5-7 round spermatids. A recent investigation concluded that the lipophilic organotins may act at both plasma and intracellular membranes (White *et al.*, 1999). The interaction of TBT with cell membranes was first reported by Gray *et al.* (1987). These investigators demonstrated that TBT was the most potent organotin to induce in vitro hemolysis of human erythrocytes due to its high hydrophobic, lipid partitioning properties.

The EM analysis of the testes, exposed to 10 and 20 mg/kg (body weight) of TBT, revealed the presence of abnormal late spermatid heads. In addition, acrosome malformations and acrosome displacement were noted as compared to the control testes. Abnormal spermatid heads is consistent with an earlier investigation reporting that TBT and other tri-substituted organotins induced such abnormalities in the mouse (Hamasaki *et al.*, 1992).

A number of causes may be attributed to abnormal effects on the chromatin and acrosomes of spermatids. In rat thymocytes, TBT altered  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, increasing cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent endonucleases, thus, causing chromatin condensation and extensive DNA fragmentation (Aw *et al.*, 1990). Boyer (1989) reported that tributyltin oxide produced mutations in Chinese hamster ovary cells. TBT was also found to be a mutagen in *S. typhimurium* TA100 (Hamasaki *et al.*, 1993). Our findings suggest the possibility of a mutagenic effect of TBT in germinal cells during prenatal exposure, since the observed acrosomal abnormalities are seemingly transmitted to these cells after birth. Furthermore, the morphological alterations were accompanied with changes in functional parameters. In fact, TBT produced progressive decreased in sperm motility at all exposure doses, and a progressive increase of path velocity, typical of hyperactivated sperm. Our study also detected a significant decrease in sperm concentration at the highest TBT dose substantiating the possibility of a permanent effect of TBT in the testis.

The ovaries were also affected by TBT treatment. The dose-dependent diminution of corpora lutea and large follicles suggest that prenatal exposure to TBT compromises folliculogenesis in adult females. These results are consistent with the dose-dependent decrease of germ cells and the dose-dependent increase in apoptotic index in fetal ovaries of animals exposed to TBT during gestational day 0-19 and 8-19 (Adeeko *et al.*, 2003). Since the embryonic germ cells are precursors to follicles, TBT-accelerated germ cell loss would be expected to result in an attenuated population of primordial follicles and a subsequent reduction in folliculogenesis. Alternatively, the reduction in large follicles and corpora lutea suggestive of impaired folliculogenesis could result from an unfavorable hormonal milieu. Saitoh *et al.* (2001) demonstrated that TBT inhibits aromatase activity

in the human granulosa-like tumor cell line KGN and they attributed the TBT-induced imposex in female gastropods to an elevated androgen/estrogen ratio. It is, therefore, possible that prenatal TBT-induced alterations in steroidogenesis, as suggested by the delay in the onset of puberty, may persist into adulthood. In fact the gene expression analysis revealed that some genes of the steroid metabolic pathways such as 5- $\alpha$ -reductase 2, 20- $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase and 17- $\alpha$ -hydroxylase were upregulated in the experimental animals.

*Gene expression parameters.* cDNA micro array revealed that in the testis of animals exposed *in utero* to a maternal dose of 10 mg/kg of TBT, 16 genes were upregulated and 1 downregulated by at least 1.5-fold. In our previous report, *in utero* exposure to a maternal dose of 20mg/kg from gestational day 0-19 resulted in the upregulation of 107 genes in the testis of the gestational day 20 rats, only 3 genes were downregulated by the same magnitude (Adeeko *et al.*, 2003). That fewer genes were shown to have changed in this study compared to the previous could be dose-related, 10 mg/kg versus 20mg/kg alternatively, it could be that the effects of *in utero* exposure diminished over the period of postnatal development or both. Cytochrome P450 IB1 is one of the genes found to be upregulated in the testis by in-utero exposure to TBT; it codes for an enzyme thought to catalyze 4-hydroxylation of estradiol. Although the functions of 4-hydroxyl estradiol (4-OH-E<sub>2</sub>) are not fully known, it has been postulated to participate in E<sub>2</sub>-induced tumor formation in the kidney (Weisz and Bresciani, 1993) and increased activity has been demonstrated in human uterine myoma compared to the surrounding myometrium (Liehr *et al.*, 1995). The gene coding for neuron-specific enolase, a neuron-specific isomer of the ubiquitous glycolytic enzyme 2-phospho-D-

glycerate hydrolase (Schmechel *et al.*, 1978) was also highly regulated; this enzyme serves as a neuroendocrine tumor-marker (Akoun *et al.*, 1985) and its upregulation could indicate a predisposition to developing such tumors. Proteasomes are multicatalytic proteinase complexes. The upregulation in the testis of protein degradation enzymes by *in utero* exposure to TBT in the testis suggests a stimulus for increased protein degradation activity both by ubiquitin (polyubiquitin, tripeptidylpeptidase II) and non-ubiquitin-mediated pathways (proteasome activator rPA28 subunit  $\alpha$ ). Tripeptidylpeptidase II can compensate for compromised proteasome activity, by permitting continued ubiquitin-dependent proteolysis in EL-4 cells and allows their survival at lethal concentrations of the covalent proteasome inhibitor NIP-leu-leu-leu-vinylsulfone (Wang *et al.*, 2000). Since TBT at high concentrations is cytotoxic, the upregulation of proteolysis genes is consistent with the need to rid the cells of malfunctioning and degraded cytosolic proteins. The only gene that was downregulated in the adult testis was the integral membrane protein, adenylyl cyclase II, which catalyzes the synthesis of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) from ATP; adenylyl cyclase is activated by G-proteins. Significantly, the expression of 2 G-proteins: guanine nucleotide-binding regulatory,  $\alpha$  subunit and guanine nucleotide-binding protein  $\alpha$  stimulating activity polypeptide were likewise downregulated.

In the ovary, some key genes involved in the steroidogenic pathway (20 $\alpha$ HSD, steroid 5 $\alpha$ -reductase-2 and 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase (17 $\alpha$ OH) were upregulated by *in utero* exposure to TBT. Incubation of human prostatic microsomes in 6.25 $\mu$ m TBT over a 40 minute period irreversibly inhibited 5 $\alpha$ -reductase 2 activity (Doering *et al.*, 2002); there are no previous reports on TBT effects on the transcripts. The gene coding

for hormone sensitive lipase postulated to release free cholesterol for steroid biosynthesis in the ovary, was upregulated by TBT exposure. The genes coding for lipocortin 2, a protein that inhibits phospholipase, and pancreatic lipase related protein 2 precursors were upregulated and reflects the fact that *in utero* exposure to TBT could disrupt lipid metabolism within the adult ovary. The genes mediating protein degradation proteasome activator rPA28 subunit  $\alpha$  and polyubiquitin were downregulated in the ovary but upregulated in the testis. Since tissue remodeling is prominent in the cycling ovary and degradation of lipids and proteins fluctuate during the estrus cycle, any alteration in the degradation machinery of structural and other proteins could negatively impact on ovarian physiology. In the same token, the downregulation of cytoplasmic  $\beta$ -actin, platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  and focal adhesion protein tyrosine kinase may negatively impact proliferation, differentiation and growth in the ovary.

In conclusion, *in utero* exposure to varying doses of tributyltin affected postnatal and pubertal development in the rat, the male progeny seemed to be more susceptible than the female, judging by developmental biomarkers. While the overall effect on the testis was up-regulation of genes, notably those mediating proteolysis, steroid-related genes were upregulated in the ovary. The microscopic analysis also provided evidence for permanent adverse effects of early *in utero* exposure to TBT in the male and female adult gonads, in the form of sperm head and acrosome malformations in male rats and diminished ovulation in the females.



## REFERENCES

Adeeko A, Li D, Forsyth DS, Casey V, Cooke GM, Barthelemy J, Cyr DG, Trasler JM, Robaire B, Hales BF (2003). Effects of in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome. *Toxicol Sci* 74:407-415.

Akoun GM, Scarna HM, Milleron BJ, Benichou MP, Herman DP (1985). Serum neuron-specific enolase. A marker for disease extent and response to therapy for small-cell lung cancer. *Chest* 87: 39-43

Aldridge WN (1976). The influence of organotin compounds on mitochondrial function. *Adv Chem Series* 157: 186-196

Aldridge WN (1977). Phosphorylation. Halide-dependent and halide-independent effects of triorganotin and triorganolead compounds on mitochondrial functions. *Biochem J* 168: 353-364.

Aravindakshan J, Gregory M, Marcogliese D, Fournier M, and Cyr DG (2004). Consumption of xenoestrogen-contaminated fish during lactation alters adult male reproductive function. *Toxicol Sci* 81: 179-189.

Aw TY, Nicotera P, Manzo L, Orrenius S (1990). Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys* 238: 46-50.

Bailey SK, Davies IM (1988). Tributyltin contamination in the firth of forth (1975-87). *Sci Total Environ* 76: 185-192.

Boyer IJ (1989). Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology* 55: 253-298.

Brawer JR, Muñoz M, Farookhi R (1986). Development of the polycystic ovarian condition (POC) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod* 35: 647-655.

Cooke GM (2002). Effect of organotins on human aromatase activity in vitro. *Toxicol Letters* 25: 121-30.

Crofton KM, Dean KF, Boncek VM, Rosen MB, Sheets LP, Chernoff N, Reiter LW. (1989). Prenatal or postnatal exposure to bis (tri-n-butyltin) oxide in the rat: postnatal evaluation of teratology and behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 97: 113-123.

Cyr D.G., Finnson K.W., Dufresne J. and Gregory M. (2002). Cellular interactions and the blood-epididymal barrier. In *The Epididymis : from molecules to clinical practice* (B. Robaire and B. Hinton Eds.), pp. 103-118. Plenum Press : New York.

- Delong G.T., and Rice C.D. (1997). Tributyltin potentiates 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced cytochrome p-4501A-related activity. *J Toxicol Environ Health* 51: 131-148.
- Doering DD, Steckelbroeck S, Doering T, Klingmuller D. (2002). Effects of butyltins on human 5 $\alpha$ -reductase type 1 and type 2 activity. *Steroids* 67: 859-887.
- Ema M, Kurosaka R, Amano H, Ogawa Y (1995). Further evaluation of the developmental toxicity of the tributyltin in rats. *Toxicology* 96: 195-201.
- Fait A, Ferioli F, Barbieri F (1994). Organotin compounds. *Toxicology* 91: 77-82.
- Folsvik N, Berge JA, Walday M (1999). Quantification of organotin compounds and determination of imposex in populations of dogwhelks (*Nucella lapillus*) from Norway. *Chemosphere* 38: 681-691.
- Fulmer B.R., Turner T.T. (2000). A blood-prostate barrier restricts cell and molecular movement across the rat ventral prostate epithelium. *Journal of Urology*, 163:1591-1594.
- Ghoneum M, Hussein AE, Gill G, Alfred LJ (1990). Suppression of murine natural killer cell activity by tributyltin: In vivo and in vitro assessment. *Environ Res* 52: 178-186.
- Godfrey K, Robinson S (1997). Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. *Proc Nutr Soc.* 57: 105-111.
- Gray BH, Porvaznik M, Flemming C, Lee LH (1987). Organotin-induced hemolysis, shape transformation and intramembranous aggregates in human erythrocytes. *Cell Biol Toxicol* 3: 23-38.
- Hamasaki T, Sato T, Nagase H, Kito H (1992). The genotoxicity of organotin compounds in SOS chromotest and rec-assay. *Mutat Res* 280:195-203.
- Hamasaki T, Sato T, Nagase H, Kito H (1993). The mutagenicity of organotin compounds as environmental compounds. *Mutat Res* 300: 265-71.
- Harazono A, Ema M, Ogawa Y (1996). Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. *Toxicol Lett* 89: 185-190.
- Harrison PT, Holmes P, Humfrey CD (1997). Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trend associated with environmental chemical exposure. *Sci Total Environ* 205: 97-106.
- Horimoto M, Isobe Y, Isogai Y, Tachibana M. (2000). Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monoethyl ether, sulfasalazine, and 2,5-hexandione. *Reprod Toxicol.* 14:55-63.

Itami T, Ema M, Amano H, Murai T, Kawasaki H (1990). Teratogenic evaluation of tributyltin chloride in rats following oral exposure. *Drug Chem Toxicol* 13:283-295.

Kato M, Fukunishi K, Ikegawa S, Higuchi H, Sato M, Horimoto M, Ito S. (2001). Overview of studies on rat sperm motion analysis using a Hamilton-Thorne Sperm Analyzer--collaborative working study. *J Toxicol Sci.* 26:285-297.

Korenbrodt CC, Huhtaniemi IT, Weiner RI (1977). Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol Reprod* 17:298-303.

Kruger TF, du Toit TC, Franken DR, Menkveld R, Lombard CJ (1995). Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. *Fertil Steril* 63:134-141.

Lau MM (1991). Tributyltin antifoulings: a threat to the Hong Kong marine environment. *Arch Environ Contam Toxicol* 20: 299-304.

Liehr JG, Ricci MJ, Jefcoate CR, Hannigan EV, Hokanson JA, Zhu BT (1995). 4-Hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: implications for the mechanism of uterine tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9220-9224.

Moore H.D.M., Aknondi M.A. (1996). Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those from the distal cauda or vas deferens. *J Andrology*, 17:50-60.

Ogata R, Omura M, Shimasaki Y, Kubo K, Oshima Y, Aou S, Inoue N (2001). Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. *J Toxicol Environ Health* 63:127-144.

Omura M, Ogata R, Kubo K, Shimasaki Y, Aou S, Oshima Y, Tanaka A, Hirata M, Makita Y, Inoue N. (2001). Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. *Toxicol Sci* 64: 224-232.

Pelletier G, Luu-The V, El-Alfy M, Li S, Labrie F (2001). Immunoelectron microscopic localization of 3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in human prostate and mammary gland. *J Mol Endocrinol* 26:11-19.

Perrault SD, Cancel AM (2001). Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. *Reproduction*, 121: 207-216.

Piver WT (1973). Organotin compounds: industrial applications and biological investigation. *Environ Health perspect* 4: 61-79.

Rivest RW, Aubert ML, Lang U, Sizonenko PC (1986). Puberty in the rat: Modulation by melatonin and light. *J Neural Transm* 21: 81-108.

Rurangwa E, Biegniewska A, Slominska E, Skorkowski EF, Ollevier F. (2002). Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comp Bioch Physiol: C Pharmacol, Toxicol, Endocrinol* 131:335-44.

Saitoh M, Yanase T, Morinaga H, Tanabe M, Mu YM, Nishi Y, Nomura M, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Nawata H (2001). Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 198-204.

Schmechel D, Marangos PJ, Brightman M (1978). Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 276: 834-836.

Sekizawa J (1998). Health and environmental risk assessment of organotin pollution in Japan. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hkoku* 116: 126-31.

Seibert H, Morchel S, Gulden M. (2004). Cytotoxic potency of trialkyltins to C6 glioma cells in vitro: impact of exposure conditions. *Cell Biol Toxicol.* 20:273-83.

Silver RI, Russell DW (1999). 5 $\alpha$ -reductase type 2 mutations are present in some boys with isolated hypospadias. *J Urol* 162: 1142-1145.

Slott VL, Jeffay SC, Suarez JD, Barbee RR, Perreault SD (1995). Synchronous assessment of sperm motility and fertilizing ability in the hamster following treatment with  $\alpha$ -chlorohydrin. *J Androl* 16:523-535.

Snow RL, Hays RL (1983). Phasic distribution of seminiferous tubules in rats treated with triphenyltin compounds. *Bull Environ Contam Toxicol* 31: 658-665.

Stridh H, Orrenius S, Hampton MB (1999). Caspase involvement in the induction of apoptosis by the environmental toxicants tributyltin and triphenyltin. *Toxicol Applied Pharmacol* 156: 141-146.

Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL. (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod.* 44:375-381.

Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30: 71-133.

Voulvoulis N, Scrimshaw MD, Lester JN (2002). Comparative environmental assessment of biocides used in antifouling paints. *Chemosphere* 47: 789-795.

Wada O, Manabe S, Iwai H, Arakawa Y (1982). Recent progress in the study of analytical methods, toxicity, metabolism and health effects of organotin compounds. *Sangyo Igaku* 24: 24-54.

Wang EW, Kessler BM, Borodovsky A, Cravatt BF, Bogoy M, Ploegh HL, Glas R. (2000). Integration of the ubiquitin-proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9990-9995.

Weisz A, Bresciani F (1993). Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *Crit Rev Oncog* 4:361-388.

Whalen MM, Loganathan BG, Kannan K (1999). Phenyltin inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. *Environ Res* 84: 162-169.

White JS, Tobin JM, Cooney JJ (1999). Organotin compounds and their interactions with microorganisms. *Can J Microbiol* 45: 541-554.

Yu WJ, Lee BJ, Nam SY, Kim YC, Lee YS, Yun YW. (2003). Spermatogenetic disorders in adult rats exposed to tributyltin chloride during puberty. *J Vet Med Sci.*;65(12):1331-1335.

Zucker RM, Elstein KH, Easterling RE, Massaro EJ. (1988). Flow cytometric analysis of the cellular toxicity of tributyltin. *Toxicol Lett.* 43:201-18.

Table 1. The effects of in utero exposure to tributyltin on pregnancy outcome, postnatal development and pubertal parameters in the progeny.

	Control	2.5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg
<b>Dams</b>				
Actual numbers mated	10	10	10	10
Number s pregnant	9	10	10	10
Body weight gain (g)	130.7 ± 5.5	141.0 ± 5.9	123.8 ± 6.8	104.3 ± 8.7
Litter size	14.7 ± 0.7	14.8 ± 0.8	13.8 ± 0.7	10.9 ± 1.3*
<b>Fetuses</b>				
Anogenital distance (PND2)				
Male	5.4 ± 0.1	5.3 ± 0.1	4.9 ± 0.1	4.7 ± 0.3
Female	2.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.6 ± 0.1
Age at pinna detachment (days)				
Male	3.0 ± 0.1	3.7 ± 0.1*	4.0 ± 0.1*	4.3 ± 0.2*
Female	3.1 ± 0.1	3.4 ± 0.1	4.0 ± 0.1*	4.1 ± 0.1*
Age at eruption of incisors (days)				
Male	6.9 ± 0.1	7.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1*
Female	7.0 ± 0.1	7.1 ± 0.1	7.2 ± 0.1	7.4 ± 0.1
Age at eye opening (days)				
Male	14.8 ± 0.1	14.9 ± 0.1	14.3 ± 0.1	14.8 ± 0.2
Female	14.5 ± 0.1	14.9 ± 0.1	14.6 ± 0.1	14.8 ± 0.3
Dead pups <sup>@</sup> /total	0/132	1/148	24/138*	92/109*
Live pups				
Male	65	69	48	8
Female	67	65	66	9
Pups that have hematoma/total	0/132	0/148	8/138	1/109
External malformation/total	0/132	0/148	1/138	0/109
Sex ratio (male/female)	65/67	77/71	59/79	54/55
<b>Pubertal parameters (Pups)</b>				
Age at balano-preputial separation (BPB, days)	41.3 ± 0.2	42.5 ± 0.3*	44.3 ± 0.3*	45.3 ± 0.8*
Body weight at BPS (g)	192.4 ± 1.7	195.1 ± 2.1	178.0 ± 2.1*	163.7 ± 4.8*
Age at vaginal opening (VO, days)	32.7 ± 0.6	34.0 ± 0.3	38.2 ± 0.7*	40.4 ± 1.6*
Body weight at VO (g)	107.7 ± 1.9	109.0 ± 2.3	117.3 ± 3.4	108.0 ± 3.6
Age at first estrus (days)	33.6 ± 0.3	34.2 ± 0.3	39.1 ± 0.7*	40.5 ± 1.7*
Age at first diestrus (days)	37.3 ± 0.5	37.5 ± 0.4	42.2 ± 0.7*	44.9 ± 1.7*
Length of estrus cycle (days)	6.6 ± 0.4	5.6 ± 0.3	6.5 ± 0.4	6.1 ± 0.8

\*Significantly different from control P<0.05 (one way ANOVA followed by Bonferroni test); <sup>@</sup> numbers on postnatal day 3. Numbers are Mean ± Standard Error of Mean.

Table 2. Weights of selected tissues at sacrifice of adult rats that were exposed in utero to tributyltin from days 0-21.

Tissue	Control	2.5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg
<b>Males</b>				
Testes (g)	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.2*
Epididymides (g)	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.0
Seminal vesicles (g)	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2
Ventral prostate (g)	0.6 ± 0.04	0.59 ± 0.04	0.37 ± 0.04*	0.42 ± 0.01*
Adrenal glands (mg)	84.4 ± 5.6	97.8 ± 10.2	76.7 ± 7.5	95.0 ± 5.0
Thyroid glands (mg)	55.6 ± 7.3	58.9 ± 7.2	57.8 ± 8.5	50.0 ± 10.0
<b>Females</b>				
Ovaries (mg)	134.8 ± 8.1	139 ± 8.4	126 ± 5.0	138 ± 11.6
Uteri (mg)	481 ± 29.9	456 ± 35.6	444 ± 35.4	296 ± 48.3
Adrenal glands (mg)	96.7 ± 6.3	104 ± 6.6	97.0 ± 4.9	106 ± 10.8
Thyroid glands (mg)	41.7 ± 3.8	40.0 ± 3.5	50.6 ± 4.7	78.0 ± 13.6*

\* Significantly different from control  $P < 0.01$ , one-way ANOVA followed by Tukey test. Numbers are Mean ± Standard Error of Mean.

Table 3: Summary of cauda epididymal semen analysis. Analyses were done using an IVOS automated semen analyzer. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* indicates a  $P<0.05$  ; \*\* indicates a  $P<0.01$ .

Sperm parameters	Control	2.5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg
Percent of motile cells	81.92 $\pm$ 2.01	79.95 $\pm$ 1.65	68.83 $\pm$ 4.80	59.30 $\pm$ 7.50*
Percent of progressive cells	29.15 $\pm$ 3.70	21.65 $\pm$ 1.56**	20.22 $\pm$ 2.41**	15.95 $\pm$ 2.55**
Velocity distribution :				
Percent of rapid cells	64.90 $\pm$ 1.21	65.13 $\pm$ 2.77	53.97 $\pm$ 5.65	49.45 $\pm$ 5.25*
Percent of medium cells	4.88 $\pm$ 1.43	2.55 $\pm$ 1.06	3.47 $\pm$ 0.63	1.30 $\pm$ 0.60
Percent of slow cells	11.25 $\pm$ 1.09	11.58 $\pm$ 2.25	11.68 $\pm$ 1.02	7.9 $\pm$ 1.80
Percent of static cells	19.07 $\pm$ 1.83	20.82 $\pm$ 1.96	30.93 $\pm$ 4.57	41.45 $\pm$ 7.65*
Beat frequency (Hz)	15.92 $\pm$ 1.03	13.85 $\pm$ 0.44	14.07 $\pm$ 0.62	12.2 $\pm$ 0.10
Lateral amplitude ( $\mu$ m)	10.72 $\pm$ 0.65	11.23 $\pm$ 0.31	11.70 $\pm$ 0.27	11.20 $\pm$ 0.60
Average path velocity (VAP) ( $\mu$ m/s)	160.48 $\pm$ 9.11	186.40 $\pm$ 8.09*	173.05 $\pm$ 4.43*	196.55 $\pm$ 1.25*
Average progressive velocity (VSL) ( $\mu$ m/s)	114.05 $\pm$ 4.48	127.07 $\pm$ 4.99	121.55 $\pm$ 2.39	132.55 $\pm$ 0.55
Average track speed (VCL) ( $\mu$ m/s)	265.35 $\pm$ 17.33	309.93 $\pm$ 9.43	289.23 $\pm$ 2.91	317.15 $\pm$ 8.05



Table 4: Genes expressed in the testis of control animals more or less than 1.5x than in 10mg TBT treated animals

Gene name	Number	X-fold Control vs treated
Adenylyl cyclase type II	P26769	1.87
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04797	-1.51
dopamine beta-hydroxylase	L12407	-1.51
SHPS-1 receptor-like protein with SH2 binding site	D85183	-1.52
tripeptidylpeptidase II	Q64560	-1.55
elongation factor SIII P15 subunit	Q63182	-1.56
GTP-binding protein (G-alpha-8)	P04894	-1.57
G1/S-specific cyclin D3 (CCND3)	P48961	-1.61
guanine nucleotide-binding regulatory , alpha subunit	J03773	-1.65
glutamate/aspartate transporter	M97380	-1.73
proteasome component C13 precursor	P28064	-1.77
polyubiquitin	Q63446	-1.78
ornithine decarboxylase (ODC)	J04791	-1.88
neuron-specific enolase (NSE)	P07323	-1.88
acetylcholine receptor, nicotinic, epsilon, muscle	P09660	-1.95
proteasome activator rPA28 subunit alpha	Q63797	-1.97
Cytochrome P450 1B1	U09540	-2.14

Table 5: Genes expressed exclusively in the testis of control animals

Gene name	Number	Gene name	Number
vascular cell adhesion protein 1 precursor (V-CAM 1)	M84488	wee1 tyrosine kinase	Q63802
tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1)	M63122	Syp; SH-PTP2	U09307
CREB active transcription factor	P15337	serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit beta	M30581
cyclin-dependent kinase 2 alpha (CDK2-alpha) + cyclin-dependent kinase 2-beta (CDK2-beta)	Q63699 + Q63700	receptor protein-tyrosine phosphatase alpha	L01702
galactosyltransferase-associated protein kinase (GTA)	P46892	Rab-related GTP-binding protein	Q63483
p27Kip1	O35792	GTP-binding protein	M20713
ras-GTPase-activating protein (GAP)	L13151	guanine nucleotide-binding protein G(I) alpha 1 subunit	P10824
MSH2 DNA mismatch repair protein	P54275	Rab-11A	P24410
heat shock 70-kDa protein (HSP70)	Q63718	interferon inducible protein 10	P17105
plasma glutathione peroxidase precursor (GSHPX-P; GPX3)	P23764	inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase receptor 1	P42335
taurine transporter	P31643	calbindin D28	P07171
sodium/potassium-transporting ATPase beta 1 subunit (ATP1B1)	J02701	calretinin	P47728
ATP synthase, subunit c, P2 gene	Q06646	NVP-2	P35332
intrinsic factor precursor (INF; IF)	P17267	serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha	P20652
syntaxin binding protein Munc18-2	Q62753	LERK-2	P52796
galactoside 2-L-fucosyltransferase 2 (FUT2; FTB)	Q10984	nitric oxide synthase 1	P29476
sucrase isomaltase	P23739	gelatinase A	P97581
cytochrome B5 (CYB5)	P00173	proteasome subunit RC7-I	P40307
creatine kinase, ubiquitous, mitochondrial	P25809	proteasome subunit C9	P21670
fatty acid synthase	P12785	chemokine receptor-like 1 (CMKLR1)	O35786
mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I (liver isoform; CPT I)	P32198 P97780	ezrin	P31977
acyl-CoA dehydrogenase, short-branched-chain	U64451	myosin heavy chain 1 (MYR1)	Q05096
fatty acid amide hydrolase	P97612	gastric inhibitory polypeptide precursor (GIP; glucose-dependent insulinotropic polypeptide)	Q06145
2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase precursor	Q09426	Transforming growth factor beta (TGF-beta) masking protein large subunit	Q00918
squalene monooxygenase	P52020	c-src-kinase (CSK) & negative regulator	P32577
short chain acyl-CoA dehydrogenase precursor	P15651	Jak1 tyrosine-protein kinase	O35803
RET ligand 1 (RET1)	U97142	G protein beta-adrenergic receptor kinase 2 (beta-ARK2; EC 2.7.1.126)	M87855
secretin receptor	P23811	serum/glucocorticoid-regulated serine/threonine protein kinase (SGK)	Q06226
neuropilin	none		

Table 6: Genes expressed exclusively in the testis of 10mg TBT treated animals

<b>Gene name</b>	<b>Number</b>
apoptosis regulator bcl-2	P49950
D(4) dopamine receptor	M84009
insulin-like growth factor binding protein 1 precursor (IGFBP-1; IBP-1)	M89791

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of *in utero* exposure to TBT on postnatal body weight. Rats were exposed *in utero* to varying maternal doses of TBT (0-control, 2.5, 10 or 20mg/kg) from day 0-21 of gestation; they were weighed from postnatal day 2 to adulthood (male 90 days; female 60 days). All doses were significantly different from control ( $P < 0.05$ ; one way ANOVA followed by Duncan's or Bonferroni test). Numbers are mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean).

Figure 2. Glutaraldehyde fixed testis taken from 90 day old adult rat (A) Testis exposed during prenatal development to 20 mg/kg body weight of tributyltin, gestation day 0-19. Accumulation of lipids in the cytoplasm of Sertoli cells and germ cells (arrows) are observed in the treated but not in the control section (B). x500

Figure 3. Effect of TBT on (A) diameter of seminiferous tubules, (B) number of round spermatids per cross section of seminiferous tubules and (C) number of Sertoli cells/cross section of seminiferous tubules at stage I of the cycle of the seminiferous epithelium. The results do not show significant changes between the control and treated tissues.

Figure 4. Histogram showing the effect of in-utero exposure to TBT on the number Leydig cells per unit area of interstitial space. No change is found between the controls and TBT gestationally treated rats.

Figure 5. Electron micrograph of adult testis from treated animal (10 mg TBT). The field shows a developing round spermatid (step 7) presenting an alteration of its nuclear membrane (arrow). N, nucleus; A, acrosome; C, chromatoid body. x14,465

Figure 6. Electron micrographs of adult testes from treated animals (10 and 20 mg TBT) demonstrating the presence of abnormal acrosomes in developing spermatids. (A) Field showing acrosome displacement (arrows). (B) Micrograph showing a displacement of the

postacrosomal dense lamina (arrow). (C) Field showing acrosome malformation. N denotes nucleus. x14,465.

Figure 7. (A) Effect of *in utero* administration of TBT on the number of corpora lutea in adult rat ovary (60 day old). (B) Number of secondary antral follicles with size 600  $\mu\text{m}$  or larger in each ovary of the control and treated groups.

Figure 1

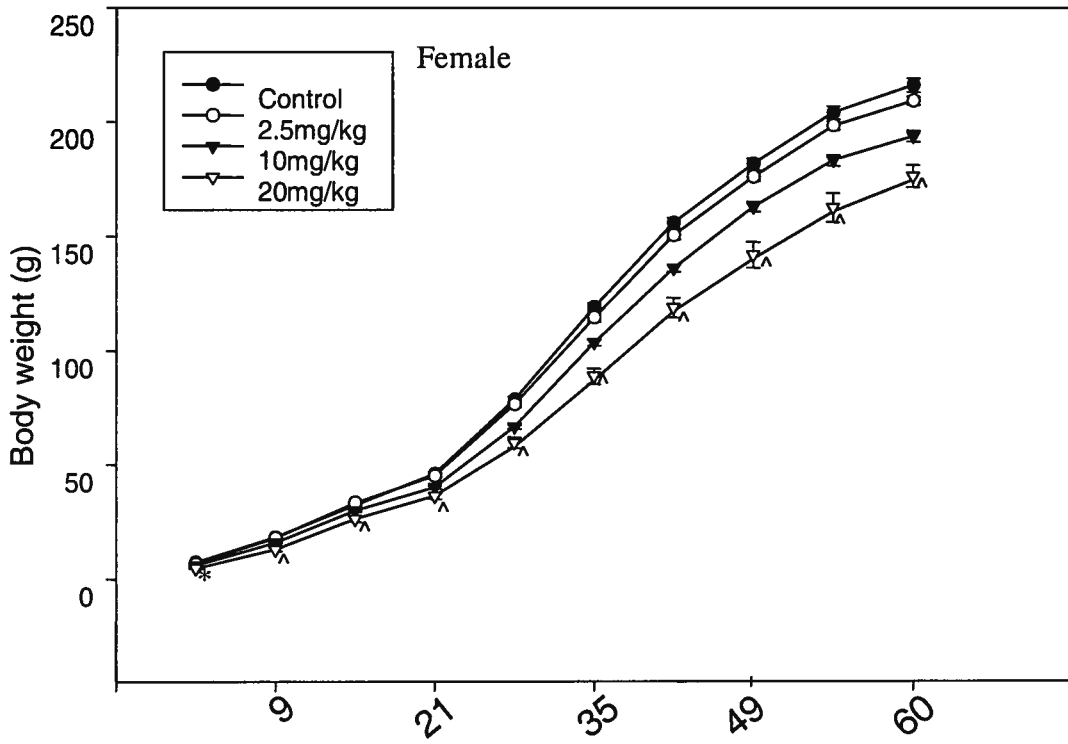
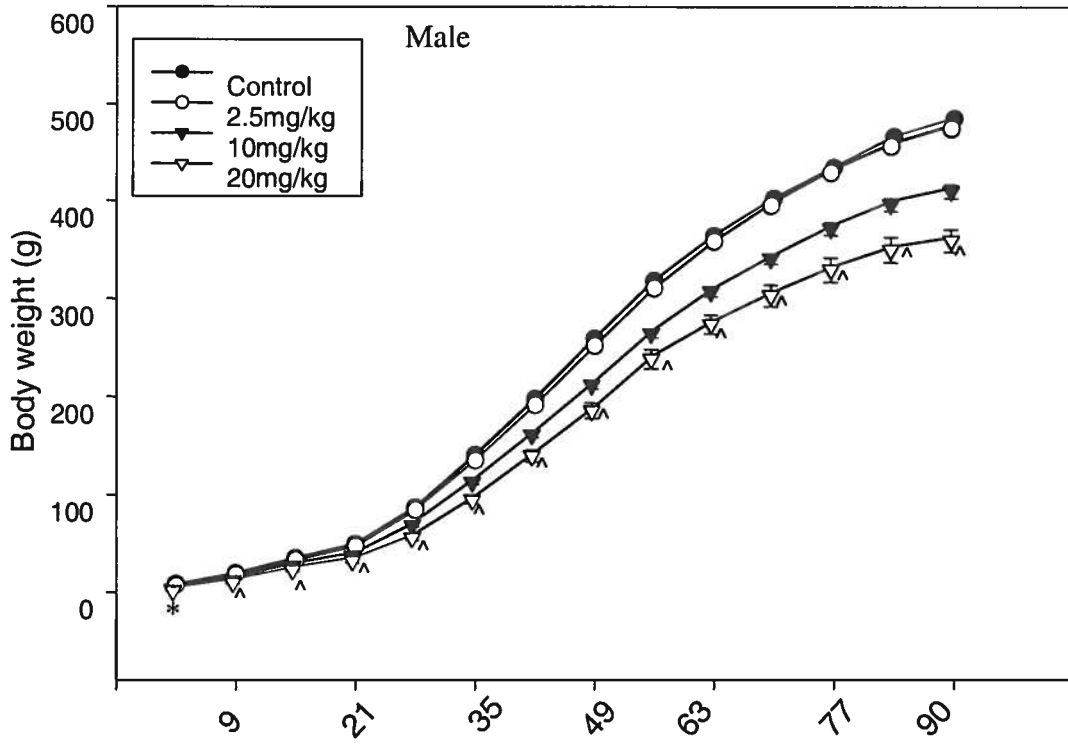


Figure 2

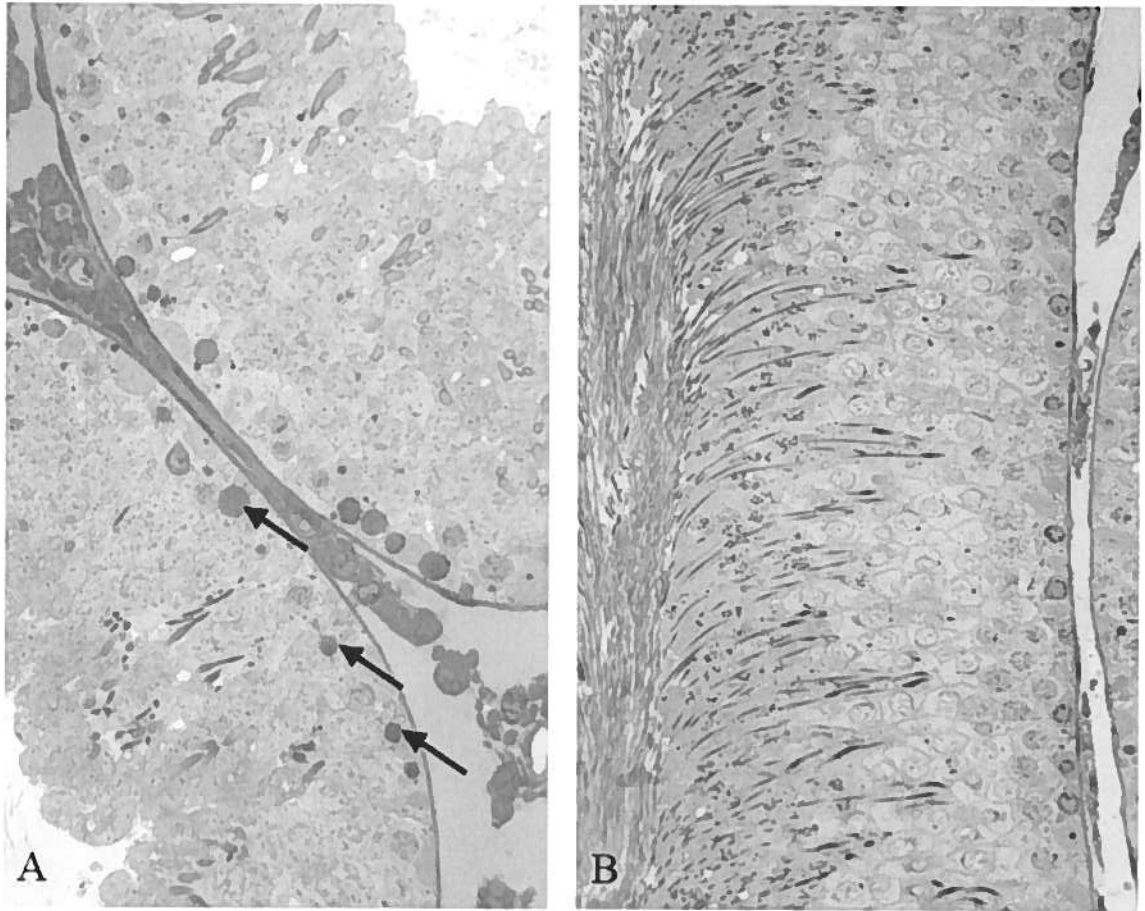


Figure 3

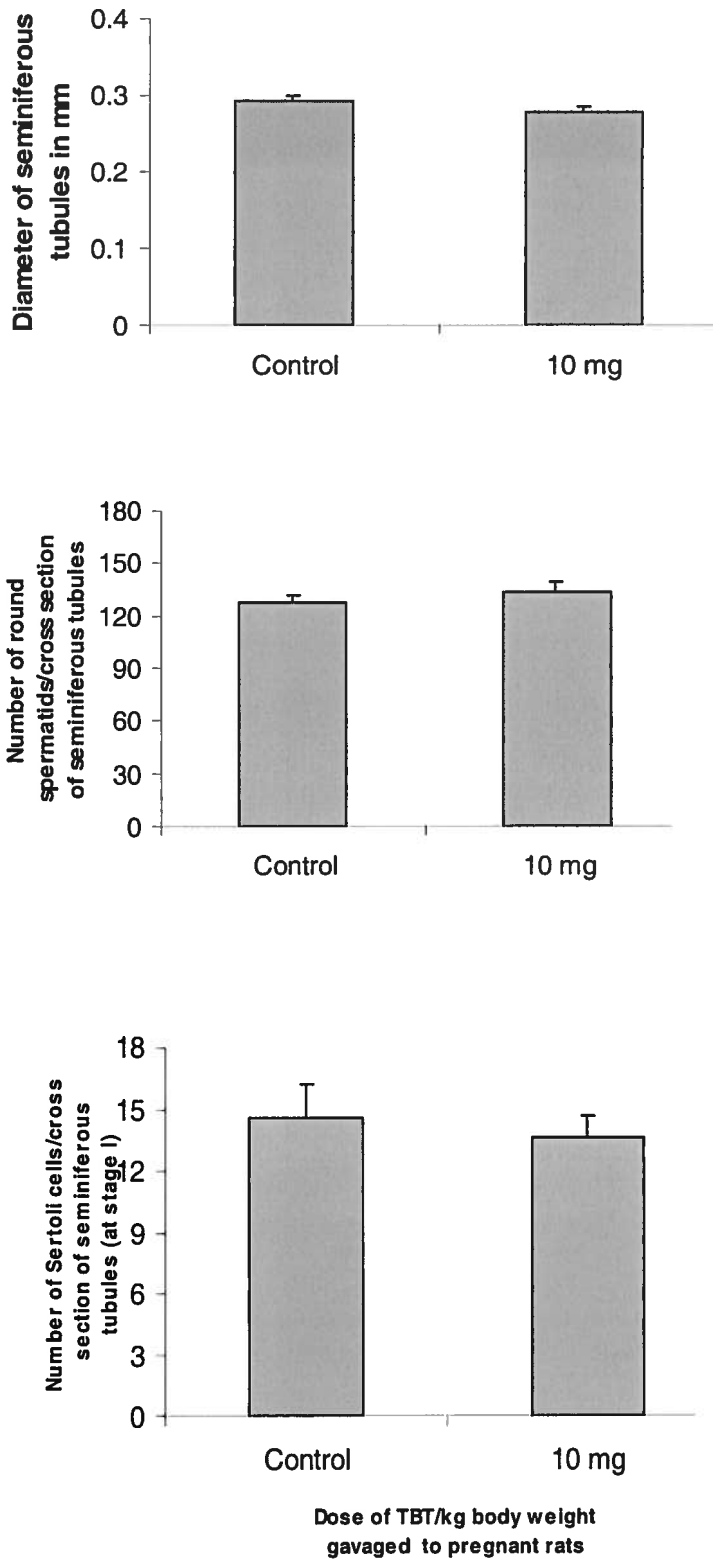




Figure 4

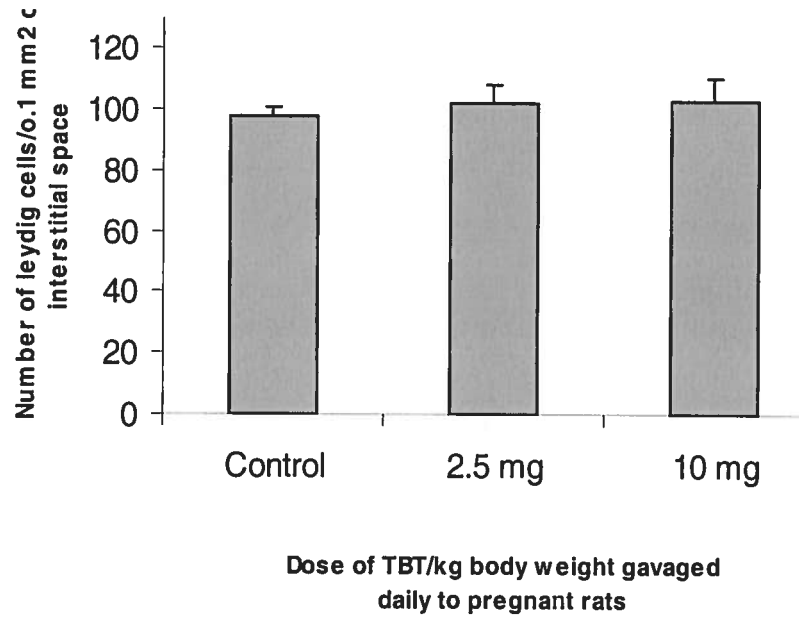


Figure 5

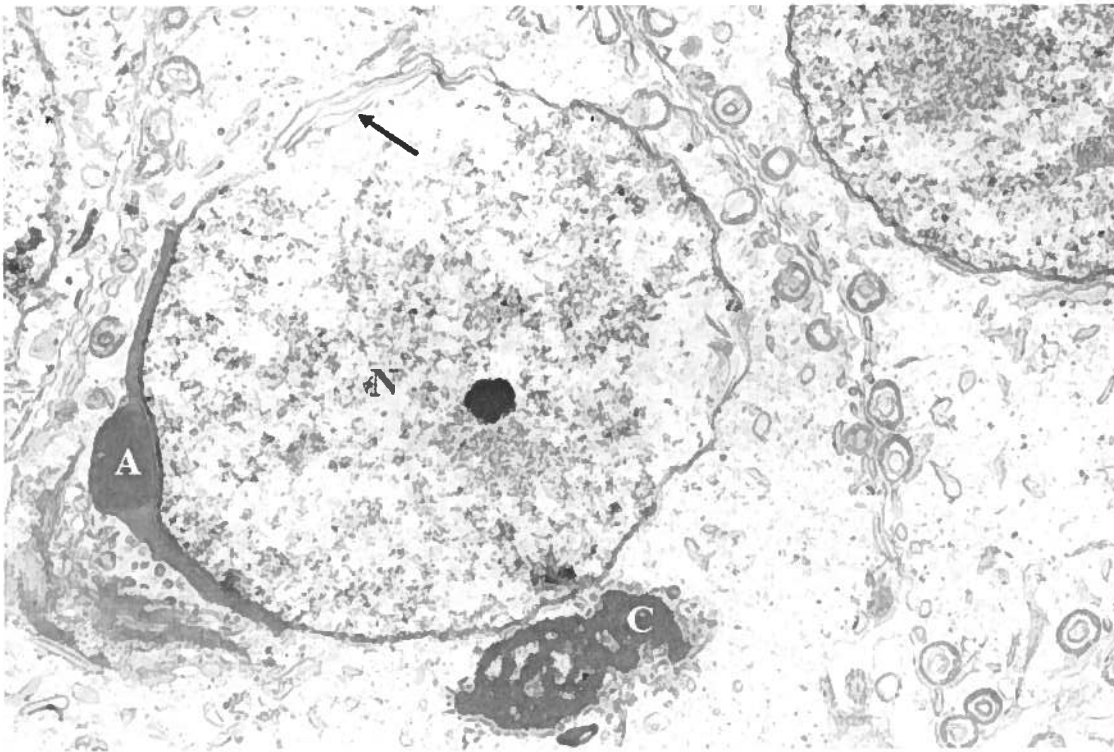


Figure 6

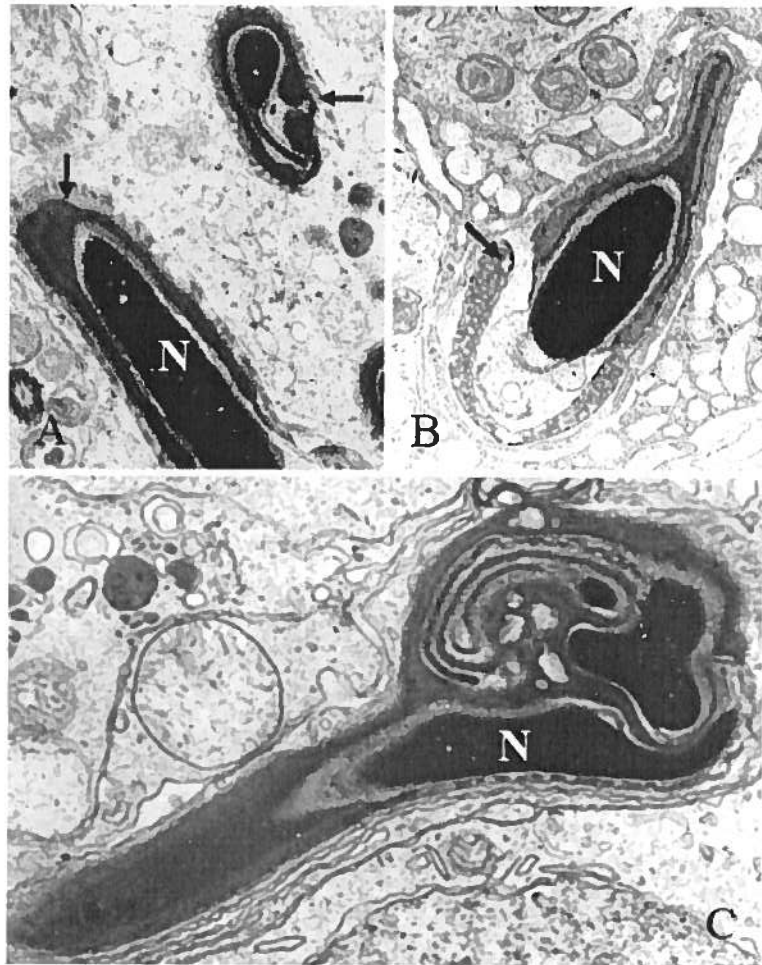
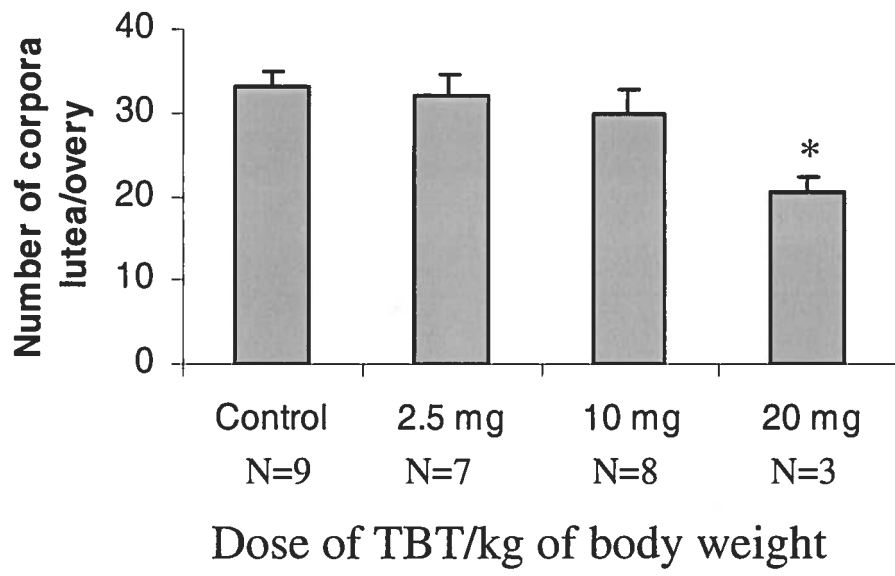


Figure 7







### Chapitre 3 : Effets du TBT sur la prostate ventrale

Cet article a été accepté en 2006 pour publication dans la revue 'Molecular Reproduction and Development'.

Pour cet article, j'ai réalisé l'ensemble des expériences, mis à part les études de macro-réseaux. J'ai rédigé la première version de l'article en entier, à partir de mes résultats et de ceux des autres auteurs. J'ai participé aux différentes révisions et aux corrections finales.





## Résumé

Le tributylétain (TBT), est un contaminant environnemental dont la toxicité sur le système reproducteur des organismes aquatiques. Cependant, il existe peu de données sur les effets du TBT sur la reproduction chez les mammifères.

Les jonctions cellulaires sont primordiales pour le développement et la maturation des spermatozoïdes. Les jonctions serrées sont formées de protéines transmembranaires appelées claudines (Cldns), et leur formation implique des acteurs des jonctions adhérentes, notamment les cadhérines. L'objectif de cette étude était de déterminer les effets d'une exposition *in utero* sur la prostate ventrale de rats. Des femelles furent exposées durant toute leur gestation à différentes doses de TBT (2,5, 10 or 20 mg/kg), les petits furent sevrés au jour post-natal 21 et sacrifiés au jour 91. Le poids de la prostate ventrale était significativement diminué, de façon dose-dépendante. Les résultats de l'analyse du patron d'expression des gènes ont montré que de nombreux gènes impliqués dans l'adhésion ou la polarité cellulaire étaient atteints. Les niveaux d'ARNm de Cldn-1 déclinaient suite à l'exposition au TBT. De plus, chez les individus contrôle, la Cldn-1 était immunolocalisée au niveau apical de la membrane latérale des cellules épithéliales prostatiques adjacentes, mais était de plus en plus dispersée le long de cette membrane avec des doses croissantes de TBT. Ainsi, soit le ciblage de Cldn-1 ou sa localisation au niveau des jonctions serrées étaient affectés après une exposition foetale au TBT. Les niveaux d'ARNm des autres Cldns étaient également altérés par l'exposition au TBT. Enfin, les niveaux d'ARNm d'E-cadhérine, ainsi que l'expression protéique diminuaient de manière dose-dépendante. Ces données démontrent qu'une exposition prénatale au TBT mène à des altérations permanentes dans la prostate ventrale et

qu'elles sont associées avec des changements dans la distribution et l'expression des protéines impliquées dans les complexes jonctionnels.

***IN UTERO* EXPOSURE TO TRIBUTYLTIN ALTERS THE EXPRESSION OF E-CADHERIN AND LOCALIZATION OF CLAUDIN-1 IN INTERCELLULAR JUNCTIONS OF THE RAT VENTRAL PROSTATE.**

Johanna Barthelemy<sup>1</sup>, Adedayo Adeeko<sup>2</sup>, Bernard Robaire<sup>2</sup> and Daniel G. Cyr<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 245 Hymus boulevard, Pointe Claire, QC, H9R 1G6 (JB, DGC) and <sup>2</sup> the Department of Pharmacology and Therapeutics and Departement of Obstetrics and Gynecology, and <sup>3</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, 3655 Sir William Osler Promenade, Montreal, Quebec, H3G 1Y6 (AA, BR).

Key words : Male reproduction, tight junctions, adherence junctions, cell adhesion

Running Title: TBT alters tight junction proteins in the prostate

Address for correspondence:

Dr Daniel G. Cyr  
INRS-Institut Armand-Frappier  
Université du Québec  
245 Hymus boul.  
Pointe Claire, QC, H9R 1G6  
Tel. (514) 630-8833  
Fax (514) 630-8850

## ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is an environmental contaminant, exhibiting well-established toxicity to reproductive systems in aquatic organisms. Little information exists regarding the effects of TBT on mammalian reproduction. Cellular junctions are crucial for proper sperm development and maturation. Intercellular tight junctions are formed by transmembrane proteins such as claudins (Cldns), while the formation of tight junctions involves signalling components of adhering junctions, comprised of cadherins. The objectives were to determine the effects of *in utero* exposure to TBT on the rat ventral prostate. Pregnant Sprague-Dawley rats were given doses of TBT (2.5, 10 or 20mg/kg) throughout gestation. Pups were weaned on day 21 and sacrificed at day 91. Ventral prostate weights of TBT treated rats were significantly decreased in all treatment groups. Results of gene expression macro-array analysis indicated that numerous genes related to cellular adhesion and cell polarity were affected. Cldn-1 mRNA levels decreased after exposure to TBT. Cldn-1 was immunolocalized to the apical lateral margins of adjacent prostatic epithelial cells in controls, but was increasingly dispersed along the lateral plasma membrane with increasing TBT dose, suggesting that either the targeting of Cldn-1 or its localization to tight junctions was altered as a result of foetal TBT exposure. mRNA levels of other Cldns were also altered with increasing doses of TBT. E-cadherin mRNA levels and immunolocalization were decreased in a dose-dependent manner. These data indicate that *in utero* TBT exposure results in permanent alterations in ventral prostate and that these are associated with changes in the distribution and amount of certain cell adhesion and junctional proteins.

## INTRODUCTION

Tributyltin (TBT) is an organotin used as an antifouling agent in paint for boats, in wood preservatives, and as a disinfectant in water cooling systems (Winship, 1988). Organotins are bioaccumulated in the environment and, consequently, have contaminated both food and drinking water resources (Ebdon *et al.*, 1989).

Organotins are toxic to marine species at low concentrations. Studies on macroinvertebrates, zooplankton and in fish during early life stages have demonstrated that exposure to TBT concentrations as low as 0.1 to 5 µg/l result in significant mortality (Beaumont and Budd, 1984). Effects on the endocrine system of invertebrates have also been reported in marine species. Exposure of female dogwinkle to TBT results in the development of imposex; animals become sterile as a result of the development of non-functional male reproductive organs (Bailey *et al.*, 1988). It has recently been demonstrated by Gooding *et al.* (2001) that in gastropods, one of the targets of TBT toxicity is the esterification of testosterone into fatty acids. TBT has also been reported to act as an aromatase inhibitor (McAllister and Kime, 2003).

TBT can also exert toxic effects on mammals. Accidental or occupational exposure of humans to TBT results in seizures and psychotic disturbances (Fortemps *et al.*, 1978; Ross *et al.*, 1981). A recent report on the concentrations of TBT in canned fish or seafood determined that the consumption of less than 100g of seafood could contain more than the acceptable daily intake of TBT (0.25µg/kg) for an adult (Forsyth and Casey, 2003). Animal studies have shown that exposure to high levels of TBT results in irreversible brain damage (Sloviter *et al.*, 1986). Yamabe *et al.* (2000) showed that TBT can disrupt androgen action. They reported that TBT could stimulate both cell

proliferation and androgen-dependent gene expression in prostate LNCaP cells. While these effects suggest an activation of the androgen receptor (AR), TBT itself does not activate the receptor. Krajnc *et al.* (1984) showed that rats exposed by gavage to 80 and 320 mg /kg bw of TBT exhibited lower circulating levels of TSH and increased LH concentrations; however, circulating FSH and corticosterone levels were unaffected. TBT can also affect circulating levels of thyroid hormones. Adeeko *et al.* (2003) demonstrated that in females exposed during gestation to doses ranging between 2.5 and 20mg/kg of TBT, exhibited significantly lower serum levels of thyroxine (T<sub>4</sub>) and triiodothyronine (T<sub>3</sub>). In adults, lifelong exposure of adult male rats to TBT resulted in lower serum T<sub>4</sub> levels (Cooke *et al.*, 2004).

*In utero* exposure to TBT has also been reported to alter development. In rats exposed to doses ranging from 0 to 16.3 mg/kg of TBT from days 0-7 of gestation, litter size was decreased. TBT appears to exert its greatest effect during preimplantation, even if post-implantation losses were observed (Harazono *et al.*, 1996). Studies from our laboratories have shown that female gravid rats exposed to 10 and 20 mg/kg of TBT during gestation produced pups with reduced birth weights and a high frequency of skeletal abnormalities (Adeeko *et al.*, 2003). It has also been shown that TBT inhibits cytochrome P450 aromatase activity, which converts androgens to estrogens, leading to an increase of non-converted androgens (Spooner *et al.* 1991; Bettin *et al.*, 1996; Cooke, 2002).

In male rats, exposure to TBT resulted in a significantly lower reproductive organ weights when the animals reached adulthood. In particular, the ventral prostate weights had considerably decreased, suggesting that the ventral prostate was a sensitive target of TBT, as was the testis in which spermatogenic disorders have been noted (Grote *et al.*,

2004 ; Yu *et al.*, 2003a ; Yu *et al.*, 2003b). In a previous study (Kishta *et al.*, submitted), we observed that *in utero* exposure of rats to TBT resulted in a dramatic decrease in the weight of the ventral prostate when the rats reached adulthood. Several factors are implicated in the development of the ventral prostate, including cell-cell interactions, which could represent a target of TBT.

Hara *et al.* (1994) have reported that in rats administered TBT, the permeability of tight junctions in the blood-brain barrier is increased, suggesting that the proteins which comprise tight junctions may represent a primary target for TBT. Cell-cell interactions are considered a critical process for the normal development and function of most organs. Tight junctions (TJs) are a part of the junctional complex between cells, and serve as an impermeable barrier between cells and help maintain cell polarity. Tight junctions are comprised of several integral transmembrane proteins including occludin (Furuse *et al.*, 1993, Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003), and a family of proteins termed claudins (Cldns; Furuse *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1999; Tsukita and Furuse, 1999). It has been reported that Cldn-1 is present in the human ventral prostate (Swisshelm *et al.*, 1999). Furthermore, both Cldn-3 and -4 have also been identified in the prostate, and their levels of expression increase in developing prostatic adenocarcinomas (Long *et al.*, 2001).

The formation of tight junctions involves a number of signalling and structural components that interact to assemble and maintain these structures. Among these components, adhering junctions are particularly important for the subsequent formation and maintenance of tight junctions. Interactions between these two types of cellular junctions have been proposed to be an essential cue for epithelial polarization (Miyoshi *et al.*, 2005). The objective of this study was to determine if *in utero* exposure of rats to TBT could have long-term effects during development on the tissues in the reproductive

system of the male offspring. Previous studies from our labs have shown that prostate development during gestation is altered following *in utero* exposure to TBT. The objectives of the present study were to determine how *in utero* exposure to TBT affects gene expression in the prostate of adult males and to assess whether the expression of proteins found in tight junctions was modified by this treatment.

## MATERIALS AND METHODS

*Animals:* Male (300–350g; 8 to 10 weeks old) and female (200–250g; 9 to 12 weeks old) Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Canada (St. Constant, Quebec) and housed in the McIntyre Medical Building Animal Resource Centre at McGill University with a 14-h light: 10-h dark cycle. The animals had free access to food (Purina chow 5012, Mondou Feeds, Montreal, Quebec) and water; all animal handling and care followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

The estrus cycle of virgin female rats was monitored for at least 1 week, and when in proestrus, females were mated overnight with males. Successful mating was indicated by the presence of spermatozoa in the vaginal smear on the following morning (day 0 of pregnancy). Pregnant rats were randomly divided into 5 groups; they were given a daily dose of vehicle (control;  $n=25$ ) or TBT chloride at 0.25, 2.5, 10 ( $n = 12/\text{treatment}$ ), or 20 mg/kg ( $n = 13/\text{treatment}$ ) by gavage. TBT chloride was administered from day 0 to 19 of pregnancy. All TBT chloride solutions were prepared fresh daily. On day 91, rats were weighed, euthanized with CO<sub>2</sub> and reproductive tissues were dissected and weighed. Tissues were subsequently either frozen in liquid nitrogen and stored at -86C or fixed by immersion in Bouin's fixative.



*cDNA Macroarrays* : Total RNA was extracted from the ventral prostate of control or TBT-treated (10mg/kg) rats using the Atlas™ Pure Total RNA Labeling System (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Frozen liver samples (100 mg) were placed in liquid nitrogen, ground to a powder, and homogenized with 1 ml of denaturing solution (BD Biosciences Clontech). RNA was subsequently extracted with three rounds of phenol:chloroform and precipitated with 2 ml of isopropanol. The RNA was precipitated for 10 min on ice and recovered by centrifugation at 12 000 rpm for 15 min at 4°C. The RNA pellet was then washed in 80% ethanol and suspended in RNAase-free H<sub>2</sub>O to ensure an RNA concentration of 1-2 µg/µl. The RNA was then treated with 1 unit/µl of RNAase-free DNAase I (Clontech BD Biosciences) to eliminate genomic DNA contamination. Finally, the quality of DNAase-treated RNA samples was confirmed by optical density at 260/280nm and by electrophoresis on a denaturing agarose gel.

cDNA probes were synthesised using a 50µg aliquot of total RNA that was reverse transcribed using MMLV reverse transcriptase and [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dATP (3 000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech; Baie d'Urfé, Qc.) with the Clontech Atlas™ Rat 1.2 II CDS primer mix (Clontech BD Biosciences). The  $^{32}\text{P}$ -labelled cDNA probes were then purified by column chromatography (CHROMA SPIN™-200 Columns; Clontech BD Biosciences).

The membranes containing the microarrays were prehybridized for 30 min with 5 ml ExpressHyb™ hybridization solution (Clontech BD Biosciences) warmed to 68°C and mixed with 0.5mg of heat-denatured sheared salmon testes DNA. A 5µl aliquot of C<sub>0</sub>t-1 DNA was added to the labelled probe. The sample was denatured by boiling for 2 min and rapidly cooled on ice for 2 min. The arrays were then hybridized with the labelled probe overnight with continuous agitation at 68°C. Following the hybridization, the

membranes were washed four times for 30 min at 68°C with wash solution 1 (2X 0.3M sodium citrate (SSC), pH 7.0, 1% SDS) and once for 30 min with wash solution 2 (0.1X 0.015M SSC, pH 7.0, 0.5% SDS). The membranes were then washed at room temperature for 5 min with 2X SSC, and exposed on a phosphorus screen.

Unsaturated exposed phosphorus screens were visualized with a PhosphorImager. The intensity of each spot was quantified using the Atlas Image™ version 2.0 software; these data were then imported to GeneSpring™ (version 4.0.7, Silicon Genetics, Redwood, CA) for further analysis. To control for experiment-to-experiment variations, the signal intensity for all genes on each membrane was averaged and the intensity of individual genes on that membrane normalized to this average value to give a relative intensity ratio for each gene. A gene was considered as being expressed if its intensity was at least two-fold the background intensity on each individual array, and it was expressed in at least three out of five replicates. An experiment-to-experiment normalization was done (GeneSpring) in order to minimize the variation from one experiment to the other; for each replicate array, the raw value of each gene was divided by the median intensity signal on its membrane to generate a relative intensity for that gene. The expression of a gene was considered altered by treatment when the difference in expression was at least 1.5-fold. In order to analyze individual changes in gene expression and because of the low variation between individual rats, we decided to select genes that were expressed in at least 3 out of 4 trials in any one subset. All genes that were selected for data analysis had signal intensities corresponding to at least twice the background level.

*RT-PCR Analysis:* Total RNA was isolated from rat ventral prostate using the guanidinium thiocyanate method as described by Chomzynski and Sacchi (1987). RT-

PCR was performed to determine which Cldns were present in the ventral prostate and their relative levels. The primers used for RT-PCR are indicated in Table 1. The primers were generated using either rat or mice Cldn sequences present in GenBank using the Oligo software (version 5.0). A 500ng aliquot of total RNA from rat ventral prostate was used for the reverse transcription (RT). RNA was denatured at 65°C for 2 min and RT was performed in a 20µl reaction volume with a final concentration of 1.5mM 10X PCR buffer (composed of 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTPs, 1U RNase inhibitor, 20U reverse transcriptase, 0.25 mM Oligo (dT) at room temperature for 10 min and then at 42°C for 60 min.

PCR amplifications was subsequently done in a 50µl reaction volume with a final concentration of 1.5 mM 10X PCR buffer, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 2.5U Taq DNA polymerase, 0.5 µM forward and 0.5 µM reverse primer. The cDNAs were amplified using 38 cycles (linear amplification) of denaturation at 94°C, annealing at 60°C for Cldn-1 and elongation at 72°C followed by 10 min at 72°C to add single deoxyadenosine (A) overhangs. For the other Cldns, the cDNAs were amplified using 30 cycles of denaturation at 94°C for 5 min and 80°C for 1 min, annealing at 56°C and elongation at 72°C, followed by 10 min at 72°C to add single deoxyadenosine (A) overhangs. In order to ensure that equal amounts of RNA were used, analyses with GAPDH primers were run in parallel. The cDNA was amplified using 27 cycles of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 60°C for 1min and elongation at 72°C for 1.5 min. Aliquots of 10µl of the amplicons were analyzed on a 1.25% agarose gel containing ethidium bromide and quantified using a densitometer (Bio-Rad Fluor Analyzer, Bio-Rad Laboratories, Toronto, ON).

*Northern Blot Analysis* : A 10µg aliquot of total RNA was loaded on a 1.25 % agarose-formaldehyde gel and separated by electrophoresis. The gel was then transferred onto a nylon membrane (GeneScreen Plus, DuPont Chemicals, Toronto, ON) and dried at 80°C for 1 h. Prehybridization and hybridizations were performed at 42°C in a solution containing 50% formamide, 1% SDS, 10% dextran sulfate, 0.17 mg/ml salmon sperm DNA and 30mM NaCl. The rat Cx43 cDNA probe was a generous gift from Dr. E. Beyer (University of Chicago, Chicago, IL) while the Cx32 probe was a gift from Dr. D. Paul (Harvard University, Boston, MA). The rat E-cadherin cDNA probe was generated by RT-PCR from rat ventral prostate. The cDNA probe was radio-labelled with [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP using a commercial kit ('ready-to-go' Oligo Labelling Kit; Amersham Pharmacia Biotech, Baie D'Urfe, QC). Northern blots were normalized for RNA loading using a radiolabeled oligonucleotide probe recognizing the 18S rRNA (Cyr et al., 1992). The resulting unsaturated images were scanned using a Phosphorimager (Storm, Molecular Dynamics Inc, Piscataway, NJ) and the integrated data under the curve for each signal was standardized against the signal for the 18S rRNA to determine the relative level of E-cadherin mRNA.

*Testosterone Radioimmunoassays*: Blood was obtained by cardiac puncture and allowed to clot overnight at 4°C. The samples were centrifuged and the resulting sera were frozen and stored at -86°C before analyses. Serum levels of testosterone were measured with a commercially available kit (ICN, Medicorp, Montreal, Qc). Each sample was analyzed in duplicate.

*Immunocytochemistry:* Bouin's-fixed tissues were dehydrated and embedded in paraffin. Sections (5µm) were subsequently treated as previously described (Cyr *et al.*, 1992). Immunocytochemical localization of Cldn-1 and E-cadherin in the ventral prostate was performed using affinity-purified Cldn-1 polyclonal rabbit antiserum (10 µg/ml; Zymed Laboratories, Inc., Seattle, WA) and E-cadherin polyclonal rabbit antiserum (2µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Antibody binding to Cldn-1 or E-cadherin was detected using a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:250; Sigma-Aldrich, Toronto, ON).

*Statistical analysis:* Statistical differences between groups were determined by ANOVA followed *a posteriori* by Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons between experimental groups. Significance was established at  $P < 0.05$ . All analyses were performed using SigmaStat computer software (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

## RESULTS

**Measurement of body and organ weights.** *In utero* treatment with TBT did not cause any mortality, with the exception of the high dose group (20mg/kg), in which only two rats survived the treatment. In order to assess the effects of the TBT exposure on general health and organogenesis in the male reproductive tract, various parameters, including the body weight of animals and the weights of male accessory glands were measured. Significant decreases of 13 and 36% in the body weights of rats treated during gestation with either 10 or 20 mg/kg of TBT, respectively, were observed. The weights of the testes were not affected (Fig. 1). Ventral prostate weights were significantly decreased for 10 mg/kg treatment groups. Ventral prostate weights were 38% lower in the 10 mg/kg group and 30% lower in the 20mg/kg group (Fig. 1). Seminal vesicle and epididymal weights, which are both androgen-dependant tissues, were not affected by TBT treatment.

**Measurement of serum testosterone levels.** Serum levels of testosterone in adult male rats were assayed by RIA. Serum levels of testosterone were in the normal range for adult rats measured with a similar commercial assay. We did not observe any significant differences in the concentration of serum testosterone between control and TBT-treated rats (Fig. 2).

**Prostate Gene Expression Profile.** Of the 1176 genes on the cDNA arrays, 20% were detected in the ventral prostate of adult control rats. Approximately 6% of the genes that were expressed in control rats were absent in the TBT-treated rat prostates (Table 2),

while only 0.4% were expressed exclusively in TBT-treated ventral prostates (Table 3). The majority of the genes remained expressed in both controls and TBT-treated animals. Of the 191 genes that remained expressed in both groups, 159 of these were not significantly different between control and TBT-treated rats (Fig. 3). The expression of the 32 remaining genes was decreased by at least 1.5 fold. Of these, 26 genes were decreased by 1.5-3.0 fold and a single gene was decreased by more than 3-fold (Table 4).

**Gene Families. Androgen-Related Genes:** The ventral prostate is an androgen-responsive tissue. The weight of the ventral prostate varies according to levels of biologically active androgens. The level of expression of the androgen receptor (AR) was not significantly different between control and TBT-treated rats (Fig 4A). Circulating levels of testosterone are converted to the biologically active dihydrotestosterone (DHT) in the ventral prostate by the 4-ene-steroid-5 $\alpha$ -reductase (5 $\alpha$ -R). TBT exposure did not alter 5 $\alpha$ -R mRNA levels in the ventral prostate (Fig 4A). Both the androgen-binding protein (ABP) and clusterin were significantly down-regulated in TBT-treated rats. Interestingly, clusterin is an androgen-repressed gene, suggesting that the observed down-regulation was independent of androgen action. Other androgen-regulated genes such as probasin and NGFIB were unaltered by treatment (Fig. 4A).

**G-Proteins:** G-proteins play an essential role in the signalling process, implicating cell adhesion molecules such as cadherins. These have been shown to be implicated in cell polarity, which is determined by both cell adhesion molecules and tight junctions. Analyses of the macroarray data indicated that four G-proteins, Rab16, Rab 14, RaI A and

GNAI2, were significantly decreased in the TBT-treated rats (Fig 4B). The fact that these genes were decreased, as were those of the tight and adhering junctions, is suggestive of alterations in the processes implicated in the establishment and/or maintenance of cell polarity.

*Kinases:* Protein kinases have been shown to be important for the assembly of tight junctions. It has been reported that cadherin-cadherin interactions can result in an increase in protein kinase C activity, which is in turn implicated in the phosphorylation of ZO proteins which link the transmembrane proteins, such as occludin and claudins, to the actin filaments of the cytoskeleton (Denker and Nigam, 1998 ; Cyr *et al.*, 2002). Our analyses indicated that four protein kinases were decreased following treatment with TBT (Fig 4C). Cellular mRNA levels of the protein kinase C inhibitor protein 1, Mitogen activated kinase9, LIMK2 and PKI-beta were 1.5 fold lower in the TBT- treated rats.

*Proteases:* Interestingly, TBT-exposed rats showed decreases in several proteases (Fig 4D), including calpastatin, a protein inhibitor of calpain, an intracellular calcium-dependent protease implicated in the regulation of  $\beta$ -catenin (Benetti *et al.*, 2005), and maspin, a serine protease inhibitor with tumor suppression activity (Maass *et al.*, 2000). Other proteases were also decreased 1.5 fold in TBT-treated animals.

**Expression of Cldns in the ventral prostate.** RT-PCR was done to determine which Cldns were expressed in the rat ventral prostate of adult rats. Specific transcripts for Cldn-1, -3, -4 and -8 were detected. Cldn-5 was also present (data not shown); however,



this protein is expressed in endothelial cells and was likely present in blood vessels of the ventral prostate, rather than the tissue itself. Cldn-6, -9 and -11 were not detected in the adult ventral prostate (Fig 5).

Once we established which Cldns were present in the ventral prostate, we then wanted to determine if TBT treatment had altered the expression of any of these Cldns. Our results indicated that Cldn-1 mRNA levels were decreased in a dose-dependant manner. Cldn-1 mRNA levels were 38% lower in the 2.5 mg/kg group, 46% in the 10 mg/kg group and 56% in the 20 mg/kg group as compared to levels in control animals (Fig 6). However, Cldn-3 mRNA levels appeared to increase with TBT treatment. In this case, levels increased by 22% in the lower doses, and by 100% in the ventral prostates of the high dose group (Fig 6). Interestingly, Cldn-8 mRNA levels were increased by 115% and 127% in the 2.5 and 10 mg/kg TBT groups, but by only 63% in the 20 mg/kg group, relative to control levels (Fig 6). There were no differences in Cldn-4 mRNA levels between any of the treatment groups (Fig 6).

**Immunolocalization of Cldn-1 in the ventral prostate.** Immunostaining of Cldn-1 indicated that it was localized to the apical margin of epithelial cells of the ventral prostate of control rats. In rats exposed to TBT, the immunostaining of both Cldn-1 and -3 was altered, and these claudins localized not only to the apical margin but all along the plasma membrane. This phenomenon appeared to increase with higher doses (Fig 7).

**Effects of TBT on E-cadherin levels.** The assembly of tight junctions is believed to involve close interactions between adhering and tight junctions. In order to determine if the changes observed in localization of Cldns-1 and -3 were the result of alterations to

adhering junctions, we decided to assess whether or not E-cadherin levels were altered. E-cadherin mRNA levels in the rat ventral prostate were determined by Northern blot analysis (Fig 8). Our results indicated a significant dose-dependent decrease in E-cadherin mRNA levels in the ventral prostate for adult rats exposed *in utero* to TBT. E-cadherin mRNA levels were 58, 82 and 95% lower in the 2.5, 10 and 20 mg/kg TBT-treated groups, respectively, as compared to controls.

Immunostaining of E-cadherin was done to determine if there were commensurate changes in its localization. Immunoreactive E-cadherin was localized at the plasma membrane between adjacent epithelial cells of the ventral prostate, as expected (Fig 7). However, in TBT-treated rats, the intensity of the immunoreaction was greatly diminished and in some cases, nearly absent.

## DISCUSSION

*In utero* exposure to TBT resulted in dramatically decreasing ventral prostate weights when the animals reached adulthood. In order to understand the mechanism by which TBT alters ventral prostate development, gene expression was assessed using cDNA macroarrays. Using this approach we were able to detect the expression of 234 genes in the ventral prostate of adult rats. *In utero* exposure to TBT resulted in the expression of 5 new, specific transcripts in the ventral prostate of adult rats; a total of 32 genes were down-regulated by at least 1.5-fold, and 46 genes were suppressed. This suggests that TBT probably acts primarily by modulating gene expression profiles.

Analyses of specific families of genes indicated that the mRNA levels of different kinases and proteases expressed in rat ventral prostate were decreased by TBT exposure. Careful analysis of the function of these genes indicates that many of these are either regulated by cell-cell interactions or are implicated in junction formation and cell polarity, suggesting that perhaps their expression may be altered. The decreases in KCIP1 and PKI-beta mRNA levels are particularly interesting, as it has been previously demonstrated that the dynamics of the tight-junctions are regulated by kinases, and that alterations in the activity of kinases can result in the disruption of tight junctions (Li *et al.*, 2001).

G-proteins are also known to play a role in the regulation of tight junction assembly. For example, the activation of Cdc42 and Rac, small G proteins, enhances the formation of cadherin-based adherens junctions and claudin-based tight junctions (Fukuyama *et al.*, 2005); supporting our observations of effects on these junctions in TBT-exposed rats. Proteases are also implicated in the regulation of junction assembly. Calpain, a member of a family of intracellular calcium-dependent cysteine proteases, cleaves several cellular proteins, including components of cellular adhesion (Carragher *et*

*al.*, 2004). Downstream of the ERK/MAPK pathway, calpain plays a role in the loss of cell adhesion and turnover of adhesion proteins. If calpastatin, the protein inhibitor of calpain, is down regulated in TBT-treated rats, calpain can have a major effect in promoting focal adhesion turnover and loss of cell-extracellular matrix adhesion. It has also been shown recently that the calpain system is involved in the regulation of  $\beta$ -catenin. Calpastatin has been reported to control levels and localization of  $\beta$ -catenin (Benetti *et al.*, 2005), a multifunctional protein implicated in both the structural and intracellular signalling of adhering junctions. Furthermore, Cheng and Mruk (2002) have shown that in Sertoli cells, if concentrations of proteases exceed those of protease inhibitors, the tight junctions are compromised and there is a decrease in Trans Epithelial Resistance between cells.

The results obtained from the macroarrays would support the notion that TBT may stimulate a variety of cellular signalling pathways which contribute to altering prostatic tight junctions and altering aspects of cell polarity, which are themselves regulated by tight junctions (Miyoshi *et al.*, 2005). It has been reported that tight junctions between adjacent epithelial cells that line the prostatic lumen may form a functional prostatic epithelial barrier (Fulmer and Turner, 2000). This barrier would likely function to protect spermatozoa from the immune system (Fulmer and Turner, 2000). Prostatic tight junctions are comprised of occludin and Cldns (Furuse *et al.*, 1993, Morita, 1999; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003). Briehl and Miesfield (1991) first demonstrated the presence of a cellular protein, RVP.1, expressed at low levels in both the ventral prostate and epididymis. This protein was later identified in other tissues and has been termed Cldn-3. In addition, Long *et al.* (2001) reported that the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) is Cldn-4 and that it is expressed in the epithelium of prostate

cancer cells. Similar results have been reported by Michl *et al.* (2001). Swisshelm *et al.*, (1999) reported that Cldn-1 (also referred to as SEMP-1) is present in the ventral prostate.

In the present study we report that prostatic tight junctions are comprised of several different Cldns including Cldn-1, -3, -4 and -8. Cldns-6, -9 and -11 appear to be absent in this organ or are expressed at very low levels. The varied patterns of Cldn expression among different tissues suggest that specific combinations of these proteins allow for the regulation of different functions associated with tight junctions, including epithelial permeability, cell polarity and paracellular transport (Tsukita and Furuse, 2000). In the male reproductive tract, studies have shown that tight junctions in the testis and epididymis are made up of several different claudins and occludin (Morita, 1999; Cyr, 2001; Cyr *et al.*, 2003). It has been shown that the over-expression of certain claudins, such as Cldn-1 in MDCK cells, can increase transepithelial resistance (TER), reflecting a decrease in the permeability of the tight junction (Inai, 1999). The over expression of Cldn-4 in MDCK results in a decrease in sodium permeability between cells (Van Itallie, 2001; Mitic, 2003) In contrast, an increase in the expression of Cldn-2 in MDCK cells has been shown to result in a more permeable tight junction (Furuse *et al.*, 2001). Furthermore, studies by Gye (2003) on Sertoli cells indicated that when these cells were co-cultured with Leydig cells, there was an increase in TER, characterized by an increase in Cldn-11 expression but a decrease of Cldn-1. In Cldn-1 deficient mice, the animals died within 1 day of birth, as a result of an increase in the permeability of tight junctions between skin epithelial cells. However, tight junctions between these cells were still present and were positive for Cldn-4 and occludin (Furuse *et al.*, 2002). Hence, the presence of different tight junctional proteins appears to allow for rapid adjustments of tight junctional permeability that may be required to regulate changing

microenvironments. Results from our study have demonstrated that *in utero* exposure to TBT affected the expression profiles of several Cldns. Cldn-1 mRNA levels tended to decrease in a dose-dependent manner. In contrast, Cldn-3 mRNA levels increased, although only in the highest dose group, as compared to controls. Levels of Cldn-4 mRNA were unaffected by TBT exposure, while Cldn-8 mRNA levels were significantly increased in both the 2.5 and 10 mg/kg groups, relative to controls. These results suggest that some sort of compensatory effect may exist among the various Cldns present in the ventral prostate. Few studies have reported a similar phenomenon, with the exception of work done with Cldn-6 in mice. Skin epithelial studies in mice, in which Cldn-6 was over-expressed, resulted in effects on endogenous levels of mRNA of multiple Cldns (Turksen and Troy, 2002; Segre 2003). Thus, we propose that, in the ventral prostate, over-expression of Cldn-8 may be the result of an effect to compensate for decreased Cldn-1 mRNA levels.

While the expression of Cldns at the mRNA level provides information on regulation at the transcriptional level, our laboratory has shown that post-transcriptional alterations in junctional proteins are also regulated, and therefore represent a potential target of xenobiotics. Several studies have already reported that tight junctions represent a target for xenobiotics (Leroy, 2003; Basuroy, 2005). Using immunocytochemistry, our results in the present study indicated that the cellular targeting of Cldn-1 was altered in adult rats that were exposed *in utero* to TBT. Thus, in control rats, Cldn-1 was localized to the apical lateral margins of adjacent epithelial cells which line the prostatic duct. Exposure to increasing doses of TBT resulted in misdirected targeting of Cldn-1, which appeared more diffuse along the lateral plasma membrane of adjacent epithelial cells.

These changes suggest that either the function of the tight junctions was altered or that there was a direct effect on the targeting mechanism.

Among the most important regulators of tight junctions are the cellular components of the adhering junction. During the formation of tight junctions, cytoplasmic components of tight junctions such as zona occludens-1 (ZO-1) and ZO-2 first associate with the adhering junctions and subsequently dissociate as the tight junction is formed apically from the adhering junctions (DeBellefeuille et al., 2003). In the prostate, E-cadherin is present between adjacent epithelial cells. Since decreased expression of E-cadherin has been shown to be important in the development of prostate cancer (Jaggi *et al.*, 2005), and because of the role of adhering junctions in the formation of tight junctions (Cereijido *et al.*, 2000 ; Miyoshi and Takai, 2005), we wanted to determine whether E-cadherin expression at either the RNA or protein level was altered in rats treated with TBT *in utero*. Results indicated that E-cadherin mRNA levels were significantly decreased in TBT-treated rats at all doses. Furthermore, using an immunocytochemical approach, our results suggest that in rats treated with TBT there was also a decrease in E-cadherin protein levels, relative to control rats. This decrease in E-cadherin, in addition to the effects observed on the kinases in the macro-array analysis may explain, in part, the observed decrease in Cldn-1 mRNA and Cldn-3 levels and protein localization. If the composition of adhering junctions is altered, tight junctional proteins such as Cldn-1 may not be able to properly localize to the area of the tight junction.

It has been shown by Hara et al. (1984) that following exposure to TBT, the blood-brain barrier becomes leaky, as a result of TBT competition for Ca<sup>2+</sup> binding sites on the endothelial cells. However, it has been shown that the intercellular association of Cldns at the points of contact of the tight junctional complex is independent of Ca<sup>2+</sup>

(Kubota et al., 2001), suggesting that the effects of TBT do not occur at the level of Cldns. On the other hand, Ca<sup>2+</sup> is necessary for both cadherin function and PKC activation, and since both are implicated in the regulation of tight junction assembly (Kemler R., 1993), it is reasonable to propose that TBT exerts its effect on tight junctions by acting directly at the level of cadherins.

A recent study by Gye (2003) reported the effects of flutamide, an antiandrogen used in treatment of the prostate cancer, on the expression of tight junctional proteins in the testis. In these experiments, the expression of occludin was significantly decreased, but levels of Cldn-1 and -11 were not affected, suggesting that androgens do not regulate Cldn-1 expression in the testis. In the epididymis, Gregory et al. (2001) reported that androgens regulated the expression and localization of Cldn-1, but only in the initial segment. In the present study, serum levels of testosterone were not significantly altered by prenatal exposure to TBT; hence, the effects observed on both ventral prostate weight and Cldn-1 appeared to be independent of androgen action.

Gap junctions have also been reported in rat ventral prostate (Meda et al., 1993; Pointis et al., 2005). Cx43 is expressed early in development while Cx32 is expressed in the adult prostate. Exposure to TBT did not result in any changes in Cx32 mRNA levels in the adult ventral prostate (data not shown). This suggests that TBT affects cell-cell interaction primarily via cell adhesion and the formation of tight junction.

Together, these results suggest that in utero exposure to TBT alters prostatic tight junctions and that this effect may be the result of decreased E-cadherin-mediated intercellular adhesion. Such effects may be particularly important for epithelial functions of the prostate cells.



## ACKNOWLEDGEMENTS :

The authors thank M. Gregory, T. Luu and D. Li for their assistance and helpful suggestions. This study was supported by the Toxic Substances Research Initiative (Health Canada) and a studentship to JB from the Fondation Armand-Frappier.

## REFERENCES

1. Adeeko A, Daming L, Kishta O, Barthelemy J, Brawer J, Morales C, Hermo L, Cyr DG, Robaire B, Hales BF, Trasler JM. In Utero Exposure to Tributyltin Chloride Differentially Alters Fetal Gonad Morphology and Gene Expression Profiles In The Sprague-Dawley Rat. In press.
2. Adeeko A, Li D, Forsyth DS, Casey V, Cooke GM, Barthelemy J, Cyr DG, Trasler JM, Robaire B, Hales BF. 2003. Effects of in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome. *Toxicol Sci* 74:407-415.
3. Bailey SK, Davies IM. 1988. Tributyltin contamination in the Firth of Forth (1975-87). *Sci Total Environ* 76:185-192.
4. Basuroy S, Sheth P, Mansbach C, Rao RK. 2005. Acetaldehyde Disrupts Tight Junctions and Adherens Junctions in Human Colonic Mucosa: protection by EGF and L-Glutamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G367-75.
5. Beaumont AR, Budd MD. 1984. High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. *Mar Pollut Bull* 15:402-405.
6. Benetti R, Copetti T, Dell'Oraso S, Melloni E, Brancolini C, Monte M, Schneider C. 2005. The Calpain-system is involved in the constitutive regulation of  $\beta$ -catenin signalling functions. *J Biol Chem* 280:22070-22080.
7. Bettin C, Oehlmann J, Stroben E. 1996. TBT-induced imposex in marine gastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgol Meeresunter* 50:299-317.
8. Briehl MM, Miesfeld RL. 1991. Isolation and characterization of transcripts induced by androgen withdrawal and apoptotic cell death in the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* 5:1381-1388.
9. Carragher NO, Frame MC. 2004. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 14:241-249.
10. Cereijido M, Shoshani L, Contreras RG. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G477-482.
11. Cheng CY, Mruk DD. 2002. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 82:825-874.
12. Cooke GM. 2002. Effect of organotin on human aromatase activity in vitro.

Toxicol Lett 126:121-130.

13. Cooke GM, Tryphonas H, Pulido O, Caldwell D, Bondy GS, Forsyth D. 2004. Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part 1: Toxicology, histopathology and clinical chemistry. *Food Chem Toxicol* 42:211-220.
14. Cyr DG. 2001. Cell-cell interactions in the epididymis. In Robaire B, Morales C, Chemes H editors. *Andrology in the Twenty First Century*. New York : Medimond Medical Publications. p 215-226.
15. Cyr DG, Hermo L, Blaschuk OW, Robaire B. 1992. Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. *Endocrinology* 130:353-63.
16. Cyr DG, Finnson K, Dufresne J, and Gregory M. 2002. Cellular interactions and the blood-epididymal barrier. In Robaire B, Turner T editors. *The epididymis: From molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers. p 103-118.
17. Denker BM, Nigam SK. 1998. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol* 274:F1-9.
18. Ebdon L, Evans K, Hill S. 1989. The accumulation of organotins in adult and seed oysters from selected estuaries prior to the introduction of U.K. regulations governing the use of tributyltin-based antifouling paints. *Sci Total Environ* 83:63-84.
19. Fortemps E, Amand G, Bomboir A, Lawerys R, Laterre EC. 1978. Trimethyltin poisoning. Report of two cases. *Int Arch Occup Environ Health* 41:1-6.
20. Fulmer BR Turner TT. 2000. A blood-prostate barrier restricts cell and molecular movement across the rat ventral prostate epithelium. *J Urol* 163:1591-1594.
21. Fukuhara T, Ogita H, Kawakatsu T, Fukuhara T, Yamada T, Sato T, Shimizu K, Nakamura T, Matsuda M, Takai Y. 2005. Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 Signaling in the Nectin-induced Activation of Cdc42 and Formation of Adherens Junctions. *J Biol Chem* 280:815-825.
22. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-1788.
23. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence

similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550.

24. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. 2001. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol*. 153:263-272.
25. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099-1111
26. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81:1-44.
27. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65:475-502.
28. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. 1995. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55(22):5195-5199
29. Gregory M, Dufresne J, Hermo L, Cyr DG. 2001. Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the epididymis. *Endocrinology* 142: 854-863.
30. Gooding MP, LeBlanc GA. 2001. Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Gen Comp Endocrinol* 122:172-180.
31. Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA. 1999. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell* 99:649-659.
32. Grote K, Stahlschmidt B, Talsness CE, Gericke C, Appel KE, Chahoud I. 2004. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicology* 202:145-158.
33. Gye MC. 2003. Changes in the expression of claudins and transepithelial electrical resistance of mouse Sertoli cells by Leydig cell coculture. *Int J Androl* 26:271-278.
34. Habermann H, Chang WY, Birch L, Mehta P, Prins GS. 2001. Developmental Exposure to Estrogens Alters Epithelial Cell Adhesion and Gap Junction Proteins in the Adult Rat Prostate. *Endocrinology* 142:359-369.
35. Hara K, Yoshizuka M, Doi Y, Fujimoto S. 1994. Effect of bis tributyl tin oxide on permeability of the blood-brain barrier: a transient increase. *Occup Environ Med* 51:735-738.

36. Harazono A, Ema M, Ogawa Y. 1996. Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. *Toxicol Lett* 89:185-190.
37. Huynh HT, Alpert L, Laird DW, Batist G, Chalifour L, Alaoui-Jamali MA. 2001. Regulation of the gap junction connexin 43 gene by androgens in the prostate. *J Mol Endocrinol* 26:1-10.
38. Inai T, Kobayashi J, Shibata Y. 1999. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol.* 78:849-855.
39. Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. 2005. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urol Oncol.* 23:402-406.
40. Jarred RA, Cancilla B, Prins GS, Thayer KA, Cunha GR, Risbridger GP. 2000. Evidence that estrogens directly alter androgen-regulated prostate development. *Endocrinology* 141:3471-3477.
41. Kemler R. 1993. From cadherins to catenins : cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 9:317-321.
42. Kishta O, Adeeko A, Barthelemy J, Gregory M, Cyr DG, Li D, Luu T, Hermo L, Brawer JR, Robaire B, Hales BF, Morales CR. (submitted). In utero Exposure to Tributyltin Chloride: Long-Term Consequences on Postnatal Development in the Sprague-Dawley Rat.
43. Krajnc EI, Wester PW, Loeber JG, Van Leeuwen FX, Vos JG, Vaessen HA, Van der Heidjen CA. 1984. Toxicity of bis (tri-n-butyltin)oxide in the rat, Short-term effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid systems. *Toxicol Appl Pharmacol* 30:363-86.
44. Kubota K, Furuse M, Sasaki H, Sonoda N, Fujita K, Nagafuchi A, Tsukita S. 1999. Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr Biol* 9:1035-1038.
45. Leroy A, de Bruyne GK, Oomen LC, Mareel MM. 2003. Alkylphospholipids reversibly open epithelial tight junctions. *Anticancer Res.* 23:27-32.
46. Li JC, Mruk D, Cheng CY. 2001. The inter-Sertoli tight junction permeability barrier is regulated by the interplay of protein phosphatases and kinases: an in vitro study. *J Androl* 22:847-856.
47. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. 2001. Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res* 61:7878-7881.
48. Maass N, Hojo T, Zhang M, Sager R, Jonat W, Nagasaki K. 2000. Maspin--a novel protease inhibitor with tumor-suppressing activity in breast cancer. *Acta Oncol*

39:931-934.

49. McAllister BG, Kime DE. 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 65:309-16.
50. Meda P, Pepper MS, Traub O, Willecke K, Gros D, Beyer E, Nicholson B, Paul D, Orci L. 1993. Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology* 133:2371-2378.
51. Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM. 2001. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterol* 121:678-684.
52. Mitic LL, Unger VM, Anderson JM. 2003. Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4. *Protein Sci* 12:218-227.
53. Miyoshi J, Takai Y. 2005. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev* 57:815-855.
54. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *PNAS USA* 96:511-516.
55. Okada K, Ishikawa N, Fujimori K, Goryo M, Ikeda M, Sasaki J, Watanabe D, Takasuga A, Hirano T, Sugimoto Y. 2005. Abnormal development of nephrons in claudin-16-defective Japanese black cattle. *J Vet Med Sci* 67:171-178.
56. Pointis G, Fiorini C, Defamie N, Segretain D. 2005. Gap junctional communication in the male reproductive system. *Biochim Biophys Acta.* 1719:102-116.
57. Ross WD, Emmett EA, Steiner J, Tureen R. 1981. Neurotoxic effects of occupational exposure to organotins. *American J Psychiatry.* 138:1092-1095.
58. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S. 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141:397-408.
59. Segre J. 2003. Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier. *Curr Opin Cell Biol* 15:776-782.
60. Sloviter RS, Von Knebel Doeberitz C, Walsh TJ, Dempster DW. 1986. On the role of seizure activity in the hippocampal damage produced by trimethyltin. *Brain Res* 367:169-82.

61. Spooner N, Gibbs PE, Bryan GW, Goad LJ. 1991. The effect of tributyltin upon steroids titers in the female Dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar Environ Res* 32:37-49.
62. Swisshelm K, Machl A, Planitzer S, Robertson R, Kubbies M, Hosier S. 1999. SEMP1, a senescence-associated cDNA isolated from human mammary epithelial cells, is a member of an epithelial membrane protein superfamily. *Gene* 226:285-295.
63. Tsukita S, Furuse M. 2000. The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*. 915:129-135.
64. Turksen K, Troy TC. 2002. Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* 129:1775-1784.
65. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107:1319-1327.
66. Winship KA. 1988. Toxicity of tin and its compounds. *Adverse Drug React Acute Poisoning Rev* 7:19-38.
67. Yamabe Y, Hoshino A, Imura N, Suzuki T, Himeno S. 2000. Enhancement of Androgen-Dependent Proliferation by Tributyltin and Triphenyltin in Human Prostate Cancer Cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 169:177-184.
68. Yu WJ, Lee BJ, Nam SY, Kim YC, Lee YS, Yun YW. 2003a. Spermatogenic disorders in adult rats exposed to tributyltin chloride during puberty. *J Vet Med Sci* 65:1331-1335.
69. Yu WJ, Nam SY, Kim YC, Lee BJ, Yun YW. 2003b. Effects of tributyltin chloride on the reproductive system in pubertal male rats. *J Vet Sci* 4:29-34.

Table 1: List of primers sequences used for semi-quantitative RT-PCR

<b>Claudin</b>	<b>Primer</b>	<b>Primer sequence</b>
Cldn-1	Upper primer Lower Primer	5' AGC CAG GAG CCT CGC CCC GCA GCT GCA 3' 5' CAG CCA AGG CCT GCA TAG CCA TGG 3'
Cldn-3	Upper primer Lower Primer	5' GCG CGT TTC GGC ATT CAT C 3' 5' GGA TCT TGG TGG GTG CGT ACT TCT 3'
Cldn-4	Upper primer Lower Primer	5' TCT AGA ATG GCG TCT ATG GGA C 3' 5' GGT CTG CAG CGT TGG AAA T 3'
Cldn-5	Upper primer Lower Primer	5' GGT CTG CAG CGT TGG AAA T 3' 5' TTC TTG TCG TAA TCG CCA TTG 3'
Cldn-6	Upper primer Lower Primer	5' CCC ATG TGG AAG GTG A 3' 5' GAA TAG CAG GCC ATG TAA TG 3'
Cldn-7	Upper primer Lower Primer	5' TCT AGA ATG GCC AAC TCG GGC 3' 5' GGA TCC CAC GTA TTC CTT GGA G 3'
Cldn-8	Upper primer Lower Primer	5' ACC TAC GCT CTT CAA ATG GC 3' 5' ACC TAC GCT CTT CAA ATG GC 3'
Cldn-9	Upper primer Lower Primer	5' AGG CTG CGT AGG AAC TTT GGT CTC 3' 5' CCA GTC CCG AAG CAC CTG AAC 3'
Cldn-11	Upper primer Lower Primer	5' GTC GCA GCA GTG CTC GCA GCC GCT C 3' 5' GTC CTT ACC TGG AAG GAT GAG GAT G 3'
GAPDH	Upper primer Lower Primer	5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3' 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'



Table 2: Genes expressed exclusively in the control animals

Gene name	Number	Gene name	Number
T-cell surface glycoprotein CD5 precursor	P51882	annexin V (ANX5)	M21208
DNA-binding protein inhibitor 1D3	D10864	CD4 homologue	M15768
interferon-induced GTP-binding, mx1	P18588	CD28	X55288
antigen peptide transporter 2	P36372	Jun-D	P52909
plasma kallikrein (rPK)	M58590	p53 nuclear oncoprotein	P10361
androgen binding protein	M38759	p21	Q64315
casein kinase II (beta subunit)	P13862	lipocortin 2	Q07936
c-raf proto-oncogene	M15427	syntaxin 5 (STX5)	Q08851
liver carboxylesterase 10 precursor; carboxylesterase ES-10	P16303	calmodulin	X13817
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	P36970	beta-arrestin 1	M91589
sodium channel, amiloride sensitive, alpha subunit	P37089	P14-K	O08561
Na,K-ATPase beta 3 subunit	D84450	P14-K	O08662
Neurodegeneration associated protein 1	Q63364	cathepsin D	P24268
rab13, ras related GTPase	M83298	gelatinase A	P97581
testis fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-biphosphate	P25114	proteasome subunit R-iota	P34062
mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase precursor	P22791	proteasome subunit RC10-II	P40112
cytochrome c oxidase, subunit VIIa	P35171	proteasome subunit RC7-I	P40307
cytosolic acyl-CoA thioester hydrolase	D88890	plakoglobin	P70565
phosphatidate phosphohydrolase type 2	O08564	interferon inducible protein 10	P17105
cytochrome P450 4A8	P24464	ribosomal protein S4	P12750
glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	J05181	protein kinase C delta type	P09215
mitochondrial carnitine O-palmitoyltransferase II precursor	J05470	cyclin-dependent kinase 4	P35426
67-kDa glutamic acid decarboxylase	P18088	GTP-binding protein	M20713
long chain-specific acyl-CoA dehydrogenase precursor	J05029	phospholipase C beta 3	none
mitochondrial elongation factor G precursor (MEF-G)	Q07803	Calcineurin B subunit	P06705
14-3-3 protein eta; PKC inhibitor protein-1; KCIP-1	D17445	Survival of motor neuron	O35876
apolipoprotein B mRNA editing protein	L07114	14-3-3 protein theta; 14-3-3 protein tau	D17614
high mobility group protein 2 (HMG2)	P52925	presenilin-2 (PS-2)	O88777
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B	P35365	ADP-ribosylation factor 1 (ARF1)	P32889
BTG2 protein precursor; NGF-inducible anti-proliferative protein PC3	P27049	ADP-ribosylation factor 4 (ARF4)	P36403
Glioma-derived vascular endothelial cell growth factor	P16612	ADP-ribosylation factor 6 (ARF6)	P26438
gastric inhibitory polypeptide precursor	Q06145	tripeptidylpeptidase II	Q64560
c-src-kinase (CSK) & negative regulator; tyrosine-protein kinase	P32577	tubulin alpha-1 (TUBA1)	P02551
Jak1 tyrosine-protein kinase	O35803	endothelin converting enzyme	P42893
guanine nucleotide-binding protein G(I) alpha 1 subunit (GNAI1)	P10824	apurinic/aprimidinic endonuclease	P43138
Ras-related GTPase, ARF-like 5	P51646	fibroblast growth factor receptor activating protein (FRAG1)	P70561
guanine nucleotide-binding regulatory, alpha subunit	J03773	phospholipase A2 precursor	P04055
myosin heavy chain I (MYR1)	Q05096	hypoxanthine-guanine	M63983

Table 3: Genes expressed only in 10mg TBT treated animals

Gene name	Number
heat shock 27-kDa protein (HSP27)	P42930
protein kinase C-regulated chloride channel	P51792
mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I (liver isoform; CPT I)	P32198
heparin-binding growth associated protein	P20935
G protein beta-adrenergic receptor kinase 1 (beta-ARK1; EC 2.7.1.126)	M87854

Table 4: Genes expressed in control more than 1.5x than in 10mg TBT treated animals

Gene name	Number	X-fold Control vs treated
Microglobulin; beta-2-microglobulin + prostaglandin receptor F2a	X16956	3.56
Clusterin	M64723	2.03
Mast cell protease 1 precursor (RMCP-1)	P09650	1.98
Proteasome subunit RC6-1	P48004	1.91
Cytoplasmic beta-actin (ACTB)	P02570	1.89
Ornithine decarboxylase (ODC)	J04791	1.84
Synaptotagmin XI	O08835	1.84
Interferon induced protein	P26376	1.77
rab16, ras related GTPase	M83676	1.76
Ral A; GTP-binding protein	P05810	1.74
ATP synthase lipid-binding protein P1 precursor; ATPase protein 9	Q06645	1.74
Cytochrome c oxidase, subunit Va, mitochondrial	P11240	1.71
Phosphatase 2A, catalytic subunit, isotype alpha	P13353	1.70
Calcium binding protein 2 (CABP2)	P38659	1.70
rab15, ras related GTPase	P35289	1.68
Proteasome subunit C5	P18421	1.67
ras-related protein rab1A	P05711	1.67
Calpastatin	P27321	1.65
Cofilin	P45592	1.65
ATPase	P11507	1.63
Polyubiquitin	Q63446	1.61
Huntington disease gene homolog	P51111	1.59
Proteasome component C8	P18422	1.59
LIM domain serine/threonine kinase 2 (LIMK-2)	P53670	1.54
GTP-binding protein	P04897	1.52
PKI-beta; cAMP-dependent protein kinase inhibitor (testis form)	M64092	1.51

## FIGURE LEGENDS

Figure 1: Weights of animals and reproductive tissues at sacrifice of adult rats exposed *in utero* to TBT. Values represent means  $\pm$  SEM. Asterisk (\*) indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).

Figure 2: Serum testosterone concentration in 91 day adult male rats exposed *in utero* to tributyltin chloride from gestational days 0–19 (2.5, 10, or 20 mg/kg). Values represent means  $\pm$  SEM. Asterisk (\*) indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).

Figure 3: The number of genes expressed in the ventral prostate of rats exposed *in utero* to 10 mg/kg TBT throughout gestation and sampled at 91 days of age. The numbers in the spotted areas are the genes that were coexpressed.

Figure 4: Gene array analysis of the expression of different family of proteins in the ventral prostate of adult rat exposed *in utero* to 10mg/kg TBT.

A: Androgen-related genes expressed in the control animals compared to animals exposed *in utero* to 10 mg/kg TBT. ABP: Androgen-binding protein ; 5- $\alpha$ R2: 5-alpha reductase type 2 ; CLU: Clusterin ; AR: Androgen receptor ; NGFIB: Nerve growth factor-induced protein IB.

B: G protein genes expressed in the control animals compared to animals exposed *in utero* to 10 mg/kg TBT. RAB 16: Ras-related protein 16 ; RAB 15: Ras-related protein 15 ; RAB 14: Ras-related protein 14 ; GNAI2: Guanine nucleotide-binding protein G (I) alpha 2 subunit.

C: Kinases family genes expressed in the control animals compared to animals exposed *in utero* to 10 mg/kg TBT. KCIP1: Protein kinase C inhibitor protein 1 ; MAPK9: Mitogen activated kinase 9 ; LIMK2: LIM domain kinase 2 ; PKI-Beta: cAMP-dependent protein kinase inhibitor 2 ; JAK1: Janus tyrosine protein kinase 1 ;Fru-2,6-P: Testis fructose-6-phosphate 2-kinase.

D: Proteases family genes expressed in the control animals compared to animals exposed in utero to 10 mg/kg TBT. C5: Proteasome component C5 ; RC6-1: Proteasome subunit RC6-1 ; C8: Proteasome component C8 ; MCPT1: Mast cell protease 1.

N.D., not detected. An asterisk (\*) indicates the groups that had a decrease of at least 1.5-fold compared to control group.

Figure 5: RT-PCR analysis of Cldns present in adult male rat ventral prostate. The GAPDH is used to control the equivalence of loading. Kidney tissue (K) is used as a positive control.

Figure 6: RT-PCR analysis of expression levels for Cldn-1, Cldn-3, Cldn-4 and Cldn-8 in the ventral prostate of adult rats exposed *in utero* to TBT from gestational days 0–19 (2.5, 10, or 20 mg/kg. Each value is expressed as the mean  $\pm$  SEM. An asterisk (\*) indicates the groups that are significantly different from controls at a level of  $P \leq 0.05$ .

Figure 7: Immunolocalization of Cldn-1 in ventral prostate of adult rats exposed *in utero* to TBT. Immunostaining of Cldn-1 in the control rats is localized only at the apical margin of the epithelial cells. In rats exposed to 10mg/kg TBT the staining is present at the apical margin but also along the plasmatic membrane. For rats exposed to 20mg/kg TBT (E) the immunoperoxidase reaction is present all along the plasmatic membrane. E, epithelial cells. L, lumen.  $\rightarrow$  staining. Magnification 1008x. Immunostaining of E-Cad in the control rats is localized along the plasmatic membrane of the epithelial cells. In rats exposed to 10 mg and 20mg/kg TBT the staining is less intense along the plasmatic membrane. E, epithelial cells. L, lumen.  $\rightarrow$  staining. Magnification 1008x.

Figure 8: Northern Blot analysis of expression of E-Cad in adult rat ventral prostate exposed *in utero* to TBT. Each value is expressed as the mean  $\pm$  SEM. An asterisk (\*) indicates the groups that are significantly different from controls at a level of  $P \leq 0.05$ .

Figure 1

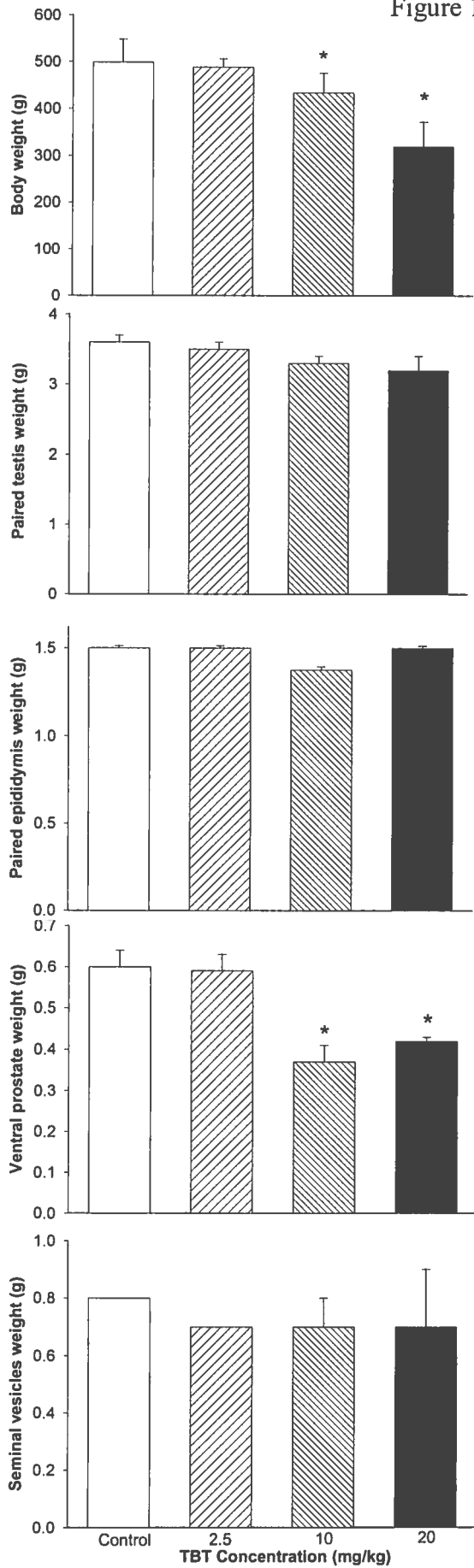


Figure 2

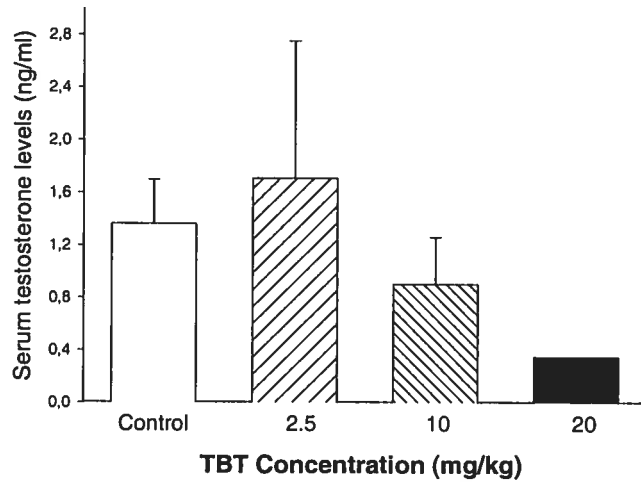
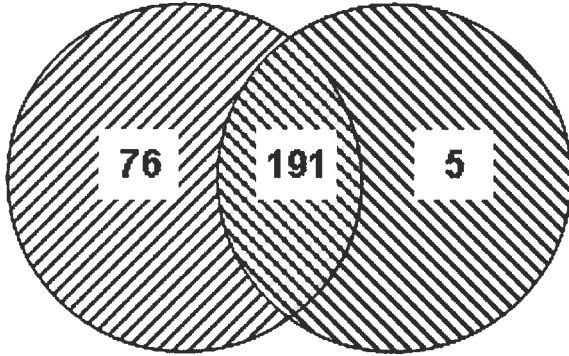


Figure 3

Control TBT (10mg/kg)






-  Expressed exclusively in the control
-  Co-expressed
-  Expressed exclusively in the treated



Figure 4

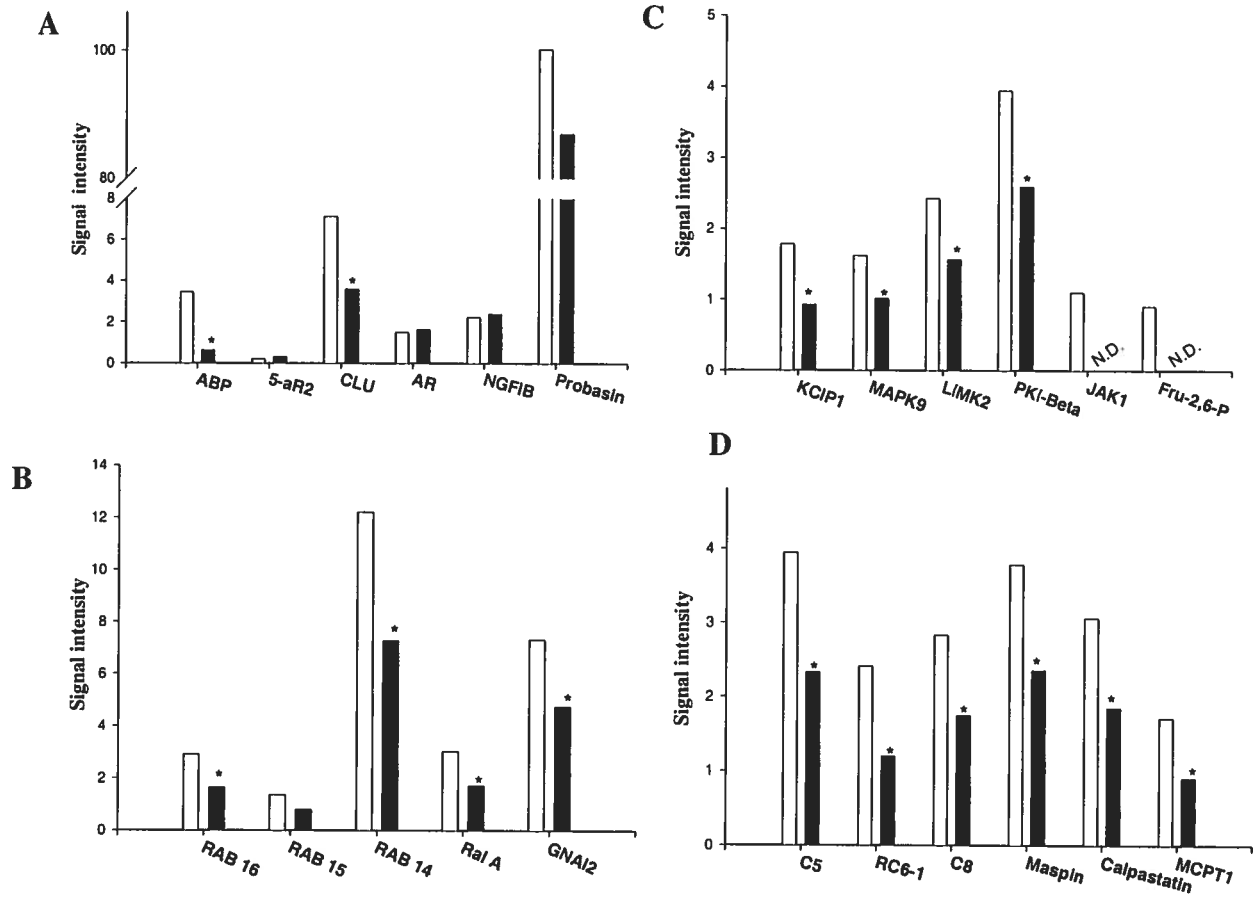


Figure 5

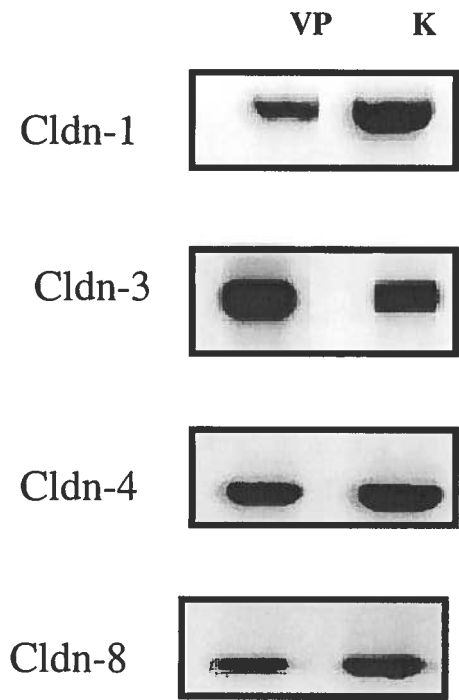


Figure 6

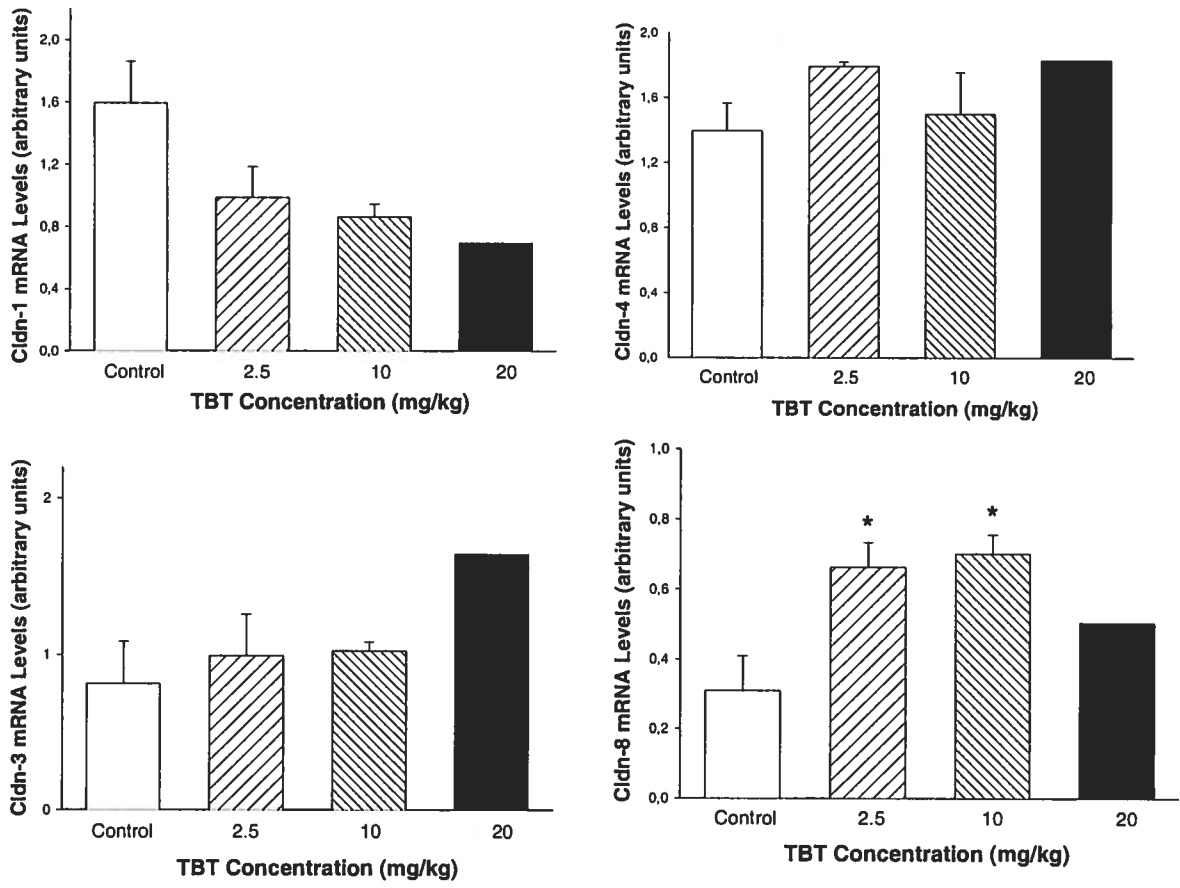


Figure 7

Control

10mg/kg

20mg/kg

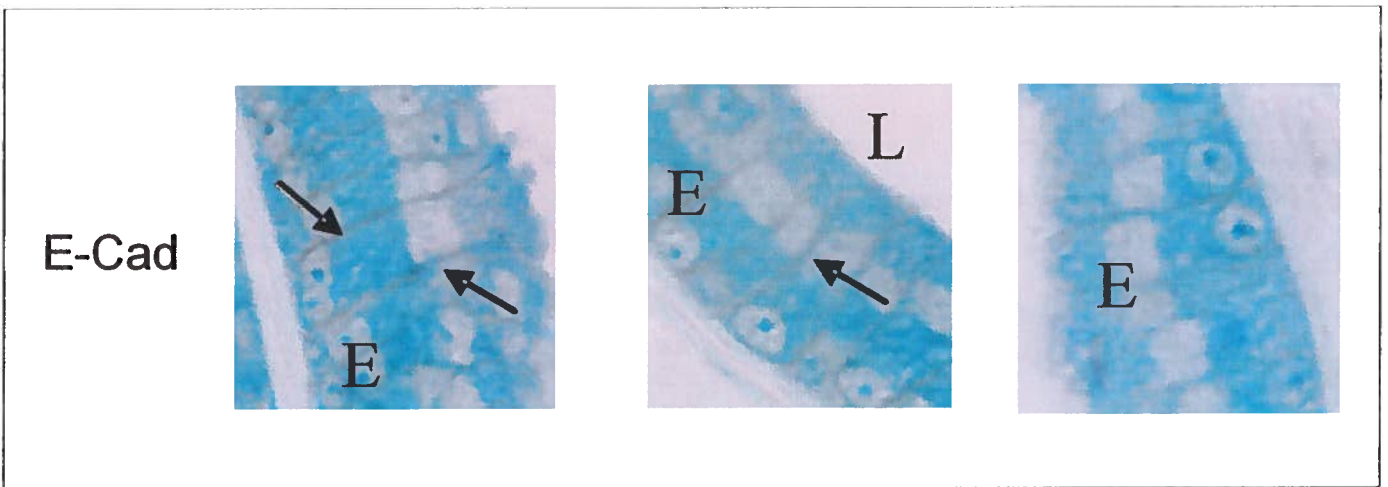
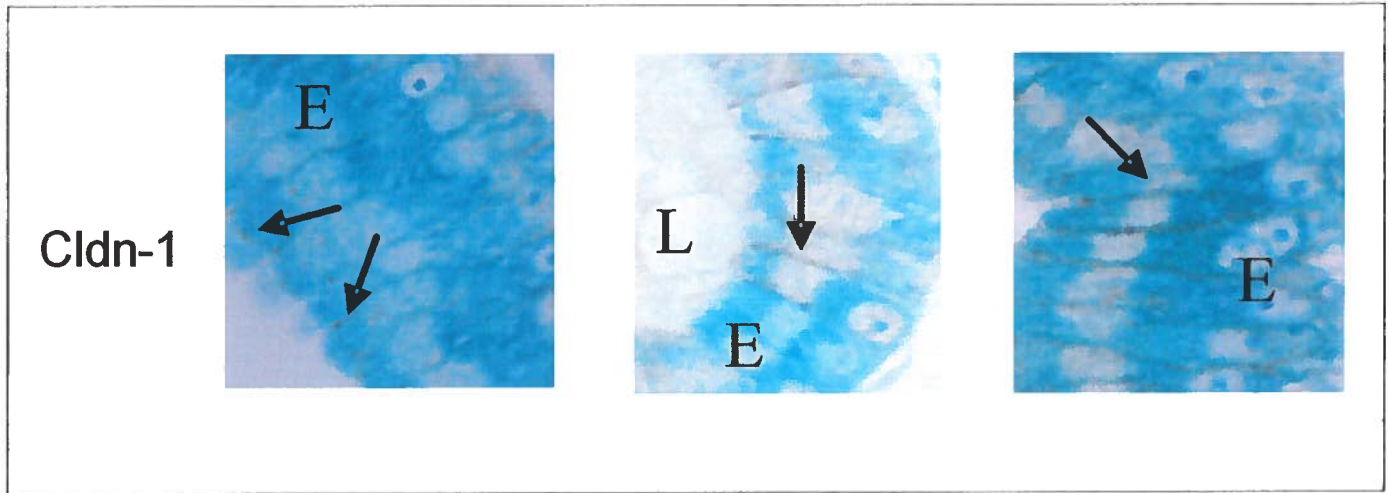
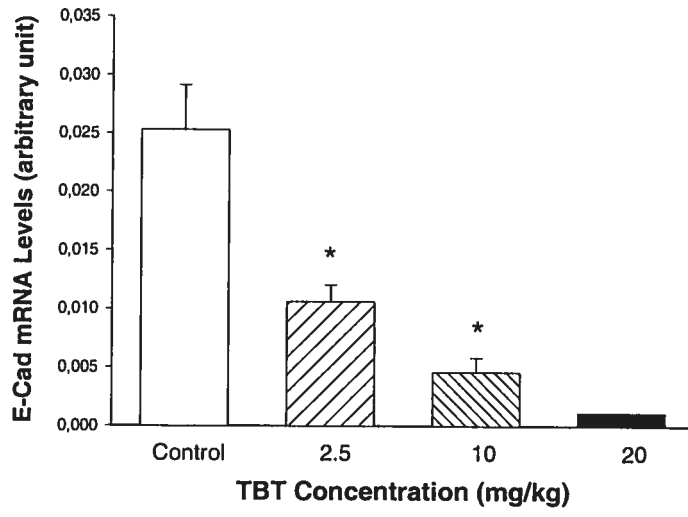


Figure 8





## Chapitre 4 : Effets du TBT sur l'épididyme

### Article en préparation

Pour cet article, j'ai réalisé l'ensemble des expériences et j'ai rédigé l'article, avec l'aide de mon directeur de recherche.





## Résumé

Le Tributylétain (TBT) est un contaminant environnemental utilisé comme agent anti-salissure pour les bateaux et est également un sous-produit de divers procédés industriels. TBT est reconnu pour affecter les jonctions serrées et compromettre leur perméabilité. Les jonctions serrées de l'épididyme forment un environnement luminal spécifique qui est indispensable pour la maturation des spermatozoïdes et pour les protéger du système immunitaire. La formation des jonctions serrées implique une signalisation intra- et inter-cellulaire complexe, dont les composants des jonctions adhérentes. Afin de déterminer si une exposition *in utero* au TBT pourrait avoir, dans l'épididyme de rat, des effets à long-terme sur les constituants du complexe jonctionnel, soit Cldn-1, ZO-1, E-Cad et  $\beta$ -cat, des femelles Sprague-Dawley furent exposées à différentes doses de TBT (2.5, 10 or 20 mg/kg) durant toute leur gestation. Les jeunes rats furent sevrés à 21 jours et sacrifiés à 91 jours. Les niveaux d'expression de Cldn-1, E-Cad et ZO-1 diminuèrent suite à l'exposition au TBT. La Cldn-1 était immunolocalisée au pôle apical des membranes latérales des cellules principales de l'épididyme, cependant suite à l'exposition à des doses croissantes de TBT, le marquage apical disparaissait. Le marquage en immunohistochimie de E-cad diminuait de façon dose-dépendante avec l'exposition au TBT. L'expression et l'immunolocalisation de ZO-1 et  $\beta$ -cat décroissaient également. A l'aide d'une lignée cellulaire épидидymaire, nous purent confirmer *in vitro* l'effet d'une exposition au TBT sur les jonctions serrées et adhérentes. Néanmoins, les cellules contrairement aux animaux ont la capacité de récupérer des effets du TBT. Ces données démontrent qu'une exposition *in utero* au TBT conduit à des effets permanents sur l'adhésion cellulaire et altèrent les jonctions adhérentes et les jonctions serrées dans

l'épididyme ce qui pourrait avoir d'importantes conséquences sur les spermatozoïdes et la fertilité.

***IN VIVO AND IN VITRO* STUDY OF EFFECTS OF AN EXPOSURE TO  
TRIBUTYL TIN ON THE JUNCTIONAL PROTEINS IN THE RAT EPIDIDYMISS**

Johanna Barthelemy and Daniel G. Cyr

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 245 Hymus boulevard, Pointe  
Claire, QC, H9R 1G6

Key words: Male reproduction, tight junctions, adherent junctions, TBT

Running Title: TBT alters tight junction proteins in the epididymis

Address for correspondence:

Dr Daniel G. Cyr  
INRS-Institut Armand-Frappier  
Université du Québec  
245 Hymus boul.  
Pointe Claire, QC, H9R 1G6

## ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is an environmental contaminant used in anti-fouling agents for boats and is a by-product of industrial processes. TBT is known to impair tight junctions and compromise their permeability. Epididymal tight junctions create a specific luminal environment necessary for spermatozoa maturation and to protect the sperm from the immune system. The formation of tight junctions involves complex intra and inter-cellular signalling including components of adhering junctions. To determine if an *in utero* exposure to TBT could have long-term effects on different actors of the junctional complex, namely Cldn-1 and zonula-occludens-1(ZO-1), E-Cadherin and  $\beta$ -catenin, in the rat epididymis, pregnant Sprague-Dawley rats were given varying doses of TBT (2.5, 10 or 20mg/kg in corn oil by gavage) throughout gestation. The pups were weaned on day 21, and sacrificed at day 91. Expression levels of Cldn-1, E-cadherin and ZO-1 were decreased after exposure to TBT. Cldn-1 was immunolocalized at the apical lateral margins of principal cells of the epididymis; however with increasing TBT dose, the apical Cldn-1 staining is lost. E-Cad immunostaining decreased with TBT exposure throughout the epididymis. Expression and immunolocalization of ZO-1 and  $\beta$ -catenin were also diminished. Using an epididymal cell line, we confirmed that TBT exposure effects occur on both tight and adherens junctions proteins in the epididymis, but cells, contrary to animals, have the ability to recover from TBT exposure. These data indicate that *in utero* TBT exposure results in permanent alterations in cell adhesion and altered tight junctions in the epididymis, which could have important consequences on sperm and fertility.

## INTRODUCTION

Tributyltin (TBT) is the most toxic organotin and a well-known environmental toxicant, which has been used as a fungicide or disinfectant in industrial processes and as an antifouling agent for boats (Winship, 1988; Fent, 1996). Organotins are bioaccumulated and, as a result, have contaminated both food and drinking water resources (Ebdon *et al.*, 1989; Pereira *et al.*, 1999). TBT has a demonstrated effect on the reproductive system. For many years it has been reported that TBT exposure induces imposex in female dogwhelk (*Nucella Lapillus*) (Folsvik *et al.*, 1999; Jorundsdottir *et al.*, 2005) and can also induce spermatogenesis in female abalone (*Haliotis gigantea*) (Horiguchi *et al.*, 2002). In mammals, it has been shown that rats exposed to between 8 and 16 mg/kg of TBT for the first 7 days of gestation had reduced litter size. TBT appears to exert its greatest effect during preimplantation, even if some losses have been observed during post-implantation (Harazono *et al.*, 1996; Harazono *et al.*, 1998). Pups born to gravid female rats exposed to 10 and 20 mg/kg of TBT during gestation had reduced birth weights and exhibited a high frequency of skeletal abnormalities when compared to controls (Adeeko *et al.*, 2003). It has been demonstrated by Yu *et al.* (2003) that rats exposed to TBT during puberty have spermatogenic disorders characterized by decreased testicular and epididymal sperm counts as well as effects on certain sperm motility parameters when they reach adulthood.

Spermatozoa become mature and acquire their motility in the epididymis (Jones, 1999; Robaire *et al.*, 2006). The epididymis is divided in four different regions: the initial segment, the *caput*, the *cauda* and the *corpus epididymidis*. Each region plays a distinct role in sperm maturation (Robaire *et al.*, 2006). The *caput epididymidis* secrete proteins which will bind to the spermatozoa and are implicated in the maturation process. When spermatozoa are mature, they are stored in the *cauda epididymidis* until ejaculation (Jones,

1999). The sperm is protected from immune system by the blood-epididymal barrier (Cyr *et al.*, 2002). The selectivity of this barrier restricts the passage of ions, salts and macromolecules from the blood to the epididymal lumen and thus creates a specific microenvironment (Blaquier, 1988; Hinton and Palladino, 1995; Turner, 2002). The blood-epididymal barrier is localized between principal cells at the apical region of the epithelium and is composed of tight junctions (Yap *et al.*, 1998; Schneeberger and Lynch, 2004). This junctional complex is composed of adherens, gap and tight junctions. Tight junctions serve as an impermeable barrier between cells and maintain cell polarity. These junctions are comprised of different integral transmembrane proteins such as occludin (Furuse *et al.*, 1993; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003), a family of proteins termed claudins (Cldns; Furuse *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1999; Schneeberger and Lynch, 2004; Van Itallie and Anderson, 2006) and Junctional Adhesion Molecules (JAMs; Bazzoni, 2003), and a recently discovered protein tricellulin which is specific to tricellular contacts in epithelial cells (Ikenouchi *et al.*, 2005). Tight junctions are also composed of cytoplasmic proteins including the zonula occludens family (ZO-1, ZO-2 and ZO-3). Cldns have been identified in the rat epididymis. Recent studies have shown that Cldn-1, Cldn-3, Cldn -4, Cldn-5, Cldn-6, Cldn -7, Cldn -8 and Cldn -9 are all present in epididymal tight junctions (Gregory *et al.* 2001; Gregory and Cyr, 2006). Guan *et al.* (2005) found in another rat strain, that all these Clds as well as Cldn-10 and Cldn-11 were expressed, but Cldn-6 and Cldn-9 were only expressed in 7 days old rats.

One of the functions of the junctional complex is help to coordinate normal development and function of most organs (Dufresne *et al.*, 2003; Robaire *et al.*, 2006; Lui and Lee, 2006). The regulation of the junctional proteins is complex. Adherens junctions are formed when two cadherins, such as E-Cadherin (E-Cad) in the epididymis (Cyr *et al.*,

1992; Andersonn *et al.*, 1994), from to adjacent cells bind to one another (Yap *et al.*, 1997). These transmembrane proteins are then linked to the cytoskeleton via the catenins (alpha, beta and gamma). ZO-1, which is at this time localized at the adhering junctions, recruit Cldns and occludin to the tight junctions, which is localized apically to the adherens junctions (DeBellefeuille *et al.*, 2003).

Hara *et al.* (1994) reported that the permeability of tight junctions in the blood-brain barrier of rats is increased following the administration of TBT. This suggests that the proteins which form tight junctions represent a primary target for TBT. More recently, Tsukazaki *et al.* (2004) showed that exposure to 10 to 100 nM of TBT during 13 days induced a loss of integrity of Caco-2 cells, and increased barrier permeability. Because the blood-epididymal barrier is particularly important to the creation of the specific luminal micro-environment sperm need to mature normally, TBT damages to this barrier could explain certain effects that have been noted on the fertility of rats exposed to TBT (Omura *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003).

In a previous study, we observed that in the ventral prostate TBT affects the localization of Cldn (Barthelemy *et al.*, 2006). We then decided to study the effects of TBT on the relationship between E-Cad and Cldns, as well as those between the different Cldns. We chose to use phosphorodiamidate morpholino oligomers (MOs), which are synthetic DNA analogs that inhibit gene expression in a sequence-dependent manner (Summerton and Weller, 1997; Corey and Abrams, 2001). MOs are comprised of 20 to 25 nucleic acids and a morpholin-ring, which replaced the riboses. They also have a non-ionic phosphorodiamidate sub-unit which allows them to bind to mRNA.

The objectives of this study were to determine if *in utero* exposure of rats to TBT could have long-term effects on the reproductive development of epididymis. Using a rat

epididymal cell line, we also examined the links between the different junction proteins, and investigate the mechanisms by which TBT exerts its effects on the epididymis.



## MATERIALS AND METHODS

**Animals** : Male (300–350g; 8 to 10 weeks old) and female (200–250g; 9 to 12 weeks old) Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Canada (St. Constant, Quebec) and housed in the McIntyre Medical Building Animal Resource Centre at McGill University with a 14-h light: 10-h dark cycle. The animals had free access to food (Purina chow 5012, Mondou Feeds, Montreal, Quebec) and water; all animal handling and care followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Virgin female rats in proestrus were mated overnight with males. Successful matings were indicated by the presence of spermatozoa in the vaginal smear on the following morning (day 0 of pregnancy). Pregnant rats were randomly divided into groups; they were given a daily dose of vehicle (control;  $n=25$ ) or TBT chloride at 2.5 ( $n = 12/\text{treatment}$ ), 10 ( $n = 12/\text{treatment}$ ), or 20 mg/kg ( $n = 13/\text{treatment}$ ) by gavage. TBT was administered from day 0 to 19 of pregnancy. All TBT chloride solutions were prepared fresh daily. Rats were sampled at day 91 (adults). Rats were euthanized with CO<sub>2</sub>. Epididymides were removed and quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -86°C.

**Immunohistochemistry:** Bouin-fixed tissues were dehydrated and embedded in paraffin. Sections (5µm) were subsequently treated as previously described (Cyr, 1992). Immunoperoxidase staining of epididymal sections was performed according to previously published protocols (Oko and Clermont, 1989). Immunocytochemical localization of Cldn-1, E-Cad, ZO-1 and β-catenin in the epididymis was performed using an affinity-purified Cldn-1 polyclonal rabbit antiserum (10 µg/ml; Zymed Laboratories, Inc., Seattle, WA), an E-Cad polyclonal rabbit antiserum (2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA),

a goat polyclonal antisera raised against  $\beta$ -catenin (2.7  $\mu\text{g/ml}$ , Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), and an anti-rabbit antibody against ZO-1 (5.0 $\mu\text{g/ml}$  Zymed, South San Francisco, CA). Antibody binding to each kind of protein was detected using either an antigotat or antirabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (30 $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma-Aldrich Corp., Mississauga, Canada). Negative control slides, in which there was no primary antibody, were also done concurrently.

**Immunoblotting:** Proteins were isolated from frozen segments (proximal and distal) of three pools of two adult epididymides, except for the highest treatment group in which there are only two rats. Tissues were crushed under liquid nitrogen using a mortar and pestle. The tissues were then homogenized with a Polytron (Brinkmann Instruments, Inc., West Orange, NJ) at 4°C in lysis buffer (1:3, w/vol; 60 mM Tris-Cl (pH 6.8), 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20  $\mu\text{g/ml}$  pepstatin A) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Corp.). Samples were transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged at 2200  $\times g$  for 30 min at 4°C. The supernatant, containing the plasma membrane fraction, was then centrifuged at 30000  $\times g$  for 30 min at 4 C, and the resulting pellet was resuspended in the same buffer. Protein concentrations were determined using a protein assay kit (Sigma, Mississauga, Canada).

Membrane protein samples (50  $\mu\text{g}$ ) were diluted in loading buffer (Laemmli buffer), boiled for 5 min, and cooled on ice. The samples were loaded onto either a 6.5% (for ZO-1 and E-Cad) or a 12% (for Cldn-1) polyacrylamide gel (DeBellefeuille *et al.*, 2003). Electrophoresis was performed at 80 V for 1.5–2 h 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 100 V for 1 h. Colored molecular weight markers were used to assess the efficiency of the transfer. The blots were blocked overnight in TBST (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (pH 7.5), and 0.1% Tween 20) containing 5% powdered milk and then incubated for 60 min at room temperature with an anti-actin primary antibody in the same buffer (2.0  $\mu\text{g/ml}$ ; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The blots were briefly rinsed in TBST and incubated for 60 min at room temperature with the primary antibodies against, E-Cad (1.0  $\mu\text{g/ml}$ , respectively; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Cldn-1 or ZO-1 (1.0  $\mu\text{g/ml}$ , 1.75  $\mu\text{g/ml}$  respectively; Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) in blocking buffer. Following the incubation, the membranes were washed three times for 10 min each with TBST and subsequently incubated for 60 min at room temperature with an anti-goat or an anti-rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody (0.4  $\mu\text{g/ml}$ ; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). The blots then were washed three times for 10 min each with TBST, and the presence of each protein was revealed using the Lumilight Western Blotting Substrate (Roche Applied Science). Each protein level was quantified by densitometry using a Fluor Image analyzer (Bio-Rad Laboratories, Inc.) and standardized against the signal for the actin protein.

**Immunoprecipitation :** Epididymal proteins were isolated from 91-d-old rats as described above and used to immunoprecipitate  $\beta$ -catenin and ZO-1. For the ZO-1 immunoprecipitation, a rat monoclonal antibody to ZO-1 (Chemicon) was used. Epididymal proteins (350  $\mu\text{g}$ ) were immunoprecipitated with 5 or 15  $\mu\text{l}$  undiluted primary antiserum ( $\beta$ -catenin and ZO-1, respectively) in 1 ml PBS. The proteins and antisera were incubated for 1 h at 4°C in a rotating tube. At the end of the incubation, a 20  $\mu\text{l}$  aliquot of protein G plus agarose conjugate (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) was added to the

proteins and incubated overnight at 4°C in a rotating tube. Samples were then centrifuged at 1000 x g for 5 min at 4°C to recover the agarose beads. The supernatant was discarded, and the pellet of agarose beads was washed once in PBS, three times in wash buffer I [500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.05% Nonidet P-40, and 0.2% BSA], and twice in wash buffer II [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)]. Agarose beads were recovered after each wash by centrifugation at 1000 x g for 5 min at 4°C. The resulting pellets were then boiled in sample buffer for 5 min and subjected to electrophoresis and immunoblotting as described above.

**Cells and Cell Culture.** RCE cells are a rat caput epididymal cell line (RCE). These cells have been immortalized by transfecting primary cultures of rat epididymal cells with the simian virus 40 large T antigen. RCE cells were cultured in 6-wells plates using DMEM HAM F12 medium (Sigma) containing the appropriate supplements (Dufresne *et al.*, 2005) in a humidified incubator at 32°C and in the presence of 5% CO<sub>2</sub>.

**MOs Synthesis.** All MOs were synthesized by Gene Tools. Antisense MOs were designed to target rat junction proteins E-Cad, Cldn-1, Cldn-3 and Cldn-4. All MOs are complementary to the translation initiation region and encompass the AUG start site identify in previously published sequences (GenBank accession number NM-031334, NM-031699, NM-031700 and NM-009903 respectively). The oligonucleotide sequences of the different used MOs are listed in the Table 1. The control MO used in these studies is the standard control oligo designed by Gene Tools; it is homologous to the human beta-globin (GenBank accession number U09742).

**Determination of the MO Delivery.** Ethoxylated polyethylenimine (EPEI), which pairs to the MOs, is used to optimize the delivery of MOs to cells. Different concentrations of EPEI were tested in order to optimize MO delivery into cells. For this experiment a Fluoresceinated Standard Control oligo was used. This oligo has no target and no significant biological activity, as well as a FITC-modified end. Cells were exposed to 0 to 0.56  $\mu\text{M}$  of EPEI linked with the standard MO for 24 hours. Cells were then harvested and the uptake of EPEI by cells was analysed by FACScan. Results were analyzed with WinMdi software (Scripps Research Institute, La Jolla, CA).

**Exposure of cells to MOs.** The MOs were delivered into cells at a concentration of 1  $\mu\text{M}$  according to the Gene Tools' Special Delivery (SD) Protocol (Morcos, 2001; Gene Tools Technical Bulletin 05/23/2000, Corvallis, OR). A duplex was formed by incubating 1  $\mu\text{M}$  stocks of the MO and 0.56  $\mu\text{M}$  EPEI for 20 min at room temperature. Serum-free media (3.6 ml) and deionized water (180.7  $\mu\text{l}$ ) were added to bring the final volume to 4.0 ml. Subconfluent cultured cells were exposed to the above mixture for 6 h at 32°C (1.5 ml/well for 6-well plates and 150  $\mu\text{l}$ /well for 96-well plates). The solution was then aspirated and replaced with normal serum-containing media. Cells were harvested for proteins analysis after 24 h.

**Cells exposed to TBT:** RCE cells were cultured in DMEM HAM F12 medium (Sigma) containing the appropriate supplements (Dufresne et al. 2005) in a humidified incubator at 32°C and in the presence of 5%  $\text{CO}_2$ . One day before confluence, cells were exposed to 4 doses of TBT (0 ; 500nM; 1 $\mu\text{M}$ ; 5 $\mu\text{M}$  ) diluted in EtOH, that had been determined to be non-lethal for cells. After 24h exposure, cells were collected, and total cellular RNA was

isolated using Absolutely RNA Miniprep kit (Stratagene, La Jolla, CA). Total RNA (500 ng) was reverse transcribed using an oligo (dT)<sub>16</sub> primer. PCR was subsequently performed to determine if Cldn-1, Cldn-3 and E-Cad were affected by TBT exposure. The primers used for RT-PCR are listed in the Table2. PCR products were then separated on a 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide using a Fluor-S Multi-Image densitometer (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). In order to ensure that equal amounts of RNA were used, GAPDH was amplified and amplicons were separated in parallel.

**Statistical analysis:** Statistical differences between groups were determined by ANOVA followed a posteriori by a Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons between experimental groups. Significance was established at  $P < 0.05$ . All analyses were performed using SigmaStat computer software (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

## RESULTS

**Expression of junctional proteins in the epididymis.** The effect of TBT on the expression of junctional proteins in the epididymis was assessed by Western Blot analysis. Epididymides were divided in two regions: proximal (containing the initial segment, the caput and the corpus) and distal (containing the cauda) regions. Expression of Cldn-1 protein was significantly decreased by 68.6% in the proximal region and by 55.8% in the distal region in the 20mg/kg group as compared to the control group. There were no effects in either regions of the epididymis in the 2.5 and 10 mg/kg TBT groups, except a 58% increase in the 10mg/kg group in the proximal region, (Fig. 1A).

The expression of ZO-1 was slightly decreased in the proximal region of the epididymis (Fig. 1B). There was a 30% decrease in the 2.5 and 10mg/kg groups and a 43% reduction in the expression of ZO-1 in the highest dose groups. An identical pattern was observed in the distal region of the epididymis. The expression of ZO-1 was reduced by 10, 18 and 58%, respectively in the 2.5, 10 and 20 mg/kg groups.

*In utero* exposure to TBT resulted in a significant decrease in E-Cad expression,. There was a 78% decrease of E-Cad in the proximal region and 92% in the distal region of the highest exposure dose. Similar to Cldn-1, we observed two-fold increase in E-Cad levels for the 10mg/kg group in the distal region of the epididymis (Fig. 1C).

**Immunolocalization of junctional proteins in the epididymis.** Immunostaining of Cldn-1 and E-Cad was done to assess the effects of TBT on the localization of these junctional proteins. In control rats, Cldn-1 was localized in a punctate manner along the apical margin of the plasma membrane of epithelial cells (Fig. 2). A Cldn-1

immunoreaction was also observed at the base of the lateral margin as well as between the principal and the basal cells. This is consistent with previous findings (Gregory *et al.*, 2001). In rats exposed to 10mg/kg TBT, the staining was less prominent at the apical margin, and increased along the lateral plasma membrane with no changes along basal cells. For rats exposed to 20mg/kg TBT, the immunoperoxidase reaction at the apical region was almost completely absent, while the immunostaining was still present along the basolateral plasma membrane. This phenomenon was consistent in all regions of epididymis.

ZO-1, a cytoplasmic tight junction protein which is linked to the actin cytoskeleton, was immunolocalized at the apical margin of the epididymal cells in the epididymis of control rats. In rats exposed to TBT, a dose-dependant decrease in the immunoreactive staining of ZO-1 was observed throughout the epididymis (Fig. 2).

Since adherens junctions play a role in the formation of tight junctions, immunostaining of E-Cad and  $\beta$ -Cat was also assessed. Immunoreactive E-cad was localized at the plasma membrane between adjacent principal cells of the epididymis (Fig. 2) in control rats. This is similar to what has been previously reported (Cyr *et al.*, 1992). However, in TBT treated rats, the intensity of the immunoreaction was diminished in all regions of the epididymis. Immunolocalization of  $\beta$ -Cat, an adherens junction protein, which provides a link between E-Cad and the cytoskeleton, was performed. In all regions of the epididymis, a strong staining was observed between the adjacent principal cells, as well as between the clear cells and principal cells. With an increasing dose of TBT, we observed a decrease in  $\beta$ -Cat staining, in all regions of the epididymis (Fig. 2) and an increase in cytoplasmic staining, especially in the cauda epididymidis.



**Effects of TBT on co-immunoprecipitation.** The assembly of tight junctions is believed to involve close interactions between adherens and tight junctions. It has been suggested that adherens junctions are implicated in the positioning of tight junctions (Cerejido *et al.*, 2000; Perez-Moreno *et al.*, 2003). Co-immunoprecipitation analyses were performed to verify if protein-protein binding in the junctional complex was affected by an *in utero* exposure to TBT. Normally, in the tight junctions, Cldn-1 colocalizes with ZO-1. TBT did not affect the association between Cldn-1 and ZO-1 (Fig. 3).

To assess whether or not adherens junctions were altered,  $\beta$ -Cat was immunoprecipitated.  $\beta$ -Cat immunoprecipitates were screened for E-Cad. The immunoprecipitation analysis indicated that in the proximal region of the epididymis, the association between E-Cad and  $\beta$ -Cat was affected a little by TBT, but was not significant. However in the distal region, in both 10 and 20 mg/kg groups, we observed a decrease in the co-precipitation. This suggests a loss in association between E-Cad and  $\beta$ -Cat (Fig. 3).

**In vitro TBT exposure:** *In vivo* experiments indicated that an *in utero* TBT exposure caused permanent or long-term effects to the epididymis. To assess whether or not effects were the same *in vitro* compared to *in vivo*, RCE cells were exposed to various concentrations of TBT. First, different concentrations of TBT were tested to determine effects of TBT on the viability of cells. After a 24h-exposure to concentrations of TBT ranging from 0 to 1 $\mu$ M, the viability was evaluated using a MTT (tetrazolium salt) assay (Janecki *et al.*, 1992). Cell viability was always more than 85% (*data not shown*). RT-PCR analyses were done in RCE epididymal cells following a 24h exposure to TBT. The expression of Cldn-1, Cldn-3 and E-Cad was assessed. These Cldns were selected in order

to determine whether or not the effects were specific to one Cldn or to were the same for all Cldns. We also looked at the expression of E-Cad to verify if adherens junctions were altered. Results show a significant dose-dependent decrease in the expression of Cldn-1, Cldn-3 and E-Cad in the RCE cells (Fig. 4). Results indicated that Cldn-1, Cldn-3 and E-Cad in RCE cells were affected following a 24h TBT exposure. Experiments were subsequently done to determine then would like to verify if the effect of TBT, as is the case *in vivo* experiments, was permanent. The TBT was removed from the media and cells were allowed to grow for an additional 120 h. However, the TBT effect in RCE cells was reversible since levels of return to normal levels 120h after TBT was removed from media.

**MOs experiments:** In the first experiment, cells were exposed to various doses of EPEI to test the incorporation of MOs into the cells, and to optimize their delivery. We assess the incorporation of a fluorescent nonsense MO in the presence of EPEI (0, 0.14, 0.28, 0.42, and 0.56  $\mu$ M). The incorporation of MO increased with increasing doses of EPEI (Fig. 5A). We also tested the mortality of cells following the incorporation of the nonsense MO at the various concentrations of EPEI. Although mortality increased at higher concentration of EPEI, mortality was less than 20% (Fig. 5B). Thus, the highest concentration was therefore used for all subsequent experiments.

When cells were exposed to the anti-E-Cad MO, we observed a significant decrease in the expression of E-Cad by Western Blot analysis (Fig. 6A). In the same cells, a significant decrease in the expression of Cldn-1 was noted (Fig. 6B).

In addition, when cells were exposed to the anti-Cldn-1 MO, a significant decrease in the expression of Cldn-1 was observed as expected (Fig. 7A). However, there were no significant effects on the expression of E-Cad (Fig. 7B).

The relationship between the different Cldns expressed in RCE-1 cells was then explored. In cells exposed to anti-Cldn-4 MO, Cldn-4 levels was significantly decreased (Fig. 8A), and a concomitant significant increase in Cldn-1 expression was observed (Fig. 8C). No effect was observed on Cldn-3 expression (Fig. 8B). In the same manner, in cells exposed to anti-Cldn-3 MO, a significant decrease in Cldn-3 expression was obtained (fig. 9A), but no effect was observed on the Cldn-4 or Cldn-1 levels (Fig. 9B, 9C). Finally, in cells exposed to anti-Cldn-1 MO, Cldn-1 was significantly decreased (Fig. 10A), as expected but did not have any consequences on the expression of Cldn-3 or Cldn-4 (Fig. 10B, 10C).

## DISCUSSION

In this study, *in utero* exposure to TBT resulted in long-term effects in rats impairing their potential of fertility when they become adults. Since TBT has been shown to affect sperm (Yu *et al.*, 2003) and integrity of tight junctions (Tsukasaki *et al.*, 2004), we hypothesized that the blood-epididymal barrier could be a potential target of TBT. We demonstrated that exposure to TBT induced changes in the expression of tight junctional proteins, which form the blood-epididymal barrier. There was a decrease in the expression of Cldn-1 and its immunolocalization was modified. With increasing doses of TBT, this protein is no longer localized at the apical margin, and a stronger staining along the lateral margin of cells appeared suggesting that this protein is no longer able to localize at the apical site. The formation of tight junctions is dependent on the presence of adherens junctions (Miyoshi and Takai, 2005). Adherens junction proteins such as E-Cad and catenins regulate, at least in part, the assembly of tight junctions (Nagafuchi, 2001). During the formation of tight junctions, cytoplasmic component of the tight junctions, ZO-1, first associate with the adhering junctions, and subsequently dissociate as the tight junctions are formed (Itoh *et al.*, 1997). ZO-1 then links to the transmembrane proteins of tight junctions, Cldns and occludin. When all the proteins are properly assembled, the tight junction migrates to its final apical localization. Thus, the observed changes in Cldn-1 localization suggest that its expression or its association with ZO-1 is altered (Chang *et al.*, 1997; Boven *et al.*, 2000). However, the level of expression of ZO-1 was not significantly decreased in rats exposed *in utero* to TBT, and in the proximal region of the epididymis, ZO-1 and Cldn-1 co-precipitated despite TBT treatment. This suggests that a fraction of Cldn-1 is dissociated, whereas the rest still colocalizes with ZO-1. This is consistent with

the fact that Cldn-1, in treated rats, is not localized in the apical region of the cells, contrary to ZO-1.

Since the junctional proteins, such as Cldns and ZO-1, are associated (Matter and Balda, 2003), we hypothesized that TBT might exert an effect via the adherens junctions. Moreover, in previous studies where rats in which we analysed the effects of TBT on the ventral prostate, the expression of E-Cad and Cldns were affected after an *in utero* exposure to 2.5 to 20 mg/kg of TBT (Barthelemy *et al.*, 2006). In the epididymis of rats exposed *in utero* to TBT, E-Cad expression decreased, especially at the highest dose. Furthermore, the immunostaining of E-Cad was decreased in all the treatment groups. We also observed a dose-dependant decrease in the immunostaining of  $\beta$ -Cat at plasma membrane in the proximal region of the epididymis. In the 20mg/kg group most of the  $\beta$ -cat immunostaining was lost. However, in the distal region of epididymis, there was a decrease in the immunostaining of  $\beta$ -Cat but also an increase of the cytoplasmic staining for the highest doses. Moreover, immunoprecipitation data indicated a loss in association between E-Cad and  $\beta$ -Cat, since  $\beta$ -Cat is no longer localized at the plasma membrane. Moreover, E-Cad expression in the 20mg/kg animals is low. It has been demonstrated that a cytoplasmic localization of  $\beta$ -Cat is associated with a decrease in E-Cad expression (Zhang *et al.*, 2005).  $\beta$ -Cat is also implicated in the regulation of adherens junction (Huber *et al.*, 2001; Gooding *et al.*, 2004) while E-Cad regulate the tight junction (Rothen-Rutishauser *et al.*, 2002, Miyoshi et Takai, 2005), so conjugated effects on E-Cad and  $\beta$ -Cat could explain in part the effects on tight junctions.

Furthermore, Hara *et al.* (1994) reported that TBT is able to replace  $\text{Ca}^{2+}$  in the tight junctions of the blood-brain barrier, and thus increase the permeability of the barrier.

Tight junctional regulation and adherens junction formation are both  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phenomena (Nagafuchi, 2001; Rothen-Rutishauser *et al.*, 2002). If TBT competes with  $\text{Ca}^{2+}$ , this could in part explain the effects observed on the junctional complex in the epididymis, because the tight junctions formation could be compromised.

As demonstrated by Kishta *et al.* (2006) *in utero* TBT exposure induced significant effects on a variety of sperm motility parameters in adult rats. Likewise, exposure to TBT during the puberty has persistent consequences on sperm parameters and epididymal epithelial integrity when individuals reach adulthood (Yu *et al.*, 2003). It would appear that the gestation period is also critical to preserve a functional junctional complex in the epididymis which would lead to functional sperm. Our *in vivo* results demonstrate that for rats, a prenatal exposure to TBT has permanent effects when they reach adulthood.

To investigate how TBT alters epididymal cells, we performed *in vitro* analyses using an epididymal cell line developed in our laboratory (Dufresne *et al.*, 2005). In RCE cells exposed to TBT, we observed a decrease in the mRNA expression of Cldn-1, Cldn-3 and E-Cad. It is not surprising that these results differ from those demonstrated *in vivo* for Cldn-1. In animals, Cldn-1 is localized between the adjacent principal cells and also between the principal and the basal cells (Gregory *et al.*, 2001), but the cell line is composed only of principal cells. In the cell line, there was a dose-dependent decrease of Cldn-1, but the basal 'pool' is absent, and *in vivo* the apical Cldn-1 and the basal Cldn-1 may be not regulated by same mechanisms. As expected, based on *in vivo* experiments in the epididymis and in the ventral prostate (Barthelemy *et al.*, 2006), E-Cad levels were also decreased by TBT exposure in epididymal cells. RCE cells, contrary to other types of cells, exhibit no compensatory effects between Cldns as, Cldn-1 and Cldn-3 were down-regulated synchronously by TBT. Gye *et al.* (2003), showed that in a coculture of Sertoli

and Leydig cells, when *Cldn-1* expression is repressed, *Cldn-11* levels are increased. RCE cell line seems to be a good model to study the effects of drugs and toxicants on the epididymal tight junctions and the blood-epididymal barrier. Further investigation is necessary to determine if the Transepithelial resistance (TER) is affected by this decrease in tight and adhering junctions proteins, similar to what is observed in TBT exposed Caco-2 cells (Tsukazaki *et al.*, 2004). In this study the authors showed after an exposure of 50 to 100 nM of TBT for 13 days, there is a significant decrease of the TER. And it was concomitant with a significant increase of the Lucifer Yellow flux between Caco-2 cells. If there is an increase in permeability, the blood-epididymal barrier will fail to protect the environment in which sperm are maturing.

These results suggest that TBT maybe have epigenetic effects during development in vivo, thereby resulting in persistent alterations in the genetic programming of epididymal cells. However, when mature cells (RCE) are exposed to TBT, the effect is transitory, suggesting that TBT may alter the epigenome only in immature undifferentiated cells. The epigenome is defined as the DNA methylation patterns and the associated posttranslational modifications of histones which determine the expression status of individual genes. Deacetylated histones are associated with gene silencing whereas acetylated histones lead to activation of gene expression (Thiagalingam *et al.*, 2003). It has been previously demonstrated that TBT can, independently from its endocrine disrupting potential, enhance the activity of HAT (histone acetyl transferase), and in this way induce aberrant gene expression (Osada *et al.*, 2005). Others toxicants or drugs, such as azacytidine or lead act via epigenetic mechanisms : in this way lead can impair sperm chromatin and generate infertility, whereas azacytidine causes decreased sperm counts which are directly correlated with a decrease in sperm methylation and fertility (Bombail

et al., 2004 ; Kelly and Trasler, 2004). Other endocrine disruptors, such as vinclozolin or methoxychlor, have also been reported to exert their effects via epigenetic pathways. After a gestational exposure these products can induce transgenerational decrease in sperm counts and increase of male infertility (Anway *et al.*, 2005). Gap junctions are known to be disrupted by toxicants in an epigenetic manner (Trosko *et al.*, 1998 ; Plante *et al.*, 2002). E-Cad has been reported to be modulated via epigenetics mechanism. For instance, the hypermethylation of the E-Cad gene promoter has been demonstrated in different types of prostate cancers (Li *et al.*, 2001; Woodson *et al.*, 2003). However, it has never been shown that environmental factors could induce gene silencing of E-Cad. Recently it has been demonstrated that epigenetic factors could be responsible for the abnormal expression of Cldn-4 in ovarian (Honda *et al.*, 2006) and bladder cancer (Boireau *et al.*, 2006). It is therefore possible that exposure to environmental contaminants such as TBT could induce epigenetic modifications in the expression of E-Cad or Cldns.

The MO experiment demonstrates that each Cldn is independently regulated in the epididymis. When the expression of Cldn-4 was inhibited this induced an increased in Cldn-1 expression, but had no effect on Cldn-3. Conversely, when Cldn-1 or Cldn-3 were down-regulated, there was no effects on expression of the others Cldns. Moreover, when cells were exposed to TBT, the expression of all tested Cldns were decreased. If the regulation of Cldns were dependent on each other, then a decrease in a specific Cldn would have induced effects on the others. Gye *et al.* (2003) demonstrated that a compensatory phenomenon exists between Cldn-1 and Cldn-11 in the testis. It would appear that in the epididymis, a decrease in Cldn-4 levels results in an overexpression of Cldn-1. Whether or not Cldn-4 and Cldn-1 have similar roles in epididymis tight



junctions is not known, these Cldns may have an essential role to play in this organ. In other tissues Cldns can compensate for a loss in another Cldn. For example, in Sertoli cells Cldn-11 is increased following a loss of Cldn-1 (Gow, 1999). Another example is Cldn-19, as mice lacking Cldn-19 presented abnormalities of the PNS (Miyamoto *et al.*, 2005).

In conclusion, this study demonstrated that *in utero* exposure of rats to TBT has permanent effects on the epididymis, as these effects persist into adulthood. The proteins that comprise the junctional complex, especially Cldns and E-Cad, appear to be a target of TBT toxicity. We also demonstrated using immortalized epididymal cells, that Cldns in the epididymis are independently regulated and thus the effects of TBT are likely exerted on each gene separately. The use of the epididymal cell line, may represent a way to explore the mechanisms of TBT toxicity on the epididymal junctional complex. This cell line could also be used to study the effects of toxicants on the blood-epididymal barrier and on the proteins of which it is composed.

## REFERENCES

1. Adeeko A., Daming L., Kishta O., Barthelemy J., Brawer J., Morales C., Hermo L., Cyr D.G., Robaire B., Hales B.F. and Trasler J.M. In Utero Exposure to Tributyltin Chloride Differentially Alters Fetal Gonad Morphology and Gene Expression Profiles In The Sprague-Dawley Rat. In press.
2. Adeeko A., Li D., Forsyth D.S., Casey V., Cooke G.M., Barthelemy J., Cyr D.G., Trasler J.M., Robaire B. and Hales B.F. (2003) Effects of in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome. *Toxicological Science*. 74:407-415.
3. 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.
4. Andersson A.M., Edvardsen K and Skakkebaek NE. (1994) Expression and localization of N- and E-cadherin in the human testis and epididymis. *Int J Androl*. 17:174-180.
5. Anway M.D., Cupp A.S., Uzumco M. and Skinner M. (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308:1466–1469.
6. Basuroy S., Sheth P., Mansbach C.M. and Rao R.K. (2005) Acetaldehyde disrupts tight junctions and adherens junctions in human colonic mucosa: protection by EGF and L-glutamine. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 289:G367-375.
7. Bazzoni G. (2003) The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 15:525-530.
8. Blaquier J.A., Cameo M.S., Cuasnicu P.S., Gonzalez Echeverria M.F., Pineiro L., Tezon J.G. and Vazquez M.H. (1988) On the role of epididymal factors in sperm fertility. *Reprod Nutr Dev*. 28:1209-1216.
9. Boireau S., Buchert M., Samuel M.S., Pannequin J., Ryan J.L., Choquet A., Chapuis H., Rebillard X., Avances C., Ernst M., Joubert D., Mottet N. and Hollande F. (2006) DNA-methylation-dependent alterations of claudin-4 expression in human bladder carcinoma. *Carcinogenesis*. 2006 Jul 8; [Epub ahead of print]
10. Bombail V., Moggs J.G. and Orphanides G. (2004) Perturbation of epigenetic status by toxicants. *Toxicol Lett*. 149:51-58.
11. Boven L.A., Middel J., Verhoef J., De Groot C.J.A. and Nottet H.S.L.M. (2000) Monocyte infiltration is highly associated with loss of the tight junction protein

- zonula occludens in HIV-1-associated dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26: 356–360.
12. Cereijido M., Shoshani L. and Contreras R.G. (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Biogenesis of tight and epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G477-G482.
  13. Chang C., Wang X. and Caldwell R.B. (1997) Serum opens tight junctions and reduces ZO-1 protein in retinal epithelial cells. *J Neurochem* 69: 859–867.
  14. Corey D. R. and J. M. Abrams. (2001) Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biology*, 2: 1015.
  15. Cyr D.G. Hermo L., Blaschuk O.W., 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.
  16. Cyr D.G., Robaire B. and Hermo L. (1995) Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microsc Res Tech.* 30:54-66.
  17. Cyr D. G. (2001) Cell-cell interactions in the epididymis. In: Robaire B, Morales C, Chemes H, eds. *Andrology in the twenty first century*. New York: Medimond Medical Publications; 215–226.
  18. Cyr DG, K.W. Finnon, Dufresne J. and Gregory M. (2002) Cellular interactions and the blood-epididymal epididymis. In: Robaire B, Hinton B, eds. *The epididymis: from molecules to clinical practice*. New York: Plenum Press; 103-118.
  19. Debellefeuille S., Hermo L., Gregory M., Dufresne J. and Cyr D.G. (2003) Catenins in the rat epididymis: their expression and regulation in adulthood and during postnatal development. *Endocrinology* 144:5040-5049.
  20. Dufresne J, Finnon KW, Gregory M and Cyr DG. (2003) Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284:C33-43.
  21. Dufresne J., St-Pierre N., Viger R.S., Hermo L. and Cyr D.G. (2005) Characterization of a Novel Rat Epididymal Cell Line to Study Epididymal Function. *Endocrinology* 146: 4710-4720.
  22. Ebdon L., Evans K. and Hill S. (1989) The accumulation of organotins in adult and seed oysters from selected estuaries prior to the introduction of U.K. regulations governing the use of tributyltin-based antifouling paints. *Science Total*

Environment. 83: 63-84.

23. Fent K. (1996) Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 26: 1-117.
24. Folsvik N., Berge J.A., Brevik E.M. and Walday M. (1999) Quantification of organotin compounds and determination of imposex in populations of dogwhelks (*Nucella lapillus*) from Norway. *Chemosphere* 38: 681-691
25. Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S. and Tsukita S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology* 123:1777-1788.
26. Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K and Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *Journal Cell of Biology* 141:1539-1550.
27. Gonzalez-Mariscal L., Betanzos A., Nava P. and Jaramillo B.E. (2003) Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 81: 1-44.
28. Gooding J. M., Yap K. L. and Ikura M. (2004) The Cadherin-Catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays*. 26: 497-511.
29. Gregory M., Dufresne J., Hermo L. and Cyr D.G. (2001) Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology* 142: 854-863.
30. Gregory M. and Cyr D.G. (2006) Identification of multiple claudins in the rat epididymis. *Mol Reprod Dev.* 73: 580-588.
31. Guan X., Inai T. and Shibata Y. (2005) Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. *Arch Histol Cytol.* 68: 213-225.
32. Gye M.C. (2003) Changes in the expression of claudins and transepithelial electrical resistance of mouse Sertoli cells by Leydig cell coculture. *Int J Androl.* 26: 271-278.
33. Hara K., Yoshizuka M., Doi Y. and Fujimoto S. (1994) Effect of bis tributyl tin oxide on permeability of the blood-brain barrier: a transient increase. *Occupational and Environmental Medecine* 51: 735-738.
34. Harazono A., Ema M. and Ogawa Y. (1996) Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. *Toxicological Letters* 89: 185-190.
35. Hinton B.T. and Palladino M.A. (1995) Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc Res Tech.* 30: 67-81.

36. Hermo L. and Robaire B. (2002) Epididymal cell types and their functions. In: Robaire and B, Hinton B, eds. *The epididymis: from molecules to clinical practice*. New York: Plenum Press; 81–102.
37. Horiguchi T., Kojima M., Kaya M., Matsuo T., Shiraishi H., Morita M. and Adachi Y. (2002) Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, *Haliotis gigantea*. *Mar. Environ. Res.* 54: 679–684.
38. Honda H., Pazin M.J., Ji H., Wernyj R.P. and Morin P.J. (2006). Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 281: 21433-21434.
39. Huber A.H. and Weis W.I. (2001) The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105: 391-402.
40. Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S. and Tsukita S. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 171: 939-45.
41. Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. *J Cell Biol.* 1997 Jul 14;138(1):181-92. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments.
42. Janecki A., Jakubowiak A. and Steinberger A. (1992) Effect of cadmium chloride on transepithelial electrical resistance of Sertoli cell monolayers in two-compartment cultures--a new model for toxicological investigations of the "blood-testis" barrier in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 112: 51-57.
43. Jones R.C. (1999) To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int J Andr* 22: 57-67.
44. Jorundsdottir K., Svavarsson J. and Leung K.M. (2005) Imposex levels in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.)-continuing improvement at high latitudes. *Mar Pollut Bull.* 51: 744-749.
45. Kelly T.L. and Trasler J.M. (2004) Reproductive epigenetics. *Clin Genet* 65:247-260.
46. Kishta O., Barthelemy J., Adeeko A., Gregory M., Cyr D.G., Li D., Luu T., Hermo L., Brawer J.R., Robaire B., Hales B.F. and Morales C.R.. In utero Exposure to Tributyltin Chloride: Long-Term Consequences on Postnatal Development in the Sprague-Dawley Rat. Submitted.
47. Kramer F., White K., Kubbies M., Swisshelm K. and Weber B.H. (2000) Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast

- cancer. *Hum Genet.* 107: 249-256.
48. Kubota K., Furuse M., Sasaki H., Sonoda N., Fujita K., Nagafuchi A. and Tsukita S. (1999) Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Current Biology* 9: 1035-108.
  49. Leroy A., de Bruyne G.K., Oomen L.C. and Mareel M.M. (2003) Alkylphospholipids reversibly open epithelial tight junctions. *Anticancer Research* 23: 27-32.
  50. Levy S and Robaire B. (1999) Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. *Biology of Reproduction* 60:1392-1401.
  51. Li L.C., Zhao H., Nakajima K., Oh B.R., Ribeiro Filho L.A., Carroll P. and Dahiya R. (2001) Methylation of the E-cadherin gene promoter correlates with progression of prostate cancer. *J Urol.* 166:705-709.
  52. Lui W.Y. and Lee W.M. (2006) Regulation of junction dynamics in the testis-transcriptional and post-transcriptional regulations of cell junction proteins. *Mol Cell Endocrinol.* 250: 25-35.
  53. Matter K. and Balda M.S. (2003) Signaling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4: 225-236.
  54. Miyoshi J. and Takai Y. (2005) Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev.* 57: 815-855.
  55. Morita K., Furuse M., Fujimoto K. and Tsukita S. (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96:511-516.
  56. Nagafuchi A. (2001) Molecular architecture of adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol.* 13: 600-603.
  57. Oko R. and Clermont Y. (1989) Light microscopic immunocytochemical study of fibrous sheath and outer dense fiber formation in the rat spermatid. *Anat Rec.* 225: 46-55.
  58. Osada S., Nishikawa J., Nakanishi T., Tanaka K. and Nishihara T. (2005) Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity. *Toxicol Lett.* 155: 329-335.
  59. Pereira W.E., Wade T.L., Hostettler F.D. and Parchaso, F. (1999) Accumulation of butyltins in sediments and lipid tissues of the Asian clam, *Potamocorbula amurensis*, near mare island naval shipyard, San Francisco bay. *Marine Pollution*

Bulletin. 38: 1005–1010.

60. Perez-Moreno M, Jamora C and Fuchs E. (2003) Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*. 112:535-48.
61. Plante I., Charbonneau M. and Cyr D.G. (2002) Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. *Carcinogenesis*. 23: 1243-1249.
62. Robaire B. and Hermo L. (1988) Efferents ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions and their regulation, in: *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil, J. Neill et al., eds., Raven Press ; New York, pp 999-1080.
63. Robaire B., Hinton B. T. and Orgebin-Crist M. C. (2006) The Epididymis. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3th Edition. J. D. Neill Ed. New York, Raven Press. p. 1071-1148.
64. Rothen-Rutishauser B., Riesen F.K., Braun A., Gunthert M. and Wunderli-Allenspach H. (2002) Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. *J Membr Biol*. 188:151-162.
65. Saitou M., Fujimoto K., Doi Y., Itoh M., Fujimoto T., Furuse M., Takano H., Noda T. and Tsukita S. (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *Journal of Cell Biology*. 141: 397-408.
66. Schneeberger E.E. and Lynch R.D. (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*. 286: C1213-1228.
67. Summerton J. and Weller D. (1997) Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. 7: 187-195.
68. Thiagalingam S., Cheng K.H., Lee H.J., Mineva N., Thiagalingam A. and Ponte JF. (2003) Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci*. 983: 84-100.
69. Trosko J.E., Chang C.C., Upham B. and Wilson M. (1998) Epigenetic toxicology as toxicant-induced changes in intracellular signalling leading to altered gap junctional intercellular communication. *Toxicol Lett*. 102-103: 71-78.
70. Turner T.T. (1979) On the epididymis and its function. *Invest Urol*. 16: 311-321.
71. Turner T.T. (2002) Necessity's potion: inorganic ions and small organic molecules in the epididymal lumen. In: Robaire B, Hinton B, eds. *The epididymis: from molecules to clinical practice*. New York: Plenum Press; 131-150.
72. Tsukazaki M., Satsu H., Mori A., Sugita-Konishi Y. and Shimizu M. (2004)

Effects of tributyltin on barrier functions in human intestinal Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 315: 991-997.

73. Van Itallie C.M. and Anderson J.M. (2006) Claudins and epithelial paracellular Transport. *Annu Rev Physiol.* 68: 403-429.
74. Winship K.A. (1988) Toxicity of tin and its compounds. *Advanced Drug Reactions Ac. Pois.* 1: 19-38.
75. Woodson K., Hayes R., Wideroff L., Villaruz L. and Tangrea J. (2003) Hypermethylation of GSTP1, CD44, and E-cadherin genes in prostate cancer among US Blacks and Whites. *Prostate.* 55:199-205.
76. Yap A.S., Briher W.M. and Gumbiner B.M. (1997) Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13: 119-46.
77. Yap A.S., Mullin J.M. and Stevenson B.R. (1998) Molecular analyses of tight junction physiology: insights and paradoxes. *J Membr Biol.* 163: 159-167.
78. Yu W.J., Lee B.J., Nam S.Y., Kim Y.C., Lee Y.S. and Yun Y.W. (2003) Spermatogenic disorders in adult rats exposed to tributyltin chloride during puberty. *J Vet Med Sci.* 65: 1331-1335.



Table 1: Oligonucleotide sequence of the different anti-sense MOs

MO name	Sequence
E-Cad	5'-AGA AGC TGC GGC ACC GGG CTC CCA T-3'
Cldn-1	5'-TGA GGC TCA GTG GCA GGT GCA GAA A-3'
Cldn-3	5'-GGT GAT CTC CAG GCT CAT GGA CAT G-3'
Cldn-4	5'-GAC CTG TAG TCC CAT AGA CGC CAT C-3'
Nonsense Control	5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3'

Table 2: Nucleotide sequence of the primers used for the RT-PCR analyses

<b>Primer name</b>	<b>Nucleotide Sequence</b>
Cldn-1 Forward Cldn-1 Reverse	5' AGC CAG GAG CCT CGC CCC GCA GCT GCA 3' 5' CAG CCA AGG CCT GCA TAG CCA TGG 3'
Cldn-3 Forward Cldn-3 Reverse	5' GCG CGT TTC GGC ATT CAT C 3' 5' GGA TCT TGG TGG GTG CGT ACT TCT 3'
E-Cad Forward E-Cad Reverse	5' TGC CCC AGT ATC GTC CCC GTC 3' 5' CGG TTG CCC CAT TCG TTC AGA 3'
GAPDH Forward GAPDH Reverse	5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3' 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'

### Figure legends

Figure 1: Epididymides from rats exposed *in utero* to TBT were removed and separated in two regions, the proximal and the distal one. Two rats were pooled together. Proteins were subjected to Western blot analysis. Analysis was done for Cldn-1 (A); ZO-1 (B) and E-Cad (C). Each value is expressed as the mean  $\pm$  SEM. Data were standardized for loading using actin antisera. There were 4 individuals per experimental group. An asterisk (\*) indicates the groups that are significantly different from controls at a level of  $P \leq 0.05$ .

Figure 2: Immunolocalization of Cldn-1; E-Cad; ZO-1 and  $\beta$ -Catenin in various regions of epididymis of adult rats exposed *in utero* to TBT. Cldn-1 immunoreaction was present at the apical region of principal cells and also at the base of the lateral margin as well as between the principal and the basal cells. With increasing doses of TBT, the staining was less prominent at the apical margin, until it completely disappeared in the 20mg/kg group. The staining along the lateral plasma membrane became more intense with increasing doses of TBT. The phenomenon was consistent in all regions of epididymis. ZO-1 was immunolocalized in the apical region of principal cells. A dose-dependant decrease in the immunoreactive staining of ZO-1 was observed in rats exposed to TBT, throughout the epididymis. E-cad was immunolocalized at the lateral plasma membrane between adjacent principal cells of the epididymis in control rats. With increasing doses of TBT the intensity of the immunoreaction was diminished in all regions of the epididymis. Immunoreactive  $\beta$ -Cat was observed between the adjacent principal cells, as well as between the clear cells. With an increasing dose of TBT, a decrease in  $\beta$ -cat staining was noted, in all the regions of the epididymis and an increase in the cytoplasmic staining, especially in the cauda epididymidis.

P: principal cells; L: lumen;  $\rightarrow$  staining. Magnification 1008x.

Figure 3: (A) Immunoprecipitation of ZO-1 in the proximal part and the distal part of epididymis of adult rats exposed *in utero* to TBT. ZO-1 was immunoprecipitated as described in Materials and Methods, and immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane. Blots were

screened for Cldn-1 and ZO-1 using specific antisera for each of these proteins. Dark bars represent the proximal region and clear bars the distal region.

(B) Immunoprecipitation of  $\beta$ -Catenin in the proximal part and the distal part of epididymis of adult rats exposed in utero to TBT.  $\beta$ -catenin was immunoprecipitated as described in Materials and Methods, and immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane. Blots were screened for  $\beta$ -catenin and E-Cad using specific antisera for each of these proteins. Clear bars represent the proximal region and dark bars the distal region.

Figure 4: RT-PCR analysis of expression levels of E-Cad, Cldn-1 and Cldn-3 in RCE cells exposed for 24h to different doses of TBT. Each value is expressed as the mean  $\pm$  SEM. Four first bars represent the expression of the protein in cells after 24h exposure to TBT. The four last bars represent the expression of the protein in the cells after 24h exposure to TBT with one more week in normal media. An asterisk (\*) indicates the groups that are significantly different from controls at a level of  $P \leq 0.05$ . Two asterisks (\*\*) indicates the groups that are significantly different from controls at a level of  $P \leq 0.01$ .

Figure 5: (A) FACS analysis of MOs incorporation in RCE cells with various concentrations of EPEI.

(B) Evaluation of the mortality of RCE cells following exposure to standard FITC MO with increasing doses of EPEI.

Figure 6: Expression of E-Cad (A) and Cldn-1 (B) in RCE cells following an exposure to E-Cad MO. An asterisk (\*) indicates the groups that are significantly different from controls at a level of  $P \leq 0.05$ .

Figure 7: Expression of Cldn-1 (A) and E-Cad (B) in RCE cells following an exposure to Cldn-1MO. An asterisk (\*) indicates the groups that are significantly different from controls at a level of  $P \leq 0.05$ .

Figure 8: Expression of Cldn-4 (A), Cldn-3 (B) and Cldn-1 (C) in RCE cells following an exposure to Cldn-4 MO. The second bar in (A) represents the expression of Cldn-4 following an exposure to standard MO to demonstrate the specificity of MOs. An asterisk (\*) indicates the groups that are significantly different from controls at a level of  $P \leq 0.05$ .

Figure 9: Expression of Cldn-3 (A), Cldn-4 (B) and Cldn-1 (C) in RCE cells following an exposure to Cldn-3 MO. An asterisk (\*) indicates the groups that are significantly different from controls at a level of  $P \leq 0.05$ .

Figure 10: Expression of Cldn-1 (A), Cldn-1 (B) and Cldn-4 (C) in RCE cells following an exposure to Cldn-1 MO. An asterisk (\*) indicates the groups that are significantly different from controls at a level of  $P \leq 0.05$ .

Figure 1

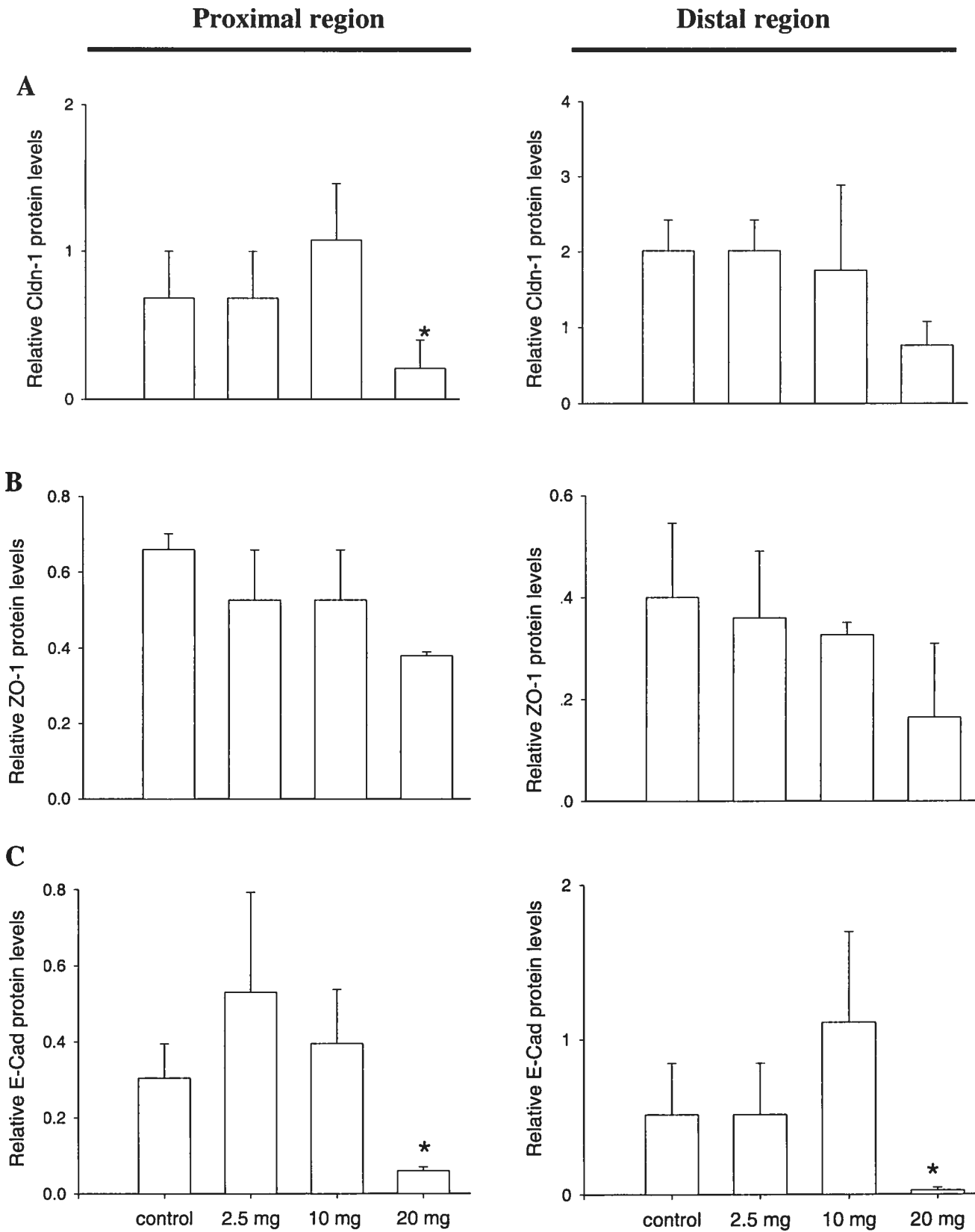
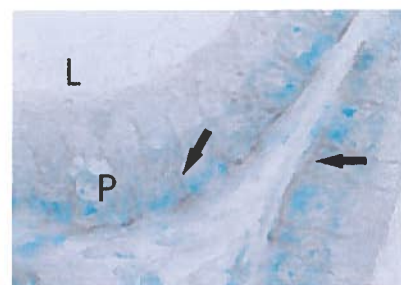
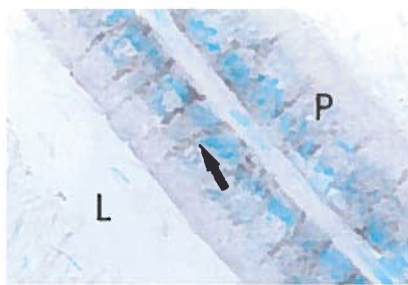
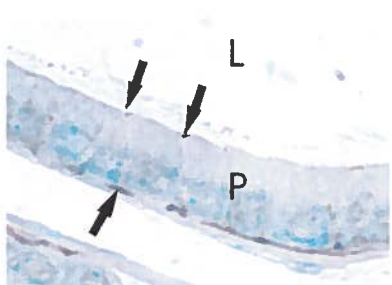
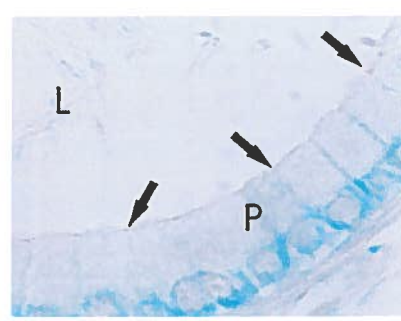
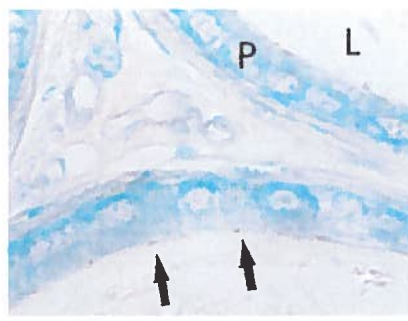
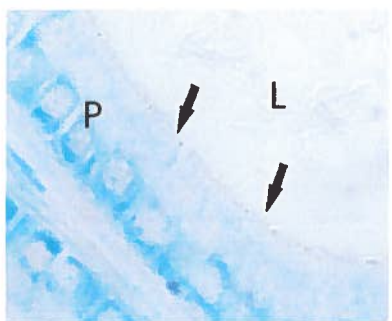


Figure 2

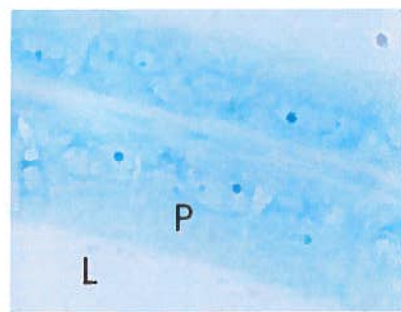
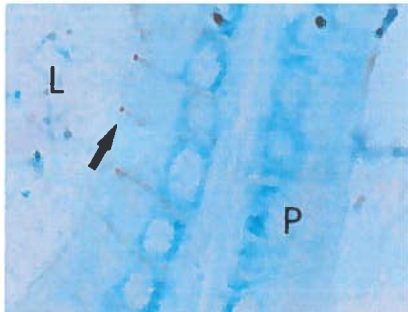
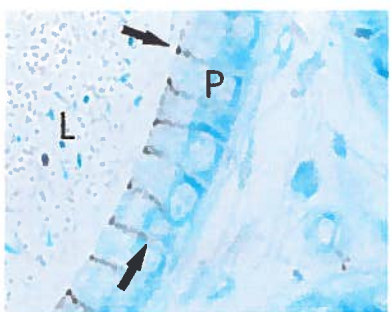
Cldn-1



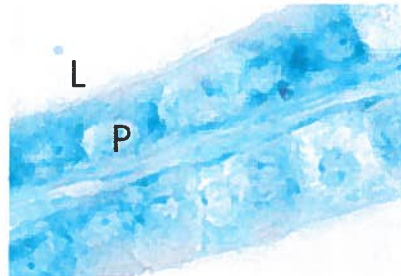
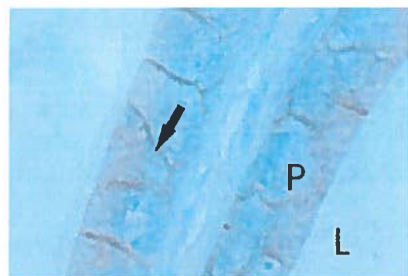
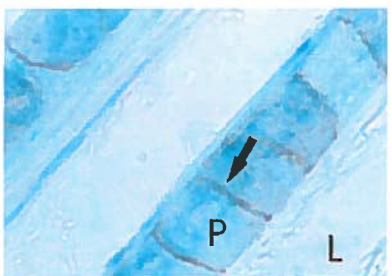
ZO-1



E-Cad



b-Cat



Control

10mg/kg

20mg/kg

Figure 3

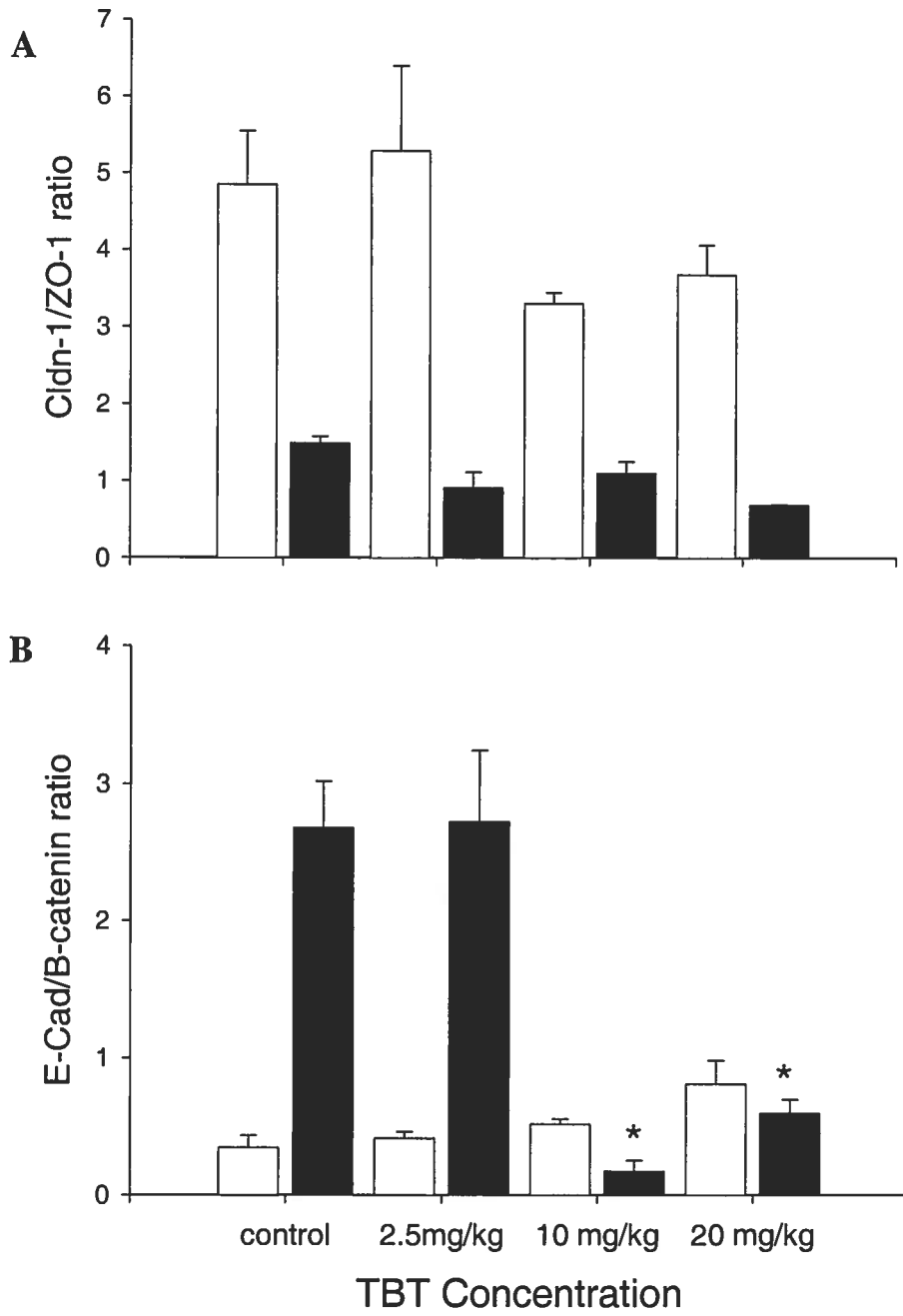




Figure 4

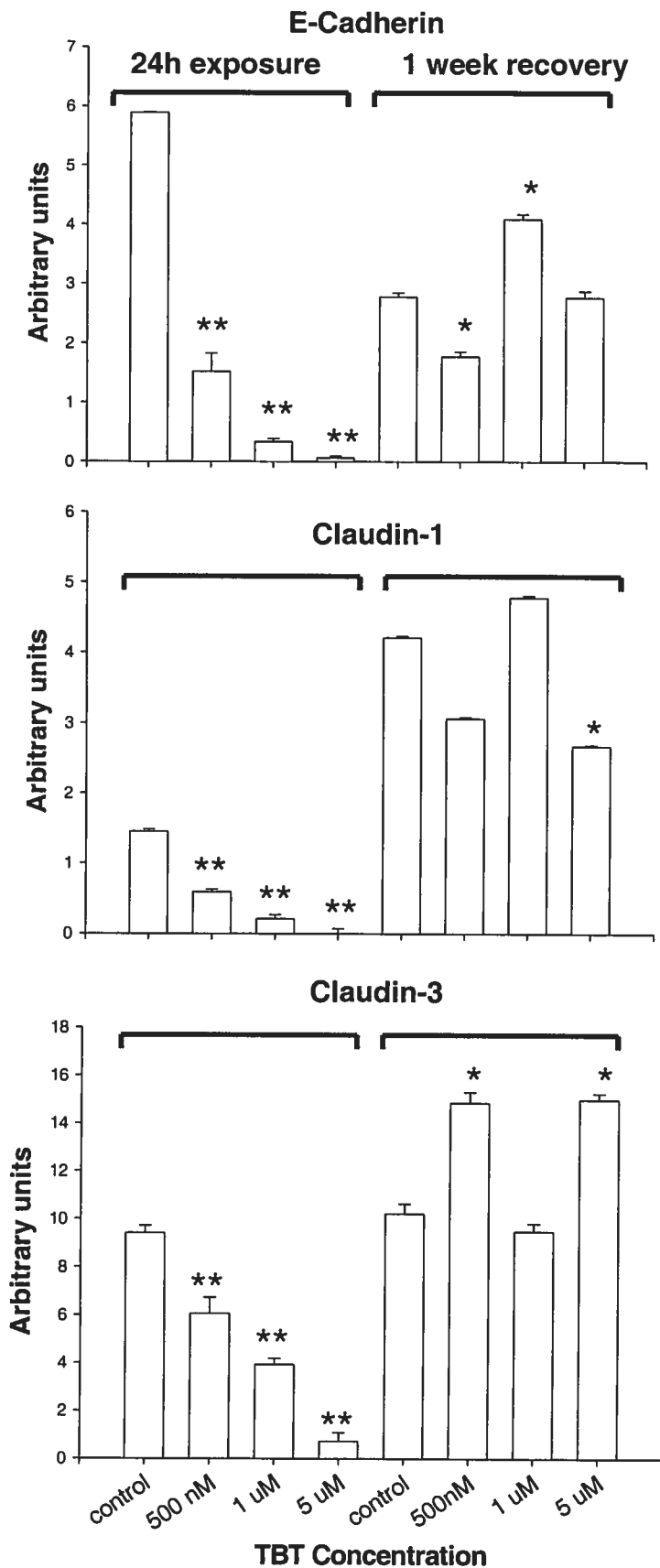


Figure 5

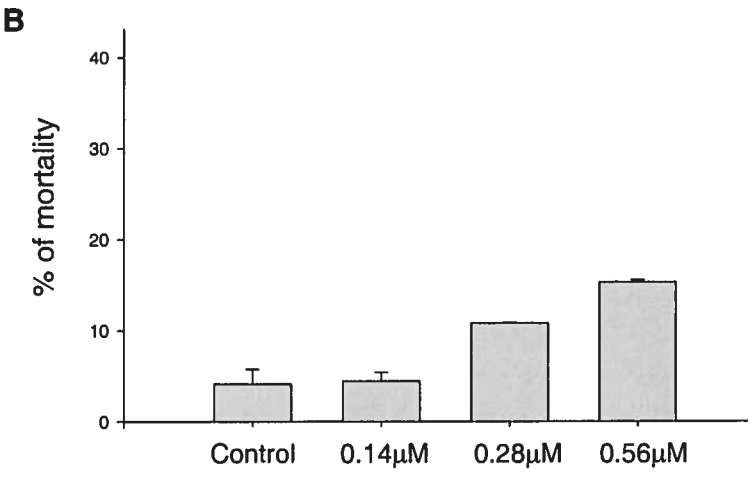
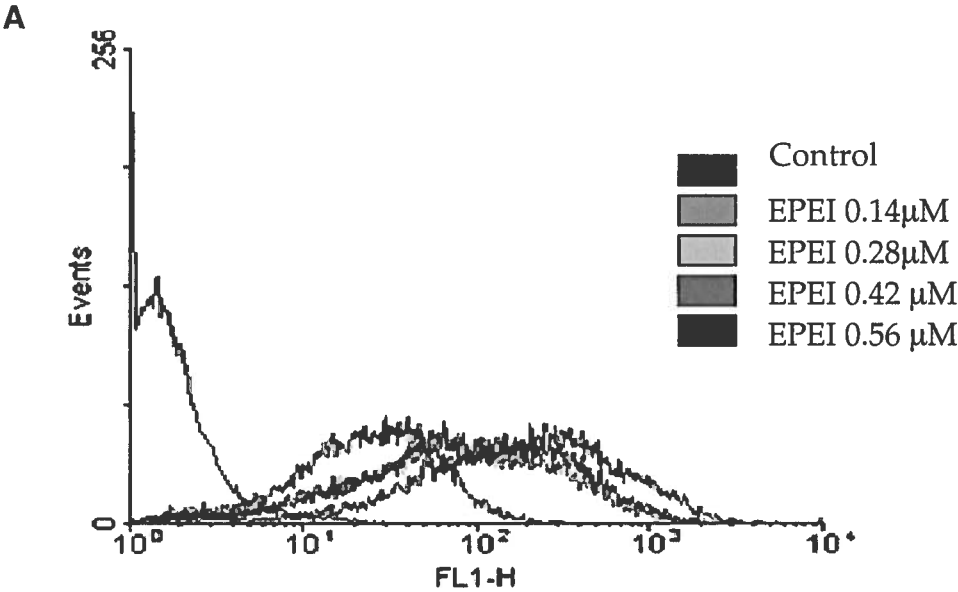
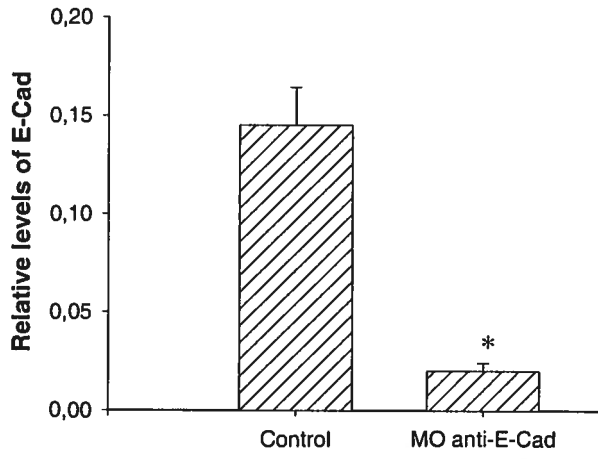


Figure 6

**A**



**B**

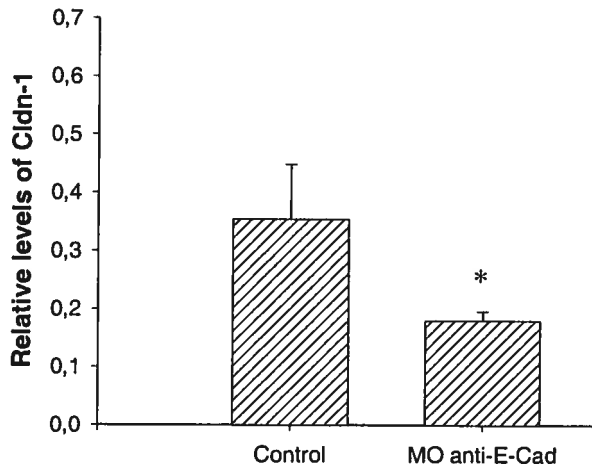
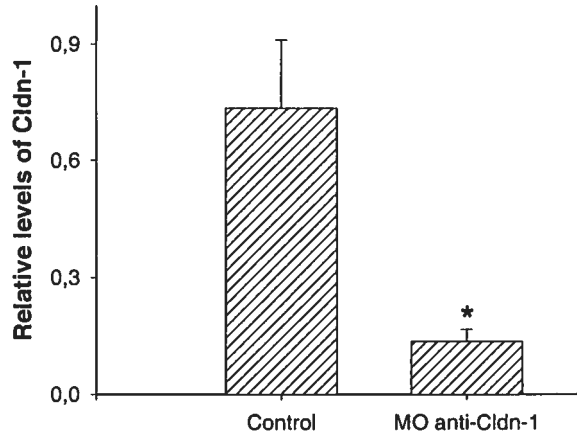


Figure 7

**A**



**B**

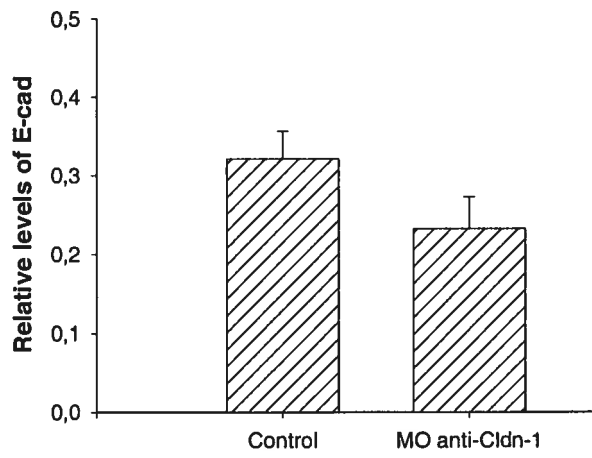


Figure 8

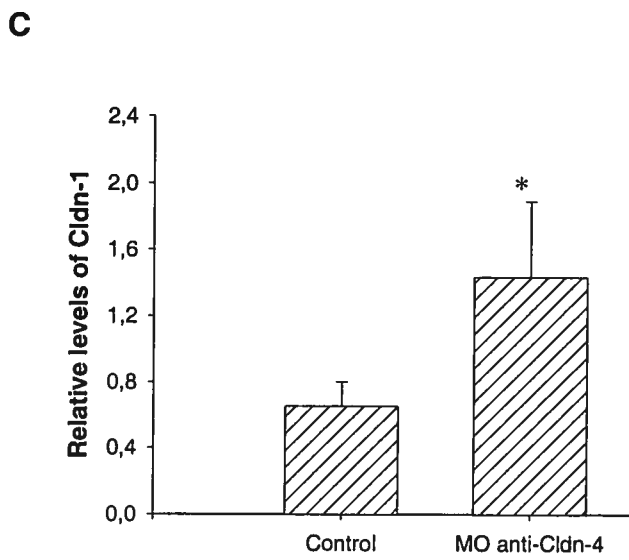
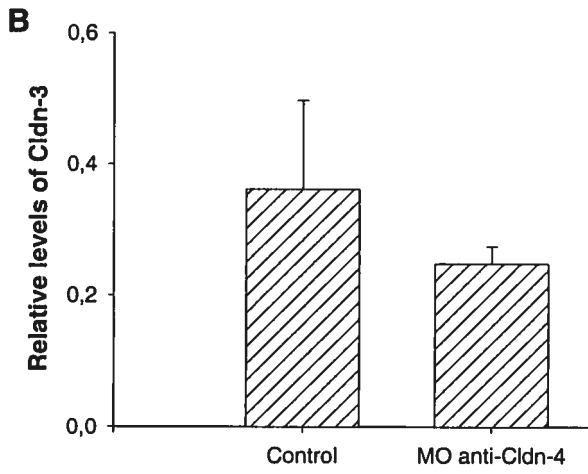
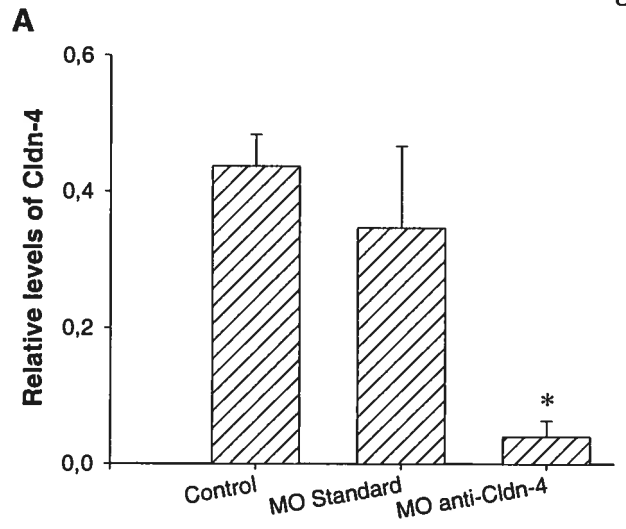


Figure 9

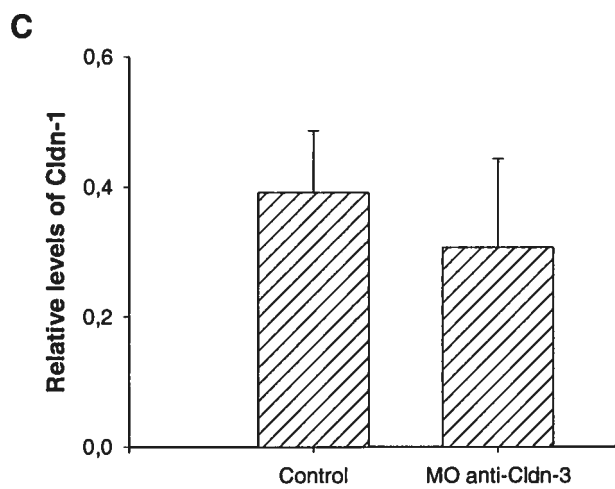
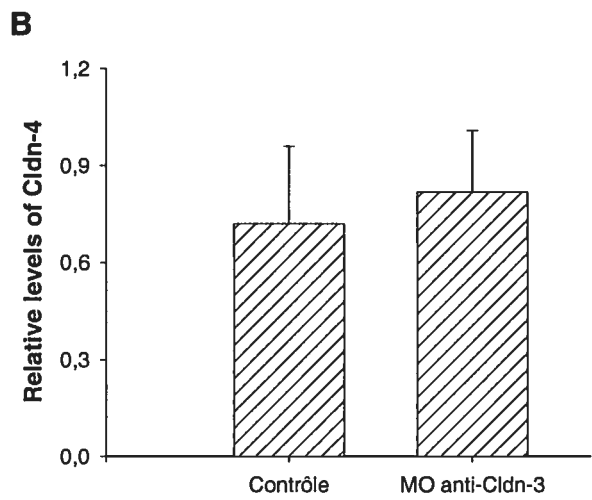
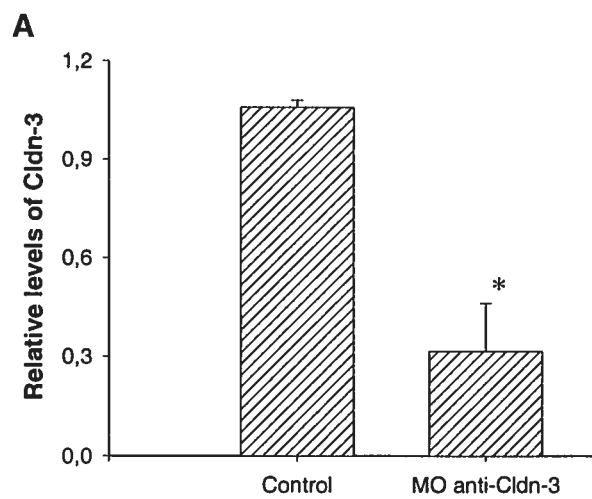
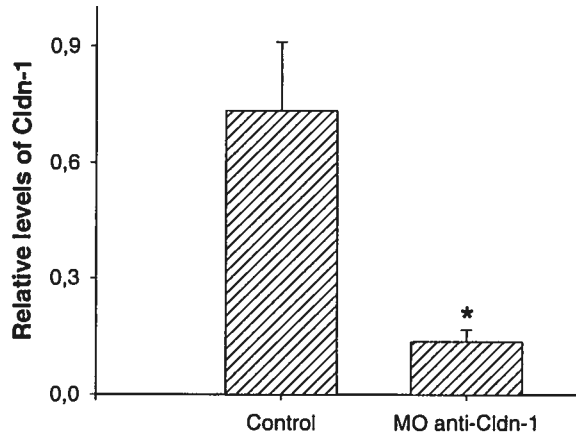
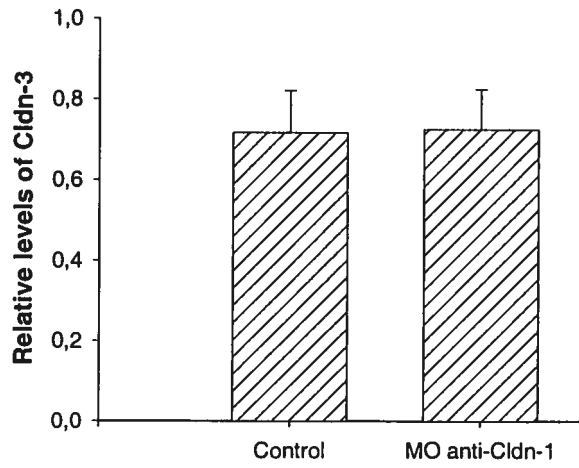


Figure 10

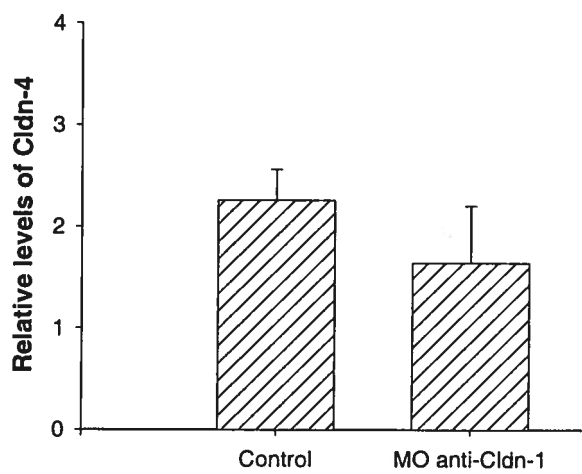
**A**



**B**



**C**







## Discussion - Conclusion

Depuis plusieurs décennies, une baisse de la qualité des spermatozoïdes a été observée chez les hommes (Carlsen *et al.*, 1992 ; Swan *et al.*, 1997), et cette décroissance pourrait en partie être due à une exposition à des contaminants environnementaux. Le TBT, qui est un perturbateur endocrinien, pourrait porter une partie de la responsabilité. Sa toxicité sur le système reproducteur des mollusques et des poissons est depuis longtemps démontrée (Hutchinson et Matthiesen, 1999). Des études récentes sur les mammifères ont montré qu'une exposition au TBT durant la puberté pouvait avoir des effets sur les organes sexuels mâles ainsi que sur les spermatozoïdes (Yu *et al.*, 2003 ; Grote *et al.*, 2004). Mais peu d'études ont porté sur les effets du TBT sur la santé des mammifères et notamment des humains. Le but de la présente étude était de déterminer quels étaient les effets d'une exposition *in utero* au TBT sur des individus mâles une fois l'âge de la maturité sexuelle atteint.

Dans un premier temps, nous avons pu constater les effets à long terme du TBT sur le système reproducteur mâle. En effet, une exposition *in utero* entraîne de nombreux effets tels que l'avaient constaté Omura *et al.* (2001), lors d'une étude où les individus étaient exposés *in utero* et durant la période de lactation. Dans notre étude, les premières constatations furent que le TBT induisait une baisse de la taille des portées tel que précédemment démontré (Adeeko *et al.*, 2003) et d'autre part que les individus mâles semblaient plus susceptibles que les individus femelles aux effets du TBT. En effet, des mécanismes androgéno-dépendants, tels que la séparation balano-préputiale étaient affectés. Le TBT a récemment été reconnu pour être capable d'inhiber la production de testostérone, via une baisse au niveau du Cyt P450 17 $\alpha$ -hydrolase et de la protéine de régulation de la stéroïdogénèse StAR (Nakajima, 2005). Doering *et al.* (2002) avaient également mis en évidence le fait que le TBT pouvait inhiber la 5 $\alpha$ -réductase, qui sert à convertir la testostérone en DHT. Ceci confirme le rôle de perturbateur endocrinien du TBT, qui est donc capable d'induire une sous-masculinisation chez les rats mâles tout comme d'autres perturbateurs endocriniens tels que la vinclozoline ou les phtalates (Hughes *et al.*, 2006). Les rats connaissent tout d'abord une baisse très importante de leur croissance à leur naissance, comparativement aux individus contrôle pour tous les

groupes d'exposition. Cependant cette différence se résorbait pour les animaux du groupe à 2.5 mg/kg de TBT, tandis que les individus des groupes 10 et 20 mg/kg restaient plus petits. Parmi les organes du tractus reproducteur affectés suite à une exposition *in utero* au TBT, le poids des testicules à 20 mg/kg et le poids de la prostate ventrale pour les deux plus fortes doses étaient significativement diminués. Ceci contrairement à ce qui avait été observé lorsque les rats étaient exposés durant leur puberté au TBT, où le poids des organes du système reproducteur n'était pas atteints (Yu *et al.*, 2003). Par contre, dans notre étude, même si le poids des testicules n'était pas toujours affecté, en microscopie électronique, des anomalies étaient observées au niveau de la membrane plasmique et de l'acrosome des spermatozoïdes. C'est la première fois que les dommages précis du TBT sur les spermatozoïdes sont observés. De plus, d'importants effets étaient notés sur les paramètres permettant de caractériser les spermatozoïdes. En effet, lors de l'analyse de sperme par ordinateur, a été mis en évidence une baisse significative du pourcentage de cellules motiles et de la progressivité des spermatozoïdes, ainsi qu'une augmentation de leur vitesse moyenne. Ainsi, les spermatozoïdes si ils sont plus rapides en moyenne, sont moins nombreux à l'être et ont une linéarité de progression plus basse, ce qui aurait des conséquences sur leur capacité à atteindre un ovocyte (Gadea, 2005). Il a été démontré que ce type d'analyse par ordinateur (CASA) permettait de bien mettre en évidence les dysfonctionnements des spermatozoïdes suite à une exposition à des toxiques (Perreault et Cancel, 2001) et que la mesure de la motilité est le meilleur paramètre pour déterminer les effets d'un contaminant sur les spermatozoïdes (Horimoto *et al.*, 2000). Comme mis en évidence dans des études qui exposaient les rats au TBT durant leur puberté ou durant leur vie d'adulte et dans lesquelles on observait des effets sur ces paramètres (Yu *et al.*, 2003 ; Grote *et al.*, 2004), une exposition *in utero* a des conséquences à long terme sur les spermatozoïdes et leur caractéristiques de motilité. Néanmoins, chez les rats exposés *in utero*, la vitesse moyenne (VAP) est augmentée, or ce paramètre n'était pas atteint chez des rats exposés durant leur puberté. Ainsi, selon la période d'exposition la susceptibilité des spermatozoïdes est différente. L'exposition au TBT n'avait aucun effet sur la concentration des spermatozoïdes. Ce n'est donc pas la quantité du sperme qui est affecté mais bien sa qualité.

L'analyse de gènes par macroréseaux a permis de mettre en évidence une baisse dans les testicules de l'adenylyl cyclase de type II qui est une enzyme impliquée dans la formation de l'AMPc à partir de l'ATP. Or l'AMPc est impliquée dans le phénomène de capacitation des spermatozoïdes qui est nécessaire pour donner à ces derniers la capacité de féconder un ovocyte (Lewis et Aitken, 2001; Fraser *et al.*, 2005). Ainsi, il est possible que l'AMPc soit également affectée chez les spermatozoïdes provenant de rats exposés *in utero* au TBT. Cependant, aucun test de fertilité n'a été pratiqué, afin de confirmer ces hypothèses.

Lors de l'étude générale d'importants effets avaient été observés sur le poids de la prostate ventrale, qui était diminué de façon importante ainsi que sa structure qui semblait avoir changé. Nous avons décidé d'investiguer sur les effets précis du TBT sur cet organe. Ce qui était notamment étonnant était le fait que la prostate, qui est un organe androgène-dépendant (Kumar et Majumder, 1995 ; Cunha *et al.*, 2004), soit si drastiquement affecté, tandis que les vésicules séminales, dont la croissance dépend aussi directement des androgènes (Gonzales, 1994), ne l'étaient pas. Cependant, nous avons pu montrer que les niveaux de testostérone n'étaient pas significativement affectés chez les rats exposés au TBT, alors cela a déjà été observé tant dans des études *in vivo* (Yu *et al.*, 2003) qu'*in vitro* (Nakajima, 2005). Ainsi, les effets observés sur la prostate seraient organe-spécifique et non simplement dus aux conséquences d'une baisse des niveaux d'androgènes. Des analyses de patron d'expression des gènes à l'aide de macro-réseaux ont permis de mettre en évidence différentes familles de gènes qui étaient affectées par l'exposition au TBT dans la prostate ventrale. Notamment des gènes impliqués dans la polarisation et la régulation de l'adhésion cellulaire et des jonctions, telles que les protéines G. Ces dernières sont notamment impliquées dans la mise en place des jonctions serrées et des jonctions adhérentes (Fukuyama *et al.*, 2005). Soit elles n'étaient présentes que dans les contrôles, ou elles voyaient leur expression diminuée chez les animaux traités au TBT. Même si les protéines G sont impliquées dans de très nombreuses voies de signalisation, telles que la migration cellulaire ou même la réponse inflammatoire, il est cependant possible le TBT agisse sur les protéines de jonctions au niveau de leur régulation. Cette hypothèse est confirmée par la baisse de deux kinases, KCIP1 et PKI-beta. En effet, il est connu que la dynamique des jonctions serrées est en

partie régulée par les kinases dans le système reproducteur et qu'une altération dans l'activité des kinases dans le testicule entraînait une dissociation des jonctions serrées (Li *et al.*, 2001), même si l'implication directe de KCIP1 et PKI-beta dans la régulation des jonctions n'a pas été démontrée à ce jour.

Dans la prostate ventrale, l'exposition au TBT induit une baisse de la calpastatine, qui est un inhibiteur de la calpaïne. La calpaïne est une protéinase impliquée dans l'adhésion cellulaire (Carragher *et al.*, 2004). Il a été démontré que dans une cellule, lorsque les niveaux de protéinases dépassent ceux de leurs inhibiteurs, une altération des jonctions serrées et une baisse de la résistance trans-épithéliale (TER) étaient observées. Or, Tsukazaki *et al.* (2004), ont démontré que dans des cellules intestinales Caco-2, une exposition au TBT induisait une baisse de la TER et ainsi une augmentation de la perméabilité de la barrière composée par les jonctions serrées. Il est donc probable que le même phénomène advienne dans la prostate et ait des conséquences sur la composition du sperme, et induise ainsi des effets sur les spermatozoïdes.

Le développement du système reproducteur est complexe et dépend de nombreux phénomènes hormonaux, mais également, pour un développement normal, des interactions cellule-cellule. Ainsi, des effets sur la prostate laissaient augurer des possibles effets sur ces interactions cellulaires. Le complexe jonctionnel des cellules épithéliales est composé des jonctions adhérentes, des jonctions lacunaires et des jonctions serrées (Kachar et Reese, 1983 ; Habermann *et al.*, 2001 ; Pointis *et al.*, 2005). Nous avons tout d'abord voulu déterminer quelles étaient les claudines qui composaient les jonctions serrées de la prostate, puisque seules certaines avaient déjà été identifiées (Swisshelm *et al.*, 1999 ; Long *et al.*, 2001). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que la Cldn-1 (aussi connue comme SEMP-1) Cldn-3, Cldn-4, Cldn-5 qui est spécifique des cellules endothéliales, ainsi que la Cldn-8 étaient présentes dans la prostate ventrale. Par contre, la Cldn-6, Cldn-9 et Cldn-11 étaient absentes. Nous avons ensuite pu déterminer que l'expression des claudines était affectée suite à une exposition *in utero* au TBT. Ce qui était intéressant de souligner, est que toutes les claudines n'étaient pas affectées de la même manière par cette exposition. En effet, si une tendance à la diminution était observée pour l'ARNm de Cldn-1, les niveaux de Cldn-3 et de Cldn-4 ne semblaient pas affectés tandis que l'expression de l'ARNm de Cldn-8 était augmentée pour les groupes de 2,5 et 10 mg/kg mais diminuée pour celui de 20mg/kg. Cela semble confirmer le fait

que toutes les claudines ne sont pas impliquées de la même façon dans les jonctions serrées et qu'elles jouent chacune un rôle particulier, telle par exemple la Cldn-11 dans le testicule, ou la Cldn-16 dans l'épididyme (Gye, 2003 ; Gregory *et al.*, 2006). De plus, dans la prostate ventrale, la diminution de l'expression de Cldn-1 allait de pair avec son expression protéique, mais le point le plus important était un changement au niveau de sa localisation. En effet, le TBT entraînait une délocalisation de la Cldn-1, qui n'est plus située au niveau apical mais tout au long de la membrane plasmique. Or, depuis longtemps il est démontré que la mise en place des jonctions serrées est fonction de celles de jonctions adhérentes (Denker et Nigam, 1998 ; Miyoshi et Takai, 2005). Nous avons constaté que E-cadhérine, qui est la cadhérine majoritaire de la prostate ventrale (Paul *et al.*, 1997), était affectée elle aussi par une exposition *in utero* au TBT, tant au niveau de son ARNm que de son expression protéique.

Comme les jonctions serrées servent de protection pour les spermatozoïdes en formant des barrières dans le système reproducteur, telles la barrière hémato-testiculaire (Cheng et Mruk, 2002), hémato-épididymaire (Cyr *et al.*, 2002), et également la plus récemment découverte barrière hémato-prostatique (Fulmer et Turner, 2000). Les effets observés sur les spermatozoïdes nous laissaient suspecter un effet du TBT sur la barrière hémato-épididymaire, puisque l'épididyme est l'organe de maturation des spermatozoïdes. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que dans l'épididyme, une exposition *in utero* au TBT entraîne aussi d'importants effets sur les rats une fois l'âge adulte atteint. En effet, l'expression protéique de Cldn-1, ZO-1 et E-Cad était diminuée dans l'épididyme, tant dans la région proximale que la région distale. Par immunocytochimie, nous avons observé, comme dans la prostate ventrale, des effets du TBT sur la localisation de la Cldn-1. En effet, il y avait une perte du marquage au niveau apical et un marquage plus dispersé le long de la membrane entre les cellules principales, ainsi qu'entre les cellules principales et basales de l'épididyme tel que précédemment démontré (Gregory *et al.*, 2001). De plus, nous avons pu mettre en évidence une perte de la liaison entre E-cadhérine et  $\beta$ -caténine, qui est un adaptateur permettant le lien entre E-cadhérine et le cytosquelette (Blaschuk *et al.*, 2002 ; Gooding *et al.*, 2004). Ainsi, dans l'épididyme, une exposition *in utero* entraîne des effets sur les acteurs de la jonction serrée, Cldn-1 et ZO-1, et de la jonction adhérente, E-cadhérine et  $\beta$ -caténine. Comme les jonctions adhérentes

régulent la mise en place des jonctions serrées (Schneeberger et Lynch, 2004 ; Miyoshi et Takai, 2005), il n'est pas étonnant que des effets soient observés dans les deux formes de jonctions. Il avait été démontré dans la prostate ventrale que la calpastatine, qui est un inhibiteur de la calpaïne était diminuée. Or cette protéinase, via l'action de la calpastatine, est impliquée dans l'expression et la localisation de  $\beta$ -caténine (Benetti *et al.*, 2005). Il serait donc intéressant de savoir si un effet était également noté sur la calpaïne ou la calpastatine dans l'épididyme, qui pourrait expliquer le changement dans la localisation de  $\beta$ -caténine que nous avons observé.

Nous avons poursuivi notre étude, en étudiant les effets d'une exposition au TBT sur les protéines du complexe jonctionnel dans une lignée de cellules de l'épididyme, les cellules RCE, récemment caractérisée (Dufresne *et al.*, 2005). Il a déjà été mis en évidence que chez des cellules intestinales Caco-2, une exposition au TBT entraînait une augmentation de la perméabilité de la barrière (Tsukazaki *et al.*, 2004) sans pour autant caractériser les protéines des jonctions serrées qui étaient impliquées, si ce n'est l'observation d'effets sur l'actine. Lors de l'exposition des cellules épидидymaires au TBT, nous avons pu constater une baisse dose-dépendante de l'expression de E-cadhérine, Cldn-1 et Cldn-3. Par contre, contrairement aux organes, où une exposition *in utero* entraîne des conséquences sur les individus adultes, les cellules de l'épididyme ont une capacité de 'récupération' puisqu'après une semaine dans du milieu sans TBT, les niveaux d'expression des protéines reviennent au niveau d'expression des cellules contrôle. Ceci semblait suggérer que le TBT agissait de manière épигénétique dans les cellules immatures *in vivo*, induisant des effets sur les individus devenus adultes, tandis qu'il n'agirait pas sur l'épigénome des cellules matures épидидymaires, soit les cellules de la lignée cellulaire. L'épigénome est défini par les patrons de méthylation et les modifications subséquentes dans l'acétylation des histones, qui vont déterminer l'expression ou l'inhibition des gènes (Thiagalingam *et al.*, 2003). Or, il a déjà été démontré que le TBT pouvait induire l'activité des HAT (pour histone acetyl transférase), et de cette façon induire des effets sur l'expression génique, indépendamment de ses effets de perturbateur endocrinien (Osada *et al.*, 2005). Il pourrait donc être intéressant de s'intéresser aux patrons de méthylation des gènes pour voir si il existe des différences entre les animaux contrôles et ceux exposés au TBT. Il est également possible que l'immortalisation des cellules induisent une réponse différente

par rapport à des cellules de lignées primaires ou des cellules *in vivo*. En effet l'immortalisation des cellules entraîne souvent des changements épigénétiques. Par exemple Liu *et al.* (2005) ont démontré qu'une immortalisation des cellules avec SV40 entraînait une méthylation anormale de certains gènes.

De plus, il existe aussi une autre explication pour élucider les disparités de réaction entre les animaux et les cellules. Le TBT est reconnu pour un produit bioaccumulable (Takahashi *et al.*, 1999 ; Veltman *et al.*, 2006). Le plancton est par exemple soumis à des concentrations de TBT 70000 fois supérieures à celles de l'eau de mer, de part sa faible capacité à dégrader le TBT. Il est donc possible que ce produit, bien qu'aucun dosage n'ait été fait, ait été concentré dans les individus exposés *in utero*. C'est pourquoi des effets aussi importants seraient rémanents à l'âge adulte.

Ainsi, une exposition *in utero* au TBT entraîne de nombreuses conséquences sur le développement du système reproducteur et sur son fonctionnement, une fois l'âge adulte atteint. Les protéines qui composent les complexes jonctionnels des cellules épithéliales semblent être une cible préférentielle du TBT. Plusieurs explications pourraient être avancées, notamment le fait que le TBT a été identifié comme étant capable de rendre les jonctions serrées de la barrière hémato-encéphalique plus perméables, en remplaçant les ions calcium (Hara *et al.*, 1994) ou en induisant une augmentation du calcium intracellulaire (Corsini *et al.*, 1997; Kawanishi *et al.*, 2001). En effet, la régulation des jonctions serrées, mais également la mise en place des jonctions adhérentes sont des phénomènes calcium-dépendants (Nagafuchi, 2001 ; Rothen-Rutishauser *et al.*, 2002), le TBT pourrait donc exercer ainsi son effet. De surcroît, le calcium est particulièrement important dans l'épididyme. En effet, durant leur passage dans le canal épидидymaire, les spermatozoïdes accumulent deux fois moins de  $Ca^{2+}$  dans la queue de l'épididyme que dans la tête, ainsi ils subissent un important changement dans leur capacité à accumuler le  $Ca^{2+}$  (Hoskins *et al.*, 1983 ; Meseguer *et al.*, 2004). Le  $Ca^{2+}$  est aussi impliqué dans la motilité des spermatozoïdes, puisque des mécanismes calcium-dépendant sont responsables de la transformation du mouvement irrégulier des spermatozoïdes en un mouvement progressif (Amstrong *et al.*, 1994 ; Saberval *et al.*, 2002). D'autres produits qui peuvent aussi agir sur le calcium, tels que les

PCB qui ont un effet sur l'homéostasie du calcium, ont également été déterminé comme induisant des effets sur les spermatozoïdes (Pflieger-Bruss *et al.*, 2006).

De surcroît, différentes voies de signalisation pourrait être atteintes et expliqueraient l'effet observé sur les claudines, ZO-1 et E-cadhérine. Notamment la voie des MAP kinases. En effet, il a été démontré lors d'études sur la barrière hémato-testiculaire que la voie de signalisation de la p38 MAP kinase régule la dynamique des jonctions serrées et des jonctions adhérentes (Wong *et al.*, 2004), et a des effets sur l'occludine, ZO-1 ainsi que sur le complexe cadhérine-caténine. D'autres études ont mis en évidence une restauration de la morphologie des cellules épithéliales et la mise en place de nouvelles jonctions serrées suite à une inhibition de la voie des MAPk (Chen *et al.*, 2000). Or, comme le TBT est capable de stimuler la voie des MAPK (Yu *et al.*, 2000), ce serait une des voies possibles d'action pour expliquer en partie l'effet sur les jonctions serrées et sur E-cadhérine.

Suite aux différentes expériences menées au niveau des jonctions cellulaires, nous avons voulu étudier le lien existant entre les jonctions adhérentes et les jonctions serrées ainsi que le celui existant entre les différentes claudines, puisque nous avons pu observer que les claudines, par exemple dans la prostate, ne semblaient pas être affectées de la même façon par une exposition au TBT. Dans l'épididyme également chacune doit avoir un rôle précis à jouer. Par exemple, il a été démontré par Guan *et al.* (2005) que dans l'épididyme, la Cldn-6 n'était exprimée que jusqu'à l'âge de 7 jours, ou que la Cldn-9 n'était exprimée que très faiblement chez l'adulte et uniquement dans le segment initial de même que la Cldn-16 (Gregory et Cyr, 2006). Nous avons décidé de choisir une approche à l'aide d'oligos de type morpholinos (MO), pour inhiber l'expression des différentes protéines de jonctions, puis vérifier l'effet subséquent sur les autres protéines, en utilisant la lignée de cellules épидидymaires RCE mis au point dans le laboratoire (Dufresne *et al.*, 2005). La liaison du morpholino à l'ARNm cible a pour effet de bloquer la traduction de cet ARNm en créant un encombrement stérique du site d'initiation de la traduction du messager. Lors de nos expériences, nous avons pu constater que lorsque les cellules étaient traitées avec un MO anti-E-cadhérine, qui allait donc inhiber l'expression de E-cadhérine, non seulement le niveau d'expression de E-Cad mesuré par immunobuvardage de type Western était diminué de façon significative mais également



les niveaux de Cldn-1. Lors de l'expérience inverse, lorsque l'on traite des cellules avec des MO anti-Cldn-1, l'expression de Cldn-1 est diminuée mais pas celle d'E-Cad. Ce qui confirme le fait que ce sont les constituants de la jonction d'adhérence qui ont un effet sur la jonction serrée (West *et al.*, 2002 ; Miyoski et Takai, 2005). Ensuite, les cellules de l'épididyme ont été exposées à des MO pour différentes claudines et nous voulions évaluer l'effet sur les autres claudines. Mais les claudines semblent être régulées de façon indépendante les unes des autres. Cependant, la Cldn-4 pourrait avoir un rôle particulier dans l'épididyme si les cellules trouvent nécessaire de palier à sa baisse d'expression, telles que certaines claudines qui semblent avoir un rôle essentielle à jouer dans chaque organe par exemple dans le testicule où des souris déficientes en Cldn-11 sont infertiles (Gow, 1999) ou celles déficientes pour la Cldn-19 qui présentent des anomalies du système nerveux périphérique (Miyamoto *et al.*, 2005).

Ainsi, une exposition *in utero* au TBT entraîne d'importantes conséquences sur le développement du système reproducteur mâle induisant des effets, non seulement sur les organes qui le compose, les testicules, la prostate ventrale et l'épididyme, qui voyaient leur poids affectés mais aussi sur les spermatozoïdes. Cette période d'exposition est donc particulièrement importante pour un développement normal et fonctionnel du système reproducteur.

De plus, les jonctions cellulaires semblent être une cible du TBT, puisque dans la prostate autant que dans l'épididyme, suite à des expositions *in vivo*, ou *in vitro*, ce produit affecte les différents acteurs des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. Ce contaminant pourrait donc affecter la fonctionnalité des barrières du système reproducteur, ce qui expliquerait ses effets sur les spermatozoïdes.

Cette étude a permis de démontrer les conséquences d'une exposition *in utero* au TBT sur les individus mâle une fois l'âge adulte atteint et ainsi de mettre en évidence les effets rémanents du TBT. Elle a également permis de montrer que tous les organes ne sont pas atteints de la même façon par une exposition *in utero* au TBT. Ainsi ni le poids des testicules, ni de l'épididyme n'était affecté, pourtant la fonctionnalité de ces organes l'était. Par contre, la croissance de la prostate ventrale était sévèrement affectée par une exposition *in utero* au TBT, de même que son intégrité.

De surcroît, nous avons pu mettre en évidence le fait que les jonctions cellulaires étaient une cible pour le TBT. En effet, dans la prostate ventrale et dans l'épididyme, E-Cadhérine était sérieusement affectée suite à l'exposition au TBT, de même que la famille des claudines. Elles étaient affectées tant dans leur niveau d'expression que dans leur localisation. ZO-1 qui est un autre acteur des jonctions serrées était également atteint. De plus, l'étude de macro-réseaux aura permis de mettre en évidence d'autres familles de gènes qui seraient atteintes par le TBT, et permettrait d'envisager d'autres voies d'exploration pour expliquer les effets observés sur les spermatozoïdes et les barrières. Enfin nous aurons pu mettre en évidence la potentielle existence d'un phénomène de compensation dans l'épididyme entre Cldn-4 et Cldn-1. Ce qui laisserait penser que toutes les claudines ne jouent pas le même rôle dans la mise en place des jonctions serrées et surtout que certaines pourraient avoir un rôle particulier à jouer. Les claudines clés pour le développement de la barrière hémato-prostatique et hémato-épididymaire restent encore à déterminer.





## Références

- ABNEY T. O. 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. Steroids, vol. 64, no. 9, p. 610-617.
- ADAMALI 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. 17, no. 3, p. 208-222.
- ADAMALI H. I. , I. H. Somani, J. Q. Huang, R. A. Gravel, J. M. Trasler et L. Hermo. 1999. II. Characterization and development of the regional- and cellular-specific abnormalities in the epididymis of mice with beta-hexosaminidase A deficiency. Journal of Andrology, vol. 20, no. 6, p. 803-824.
- ADEEKO A., D. Li, D. S.Forsyth, V. Casey, G. M. Cooke, J. Barthelemy, D. G. Cyr, J.M. Trasler, B. Robaire et B.F. Hales. 2003. Effects of in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome. Toxicological Sciences, vol. 74, no. 2, p. 407-415.
- AKHONDI M. A., C. Chapple et H. D. Moore. 1997. Prolonged survival of human spermatozoa when co-incubated with epididymal cell cultures. Human Reproduction, vol. 12, no. 3, p. 514-522.
- AGARWAL A. et A. P. Hoffer. 1989. Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. Journal of Andrology, vol. 10, no. 6, p. 425-431.
- AKMAL K. M., J. M. Dufour et K. H. Kim. 1996. Region-specific localization of retinoic acid receptor-alpha expression in the rat epididymis. Biology of Reproduction, vol. 54, no. 5, p. 1111-1119.
- AMANN R. P. 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. Journal of Andrology, vol. 2, no. 1, p. 37-58.
- AMANN R. P. et Katz D. F. 2004. Reflections on CASA after 25 years. Journal of Andrology, vol. 25, no. 3, p. 317-325.
- 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, no. 8, p. 1319-1334.
- ANASTASIADIS P. Z. et A. B. Reynolds. 2001. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. Current Opinion in Cell Biology, vol. 13, no. 5, p. 604-610.
- ARAKI Y., K. Suzuki, R. J. Matusik, M. Obinata et M. C. Orgebin-Crist. 2002. Immortalized epididymal cell lines from transgenic mice overexpressing temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. Journal of Andrology, vol. 23, no. 6, p. 854-869.

ARENAS M. I., E. Romo, M. Royuela, B. Fraile et R. Paniagua. 2000. E-, N- and P-cadherin, and alpha-, beta- and gamma-catenin protein expression in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. Histochemistry Journal, vol. 32, no. 11, p. 659-667.

ARMSTRONG V. L., J. Clulow, R. N. Murdoch, R. C. Jones. 1994. Intracellular signal transduction mechanisms of rat epididymal spermatozoa and their relationship to motility and metabolism. Molecular Reproduction and Development, vol. 38, no. 1, p. 77-84.

ASHBY J. et P. A. Lefevre. 1997. The weanling male rat as an assay for endocrine disruption: preliminary observations. Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 26, no. 3, p. 330-337.

AUMULLER G., H. Renneberg, P. J. Schiemann, B. Wilhelm, J. Seitz, L. Konrad et G. Wennemuth. 1997. The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. Advances in Experimental Medecine and Biology, vol. 424, p. 193-219.

AVERAL H. I., A. Stanley, P. Murugaian, M. Palanisamy et M. A. Akbarsha. 1996. Specific effect of vincristine on epididymis. Indian Journal of Experimental Biology, vol. 34, no. 1, p. 53-56.

BAILEY S. K. et I. M. Davies. 1988. Tributyltin contamination in the Firth of Forth (1975-87). Science of the Total Environment, vol. 76, no. 2-3, p. 185-192.

BALDA M. S., L. Gonzalez-Mariscal, K. Matter, M. Cereijido et J. M. Anderson. 1993. Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. Journal of Cell Biology, vol. 123, no. 2, p. 293-302.

BALDA M. S. et K. Matter. 1998. Tight junctions. Journal of Cell Science, vol. 111, no. 5, p. 541-547.

BANERJEE S., P. P. Banerjee et B. R. Zirkin. 1993. Cell proliferation in the dorsal and lateral lobes of the rat prostate during postnatal development. Journal of Andrology, vol. 14, no. 5, p. 310-318.

BANERJEE P. P., S. Banerjee, K.I. Tilly, J. L. Tilly, T. R. Brown et B. R. Zirkin. 1995. Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. Endocrinology, vol. 136, no. 10, p. 4368-4376.

BEDFORD J. M. 1973. Components of sperm maturation in the human epididymis. Advances in the Biosciences, vol. 10, p. 145-155.

BEDFORD J. M. 1991. Effects of elevated temperature on the epididymis and testis: experimental studies. Advances in Experimental Medecine and Biology, vol. 286, p. 19-32.

BENNETT M. V., L. C. Barrio, T. A. Bargiello, D. C. Spray, E. Hertzberg et J. C. Saez. Gap junctions: new tools, new answers, new questions. Neuron, vol. 6, no. 3, p. 305-320.

BERGMANN M. et R. Dierichs. 1983. Postnatal formation of the blood-testis barrier in the rat with special reference to the initiation of meiosis. Anatomy and Embryology (Berlin), vol. 168, no. 2, p. 269-275.

BETTIN C., J. Oehlmann et E. Stroben. 1996. TBT-induced imposex in marine gastropods is mediated by an increasing androgen level. Helgolander Meeresunter, vol. 50, p. 299-317.

BEYER E. C., D. L. Paul et D. A. Goodenough. 1987. Connexin43: a protein from heart homologous to a gap junction protein from liver. Journal of Cell Biology, vol. 105, no. 6, Pt. 1, p. 2621-2629.

BLASCHUK O. W. et T. M. Rowlands. 2002. Plasma membrane components of adherens junctions. Molecular and Membrane Biology, vol. 19, p. 75-80.

BOMSEL M. et K. E. Mostov. 1991. Sorting of plasma membrane proteins in epithelial cells. Current Opinion in Cell Biology, vol. 3, p. 647-653.

BOURGUIBA S., S. Lambard et S. Carreau. 2003. Steroids control the aromatase gene expression in purified germ cells from the adult male rat. Journal of Molecular Endocrinology, vol. 31, no. 1, p. 83-94.

BOYER I. J. 1989. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. Toxicology, vol. 55, no. 3, p. 253-298.

BRAGA V. M. M. 2002. Cell-cell adhesion and signalling. Current Opinion in Cell Biology, vol. 14, p. 546-556.

BREVINI T.A., S. B. Zanetto et F. Cillo. 2005. Effects of endocrine disruptors on developmental and reproductive functions. Current Drug Targets. Immune Endocrine and Metabolic Disorders, vol. 5, no. 1, p. 1-10.

BRISSETTE J. L., N. M. Kumar, N. B. Gilula, J. E. Hall et G P. Dotto. 1994. Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America, vol. 91, p. 6453-6457.

BRITAN A., J. J. Lareyre, A. M. Lefrancois-Martinez, M. Manin, V. Schwaab, V. Greiffueille, P. Vernet et J. R. Drevet. 2004. Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 224, no. 1-2, p. 41-53.

BROOKS D. E. 1979. Influence of androgens on the weights of the male accessory reproductive organs and on the activities of mitochondrial enzymes in the epididymis of the rat. Journal of Endocrinology, vol. 82, no. 2, p. 293-303.

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

BRUEWER M., A. M. Hopkins, M. E. Hobert, A. Nusrat et J. L. Madara. 2004. RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. American Journal of Physiology. Cell Physiology, vol. 287, no. 2, p. C327-335.

BUZZARD J. J., J. R. Morrison, M. K. O'Bryan, Q. Song et N. G. Wreford. 2000. Developmental expression of thyroid hormones receptors in the rat testis. Biology of Reproduction, vol. 62, no. 3, p. 664-669.

BRUZZONE R., T. W. White et D. A. Goodenough. 1996. The cellular Internet: On-line with connexins. BioEssays, vol. 18, p. 709-718.

BUDUNOVA I. V. et G. M. Williams. 1994. Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. Cell Biology and Toxicology, vol. 10, p. 71-116.

BUSSEMAKERS M. J., R. J. van Moorselaar, L. A. Girolidi, T. Ichikawa, J. T. Isaacs, M. Takeichi, F. M. Debruyne et J. A. Schalken. 1992. Decreased expression of E-cadherin in the progression of rat prostatic cancer. Cancer Research, vol. 52, no. 10, p. 2916-2922.

BYERS S. W., S. Sujarit, B. Jegou, S. Butz, H. Hoschutzky, K. Herrenknecht, C. MacCalman et O. W. Blaschuk. 1994. Cadherins and cadherin-associated molecules in the developing and maturing rat testis. Endocrinology, vol. 134, no. 2, p. 630-639.

CANALE D., M. Agostini, G. Giorgilli, C. Caglieresi, G. Scartabelli, V. Nardini, E. A. Jannini, E. Martini, A. Pinchera et E. Macchia. 2001. Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. Journal of Andrology, vol. 22, no. 2, p. 284-288.

CARLSON E., A. Giwercman, N. Keiding et N. E. Skakkebaek. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years. BMJ, vol. 305, p. 609-613

CARR D. W. et T. S. Acott. 1984. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor. Biology of Reproduction, vol. 30, no. 4, p. 913-925.

CARREAU S. 2003. Estrogens--male hormones? Folia Histochemica Cytobiologica, vol. 41, no. 3, p. 107-111.



CEREIJIDO M., L. Shoshani et R. G. Contreras. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. American Journal of Physiology : Gastrointestinal and Liver Physiology, vol. 279, no. 3, p. G477-482.

CHATURAPANICH G., R. C. Jones et J. Clulow. 1992. Role of androgens in survival of spermatozoa in epididymis of tammar wallaby (*Macropus eugenii*). Journal of Reproduction and Fertility, vol. 95, no. 2, p. 421-429.

CHEN Y., Q. Lu, E. E. Schneeberger et DA Goodenough. 2000. Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. Molecular Biology of the Cell, vol. 11, no. 3, p. 849-862.

CHENG C.Y. et D. D. Mruk. 2002. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. Physiological Reviews, vol. 82, no. 4, p. 825-874.

CHEUNG K. H., G. P. Leung, M. C. Leung, W. W. Shum, W. L. Zhou et P. Y. Wong. 2005. Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. The Journal of General Physiology, vol. 125, no. 5, p. 443-454.

CITI S. 1993. The molecular organization of tight junctions. Journal of Cell Biology, vol. 121, no. 3, p. 485-489.

COOKE G.M. et B. Robaire. 1987. The mechanism of rat epididymal 4-ene steroid 5 alpha-reductase. Journal of Steroid Biochemistry, vol. 26, no. 3, p. 361-368.

COOKE G. M. 2002. Effect of organotins on human aromatase activity in vitro. Toxicology Letters, vol. 126, no. 2, p. 121-130.

COOKE G.M., H. Tryphonas, O. Pulido, D. Caldwell, G. S. Bondy, et D. Forsyth. 2004. Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part 1: Toxicology, histopathology and clinical chemistry. Food and Chemical Toxicology, vol. 42, no. 2, p. 211-220.

COOPER T. G. 1999. Epididymis. Encyclopedia of Reproduction, vol. 4 p. 602-609. San Diego : Academic Press.

COOPER T. G, C. H. Yeung, R. Jones, M. C. Orgebin-Crist et B. Robaire. 2002. Rebuttal of a role for the epididymis in sperm quality control by phagocytosis of defective sperm. Journal of Cell Science, vol. 115, no. 1, p. 5-7.

COOPER T. G et C. H. Yeung. 2003. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. Microscopy and Research Technique, vol. 61, no. 1, p. 28-38.

COOPER T. G. 2005. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? Human Reproduction, vol. 20, no. 1, p. 9-11.

COREY D. R. et J. M. Abrams. 2001. Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. Genome Biology, vol. 2, no. 5, p. 1015.

CORSINI E., B. Viviani, M. Marinovich et C. L. Galli. 1997. Role of mitochondria and calcium ions in tributyltin-induced gene regulatory pathways. Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 145, no. 1, p. 74-81.

CUASNICU P. S., D. J. Cohen, D. A. Ellerman, D. Busso, V. G. Da Ros et M. M. Morgenfeld. 2002. Changes in Sperm Proteins during Epididymal Maturation. The Epididymis : from Molecules to Clinical Practice, Ed. B. Robaire et B. T. Hinton. Plenum Publishers, New York. p. 389-404.

CUNHA G.R., A. A. Donjacour, P. S. Cooke, S. Mee, R. M. Bigsby, S. J. Higgins et Y. Sugimura. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. Endocrine Reviews, vol. 8, no. 3, p. 338-362.

CUNHA G. R., W. Ricke, A. Thomson, P. C. Marker, G. Risbridger, S. W. Hayward, Y. Z. Wang, A. A. Donjacour et T. Kurita. 2004. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. Journal of steroid biochemistry and molecular biology, vol. 92, no. 4, p. 221-236.

CYR D.G., O. W. Blaschuk et B. Robaire. 1992a. Identification and developmental regulation of cadherin messenger ribonucleic acids in the rat testis. Endocrinology, vol. 131, no. 1, 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 of epithelial cadherin in the rat epididymis. Endocrinology, vol. 130, no. 1, p. 353-363.

CYR D. G., B. Robaire et L. Hermo. 1995. Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. Microscopy Research and Technique, vol. 30, no. 1, p. 54-66.

CYR D.G., L. Hermo et D. W. Laird. 1996. Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. Endocrinology, vol. 137, no. 4, p. 1474-1484.

CYR D. G., L. Hermo, N. Egenberger, C. Mertineit, J. M. Trasler et D. W. Laird. 1999. Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. Endocrinology, vol. 140, no. 8, p. 3815-3825.

CYR D. G., J. Dufresne, S. Pillet, T. J. Alfieri et L. Hermo. 2001. Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. Journal of Andrology, vol. 22, no. 1, p. 124-135.

CYR D. G., J. Dufresne, K. W. Finnson et M. Gregory. 2002. Cellular interactions and the Blood-epididymal barrier. The Epididymis : from Molecules to Clinical Practice, Ed. B. Robaire et B. T. Hinton. Plenum Publishers, New York. p. 103-118.

DACHEUX J. L. et F. Dacheux. 2002. Proteins secretion in the epididymis. Dans : The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice. Kluwer, B. Robaire and B.T. Hinton, Editeurs. Academic/Plenum Publishers, New York, p. 151-168.

DACHEUX J. L., J. L. Gatti et F. Dacheux. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. Microscopy research and technique, vol. 61, no. 1, p. 7-17.

DACHEUX J. L., S. Castella, J. L. Gatti et F. Dacheux. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. Theriogenology, vol. 63, no. 2, p. 319-341.

DACHEUX J. L., M. Belghazi, Y. Lanson et F. Dacheux. 2006. Human epididymal secretome and proteome. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 250, no. 1-2, p. 36-42.

DADRAS S. S., X. Cai, I. Abasolo et Z. Wang. 2001. Inhibition of 5alpha-reductase in rat prostate reveals differential regulation of androgen-response gene expression by testosterone and dihydrotestosterone. Gene Expression, vol. 9, no. 4-5, p. 183-194.

DANZO B. J., S. N. Pavlou et H. L. Anthony. 1990. Hormonal regulation of androgen-binding protein in the rat. Endocrinology, vol. 127, no. 6, p. 2829-2838.

DAVIS M.A., R. C. Ireton et A. B. Reynolds. 2003. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. Journal of Cell Biology, vol. 163, no. 3, p. 525-534.

DeBELLEFEUILLE S., L. Hermo, M. Gregory, J. Dufresne et Cyr D.G. 2003. Catenins in the rat epididymis: their expression and regulation in adulthood and during postnatal development. Endocrinology, vol. 144, no. 11, p. 5040-5049.

DE GENDT K., J. V. Swinnen, P. T. Saunders, L. Schoonjans, M. Dewerchin, A. Devos, K. Tan, N. Atanassova, F. Claessens, C. Lecureuil, W. Heyns, P. Carmeliet, F. Guillou, R. M. Sharpe et G. Verhoeven. 2004. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America, vol. 101, p. 1327-1332.

DE GENDT K., N. Atanassova, K. A. Tan, L. R. de Franca, G. G. Parreira, C. McKinnell, R. M. Sharpe, P. T. Saunders, J. I. Mason, S. Hartung, R. Ivell, E. Denolet et G. Verhoeven. 2005. Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. Endocrinology, vol. 146, no. 9, p. 4117-4126.

DE KRESTER D. M. et J. B. Kerr. 1994. The cytology of the Testis. Physiology of Reproduction. Eds E. Knobil et J. Neill. New-York : Raven Press Ltd. p. 1177-1300.

DE KRETZER D. M et J. R. McFarlane. 1996. Inhibin in the male. Journal of Andrology, vol. 17, no. 3, p. 179-182.

DIERICH A., M. R. Sairam, L. Monaco, G. M. Fimia, A. Gansmuller, M. LeMeur et P. Sassone-Corsi. 1998. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A, vol. 95, no. 23, p. 13612-13617.

DODANE V. et B. Kachar. 1996. Identification of isoforms of G proteins and PKC that colocalize with tight junctions. The Journal of Membrane Biology, vol. 149, no. 3, p. 199-209.

DOERING D.D., S. Steckelbroeck, T. Doering et D. Klingmuller. 2002. Effects of butyltins on human 5 alpha-reductase type 1 and type 2 activity. Steroids, vol. 67, no. 10, p. 859-867.

DOMBROWICZ D., B. Sente, J. Closset et G. Hennen. 1992. Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. Endocrinology, vol. 130, no. 2, p. 695-700.

DOUGLAS W. H., L. Terracio, H. Glass. 1980. Isolation, culture and characterization of epithelial cells derived from rat ventral prostate. The Anatomical Record, vol. 197, no. 2, p. 239-256.

DREES F., S. Pokutta, S. Yamada, W. J. Nelson et and W. I. Weis. 2005.  $\alpha$ -Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin- $\beta$ -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. Cell, vol. 123, no. 5, p. 903-915.

DUFAURE J. P. et J. R. Drevet. 1998. La régulation de l'expression des gènes dans l'épididyme. Medecine/Science, vol. 14, p. 1392-1398.

DUFRESNE J., K. W. Finnon, M. Gregory et D. G. Cyr. 2003. Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. American Journal of Physiology : Cell Physiology, vol. 284, no. 1, p. C33-43.

DYM M. et D. W. Fawcett. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. Biology of Reproduction, vol. 3, no. 3, p. 308-326.

DYSON A. L. et M. C. Orgebin-Crist. 1973. Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. Endocrinology, vol. 93, no. 2, p. 391-402.

EBDON L., K. Evans K et S. Hill. 1989. The accumulation of organotins in adult and seed oysters from selected estuaries prior to the introduction of U.K. regulations governing

the use of tributyltin-based antifouling paints. Science of Total Environment, vol. 83, no. 1-2, p. 63-84.

EBERSPAECHER U., D. Roosterman, J. Kratzschmar, B. Haendler, U. F. Habenicht, A. Becker, C. Quensel, T. Petri, W. D. Schleuning et P. Donner. 1995. Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. Molecular Reproduction and Development, vol. 42, no. 2, p. 157-172.

EBNET K., A. Suzuki, S. Ohno et D. Vestweber. 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? Journal of Cell Science, vol. 117, no. 1, p. 19-29.

EDDY E. M. et D. E. O'Brien. 1994. The spermatozoon. The physiology of reproduction, p. 29-78. New York : Raven Press.

ELANGO VAN N., T. J. Chiou, W. F. Tzeng et S. T. Chu. 2006. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. Toxicology, vol. 222, no. 1-2, p. 60-70.

ELFGANG C. 1995. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. Journal of Cell Biology, vol. 129, p. 805-817.

EL-HAFY M., G. Pelletier, L. S. Hermo et F. Labrie. 2000. Unique features of the basal cells of human Prostate Epithelium. Microscopy Research and Technique, vol. 51, p. 436-446.

EMA M., R. Kurosaka, H. Amano et Y. Ogawa. 1995. Comparative developmental toxicity of butyltin trichloride, dibutyltin dichloride and tributyltin chloride in rats. Journal of Applied Toxicology, vol. 15, no. 4, p. 297-302.

EMA M., A. Harazono, E. Miyawaki et Y. Ogawa. 1997. Effect of the day of administration on the developmental toxicity of tributyltin chloride in rats. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 33, no. 1, p. 90-96.

ENVIRONNEMENT CANADA. 2002. Fiche informative sur les perturbateurs endocriniens. [http://www.ec.gc.ca/spse/fiche/spse\\_f.pdf](http://www.ec.gc.ca/spse/fiche/spse_f.pdf)

EVANS D.W. et R. B. Laughlin Jr .1984. Accumulation of bis(tributyltin) oxide by the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. Chemosphere, vol. 13, p. 213-219.

FAN X. et B. Robaire. 1998. Orchidectomy Induces a Wave of Apoptotic Cell Death in the Epididymis. Endocrinology, vol. 139, no. 4, p. 2128-2136.

FANNING A. S., 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. The Journal of Biological Chemistry, vol. 273, no. 45, p. 29745-29753.

- FARQUHAR M. G. et G. E. Palade. 1963. Junctional complexes in various epithelia. Journal of Cell Biology, vol. 17, p. 375-412.
- FENT K. 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. Critical Reviews in Toxicology, vol. 26, no. 1, p. 1-17.
- FISHER J. S., M.R. Millar, G.Majdic, PT Saunders, HM Fraser et R. M. Sharpe. 1997. Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood Journal of Endocrinology, vol. 153, no. 3, p. 485-495.
- FLICKINGER C. J. 1971. Ultrastructural observations on the postnatal development of the rat prostate. Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie, vol. 113, no. 2, p. 157-173.
- FLICKINGER C. J. 1972. The fine structure of the interstitial tissue of the rat prostate. American Journal of Anatomy, vol. 134, no. 1, p. 107-125.
- FLORIN A, M. Maire, A. Bozec, A. Hellani, S. Chater, R. Bars R, F. Chuzel et M. Benahmed. 2005. Androgens and postmeiotic germ cells regulate claudin-11 expression in rat Sertoli cells. Endocrinology, vol. 146, no. 3, p. 1532-1540.
- FORSYTH D. S. et V. Casey. 2003. Butyltin compounds in retail mollusc products. Food Additives and Contaminants, vol. 20, no. 5, p. 445-452.
- FORTEMPS E., G. Amand, A. Bomboir, R. Lawerys et E. C. Laterre. 1978. Trimethyltin poisoning. Report of two cases. International Archives in Occupational Environmental Health, vol. 41, no. 1, p. 1-6.
- FOUCHECOURT S., S. Metayer, A. Locatelli, F. Dacheux et J. L. Dacheux. 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. Biology of Reproduction, vol. 62, no. 6, p. 1790-1803.
- FRASER L. R., S. Adeoya-Osiguwa, R. W. Baxendale, S. Mededovic et O. O. Osiguwa. 2005. First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. Journal of Reproduction and Development, vol. 51, no. 1, p. 37-46.
- FRIEND D. S. et N. B. Gilula. 1972. Variations in tight junctions and gap junctions in mammalian tissues. Journal of Cell Biology, vol. 53, no. 3, p. 758-776.
- FUKATA M. et Kaibuchi K. 2001. Rho-family GTPases in cadherin mediated cell-cell adhesion. Nature Review in Molecular Cell Biology, vol. 2, no. 12, p. 887-897.
- FULMER B. R. et T. T. Turner. 2000. A blood-prostate barrier restricts cell and molecular movement across the rat ventral prostate epithelium. Journal of Urology, vol. 163, no. 5, p. 1591-1594.

FURUSE M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita et S. Tsukita. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. Journal of Cell Biology, vol. 123, no. 6, pt 2, p. 1777-1788.

FURUSE M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto et S. Tsukita. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. Journal of Cell Biology, vol. 141, no. 7, p. 1539-1550.

FURUSE M., H. Sasaki, K. Fujimoto et S. Tsukita. 1998b. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. Journal of Cell Biology, vol. 143, no. 2, p. 391-401.

GADEA J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. Theriogenology, vol. 63, no. 2, p. 431-444.

GAGNE F., C. Blaise, J. Pellerin, E. Pelletier, M. Douville, S. Gauthier-Clerc et L. Viglino. 2003. Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence river (Quebec, Canada). Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology: CBP, vol. 134, no. 2, p. 189-198.

GATTI J. L., S. Castella, F. Dacheux, H. Ecroyd, S. Metayer, V. Thimon et J. L. Dacheux. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. Animal Reproduction Science, vol. 82-83, p. 321-339.

GEFFARD O., H. Budzinski, S. Augagneur, M. N. Seaman et E. His. 2001. Assessment of sediment contamination by spermioxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 20, no. 7, p. 1605-1611.

GEIGER B. et O. Ayalon. 1992. Cadherins. Annual Review of Cell Biology, vol. 8, p. 307-332.

GEORGE F. W., D. W. Russell et J. D. Wilson. 1991. Feed-forward control of prostate growth: dihydrotestosterone induces expression of its own biosynthetic enzyme, steroid 5 alpha-reductase. Proceedings of the National Academy of Science United States of America, vol. 88, no. 18, p. 8044-8047.

GHYSELINCK N. B., I. Dufaure, J. J. Lareyre, N. Rigaudiere, M. G. Mattei et J. P. Dufaure. 1993. Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. Molecular Endocrinology, vol. 7, no. 2, p. 258-272.

GIBBS P. E. et G. W. Bryan. 1986. Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella Lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom, vol. 66, p. 767-777.

GIROLDI L. A. et J. A. Schalken. 1993. Decreased expression of the intercellular adhesion molecule E-cadherin in prostate cancer: biological significance and clinical implications. Cancer Metastasis Reviews, vol. 12, no. 1, p. 29-37.

GONZALES G. F. 1989. Functional structure and ultrastructure of seminal vesicles. Archives of Andrology, vol. 22, p. 1-13.

GONZALES G. F. 1994. Test for androgen activity at the male reproductive tract in infertile men. Archives of Andrology, vol. 32, p. 235-242.

GOODENOUGH D. A., J. A. Goliger et D. L. Paul. 1996. Connexins, connexons and intercellular communication. Annual Reviews in Biochemistry, vol. 65, p. 475-502.

GOODING M. P. et G. A. Le Blanc. 2001. Biotransformation and Disposition of Testosterone in the Eastern Mud Snail *Ilyanassa obsoleta*. General and Comparative Endocrinology, vol. 122, no. 2, p. 172-180.

GOODWIN M., E. M. Kovacs, M. A. Thoreson, A. B. Reynolds et A. S. Yap. 2003. Minimal mutation of the cytoplasmic tail inhibits the ability of E-cadherin to activate Rac but not phosphatidylinositol 3-kinase: direct evidence of a role for cadherin-activated Rac signaling in adhesion and contact formation. The Journal of Biological Chemistry, vol. 278, no. 23, p. 20533-20539.

GOW A., C. M. Southwood, J. S. Li, M. Pariali, G. P. Riordan, S. E. Brodie, J. Danias, J. M. Bronstein, B. Kachar et R. A. Lazzarini. 1999. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. Cell, vol. 99, no. 6, p. 649-659.

GRAFF J.R., J. G. Herman, R. G. Lapidus, H. Chopra, R. Xu, D. F. Jarrard, W.B. Issacs, P. M. PITHA, N. E. Davidson et S. B. Baylin. 1995. E-cadherin expression is silenced by DNA Hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. Cancer research, vol. 55, no. 22, p. 5195-5199.

GRAY L. E. Jr. 1998. Xenoendocrine disrupters: laboratory studies on male reproductive effects. Toxicology Letters, vol. 102-103, p. 331-335.

GREGORY M., J. Dufresne, L. Hermo et D. G. Cyr. 2001. Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. Endocrinology, vol. 142, no. 2, p. 854-863.

GREGORY M. et D. G. Cyr. 2006. Identification of multiple claudins in the rat epididymis. Molecular Reproduction and Development, vol. 73, no. 5, p. 580-588.

GRETZER M. B. et A. W. Partin. 2003. PSA markers in prostate cancer detection. The Urologic Clinics of North America, vol. 30, no. 4, p. 677-686.

GRIZARD G. et C. Jimenez. 1997. Les examens du sperme dans l'exploration de la fertilité masculine. Progrès en Urologie, vol. 7, p. 496-504.



- GROTE K., B. Stahlschmidt, C. E. Talsness, C. Gericke, K. E. Appel et I. Chahoud. 2004. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. Toxicology, vol. 202, no. 3, p. 145-158.
- GUMBINER B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell, vol. 84, no. 3, p. 345-357.
- GUMBINER B. M. 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. Journal of Cell Biology, vol. 148, no. 3, p. 399-404.
- GURAYA S. S. 1980. Recent progress in the morphology, histochemistry, biochemistry, and physiology of developing and maturing mammalian testis. International Review of Cytology, vol. 62, p. 187-309.
- GYE M. C. 2003. Expression of claudin-1 in mouse testis. Archives of Andrology, vol. 49, no. 4, p. 271-279.
- HABERMANN H., W. Y. Chang, L. Birch, P. Mehta et G. S. Prins. 2001. Developmental exposure to estrogens alters epithelial cell adhesion and gap junction proteins in the adult rat prostate. Endocrinology, 142, no. 1, p. 359-369.
- HABERMANN H., V. Ray, W. Habermann et G. S. Prins. 2002. Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. Journal of Urology, vol. 167, no. 2, pt. 1, p. 655-660.
- HANAHAN D. et R. A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. Cell, vol. 100, no. 1, p. 57-70.
- HARA K., M. Yoshizuka, Y. Doi et S. Fujimoto. 1994. Effect of bis (tributyl tin) oxide on permeability of the blood-brain barrier: a transient increase. Occupational and Environmental Medicine, vol. 51, p. 735-738.
- HARAZONO A., M. Ema et Y. Ogawa. 1996. Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. Toxicology Letters, vol. 89, no. 3, p. 185-190.
- HARINO H., M. Fukushima et S. Kawai. 2000. Accumulation of butyltin and phenyltin compounds in various fish species. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 39, no. 1, p. 13-19.
- HARKONEN P. L. et S. I. Makela. 2004. Role of estrogens in development of prostate cancer. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 92, no. 4, p.297-305.
- HATZFELD M. 1999. The armadillo family of structural proteins. International Review of Cytology, vol. 186, p. 179-224.

- HAYASHI N., Y. Sugimura, J. Kawamura, A. A. Donjacour et G.R. Cunha. 1991. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. Biology of Reproduction, vol. 45, p. 308-321.
- HAZAN R. B., L. Kang, B. P. Whooley et P. I. Borgen. 1997. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. Cell Adhesion and Communication, vol. 4, no. 6, p. 399-411.
- HECKERT L. L. et M. D. Griswold. 2002. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. Recent Progress in Hormone Research, vol. 57, p. 129-148.
- HEIDRICH D. D., S. Steckelbroeck S et D. Klingmuller. 2001. Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. Steroids, vol. 66, no. 10, p. 763-769.
- HENDERSON N. A., G. M. Cooke et B. Robaire. 2004. Effects of PNU157706, a dual 5alpha-reductase inhibitor, on gene expression in the rat epididymis. The Journal of Endocrinology, vol. 181, no. 2, p. 245-261.
- HENDERSON N. A. et B. Robaire B. 2005. Effects of PNU157706, a dual 5alpha-reductase inhibitor, on rat epididymal sperm maturation and fertility. Biology of Reproduction, vol. 72, no. 2, p. 436-443.
- HERMO L., J. Dworkin et R. Oko. 1988. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. The American Journal of Anatomy, vol. 183, no. 2, p. 107-124.
- HERMO L., K. Barin et B. Robaire. 1992. Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. The Anatomical Record, vol. 233, no. 2, p. 205-228.
- HERMO L., R. Oko et B. Robaire. 1992b. Epithelial cells of the epididymis show regional variations with respect to the secretion of endocytosis of immobilin as revealed by light and electron microscope immunocytochemistry. The Anatomical Record, vol. 232, no. 2, p. 202-220.
- HERMO L., R. Oko et C. R. Morales. 1994. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. International review of cytology, vol. 154, p. 106-189.
- HERMO L., K. Barin et R. Oko. 1994b. Developmental expression of immobilin in the rat epididymis. The Anatomical Record, vol. 240, no. 1, p. 86-103.
- HERMO L. 1995. Structural features and functions of principal cells of the intermediate zone of the epididymis of adult rats. The Anatomical Record, vol. 242, no. 4, p. 515-530.

HERMO L. et S. Papp. 1996. Effects of ligation, orchidectomy, and hypophysectomy on expression of the Yf subunit of GST-P in principal and basal cells of the adult rat epididymis and on basal cell shape and overall arrangement. The Anatomical record, vol. 244, no. 1, p. 59-69.

HERMO L. et Clermont Y. 1998. How are germ cells produced and what factors control their production? Handbook of Andrology, p. 13-15. San Francisco: American Society of Andrology.

HERMO L., M. Lustig, S. Lefrancois, W. S. Argraves et C. R. Morales. 1999. Expression and regulation of LRP-2/megalin in epithelial cells lining the efferent ducts and epididymis during postnatal development. Molecular Reproduction and Development, vol. 53, no. 3, p. 282-293.

HERMO L., H. I. Adamali et S. Andonian. 2000. Immunolocalization of CA II and H<sup>+</sup> V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. Journal of Andrology, vol. 21, no. 3, p. 376-391.

HERMO L., S. Xiaohong et C. R. Morales. 2000b. Circulating and luminal testicular factors affect LRP-2 and Apo J expression in the epididymis following efferent duct ligation. Journal of Andrology, vol. 21, no. 1, p. 122-144.

HERMO L. et B. Robaire. 2002. Epididymal Cell Types and their functions. The Epididymis, from Molecules to Clinical Practice, p. 81-102. New York : Kluwer Academics/Plenum Publishers.

HERMO L. et D. Jacks. 2002. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. Molecular Reproduction and Development, vol. 63, no. 3, p. 394-410.

HERMO L. et S. Andonian. 2003. Regulation of sulfated glycoprotein-1 and cathepsin D expression in adult rat epididymis. Journal of Andrology, vol. 24, no. 3, p. 408-422.

HESS R. A., D. H. Gist, D. Bunick, D. B. Lubahn, A. Farrell, J. Bahr, P. S. Cooke et G. L. Greene. 1997a. Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. Journal of Andrology, vol. 18, no. 6, p. 602-611.

HESS R. A., D. Bunick, K. H. Lee, J. Bahr, J. A. Taylor, K. S. Korach et D. B. Lubahn. 1997b. A role for oestrogens in the male reproductive system. Nature, vol. 390, no. 6659, p. 509-512.

HESS R. A., D. Bunick, D. B. 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, no. 1, p. 107-121.

HESS R. A. 2002. The efferent ductules: structure and functions. The Epididymis, from Molecules to Clinical Practice, p. 49-80. New York : Kluwer Academics/Plenum Publishers.

HIGGINS S. J. et J. M. Burchell. 1978. Effects of testosterone on messenger ribonucleic acid and protein synthesis in rat seminal vesicle. Biochemistry Journal, vol. 174, p. 543-551.

HILLER-STURMHOFEL S. et A. Bartke. 1998. The endocrine system: an overview. Alcohol Health and Research World, vol. 22, no. 3, p. 153-164.

HINCK L., W. J. Nelson et J. Papkoff. 1994. Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. Journal of Cell Biology, vol. 124, no. 5, p. 729-741.

HORAN A. H. et J. M. Bedford. 1972. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian hamster. Journal of Reproduction, vol. 30, p. 417-423.

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, no. 4, p. 991-1004.

HOLSBERGER D. R., S. E. Kiesewetter et P. S. Cooke. 2005. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha1. Biology of Reproduction, vol. 73, no. 3, p. 396-403.

HOLSTEIN A. F., W. Schulze et M. Davidoff. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reproductive Biology and Endocrinology, vol. 14, no. 1, p. 107-122.

HOLDCRAFT R. W. et R. E. Braun. 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. International Journal of Andrology, vol. 27, no. 6, p. 335-342.

HONECKER F., A. M. Kersemaekers, M. Molier, P. C. Van Weeren, H. Stoop, R. R. De Krijger, K. P. Wolffenbuttel, W. Oosterhuis, C. Bokemeyer et L. H. Looijenga. 2004. Involvement of E-cadherin and beta-catenin in germ cell tumours and in normal male fetal germ cell development. The Journal of Pathology, vol. 204, no. 2, p. 167-174.

HORIMOTO M., Y. Isobe, Y. Isogai et M. Tachibana. 2000. Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monoethyl ether sulfasalazine, and 2,5-hexandione. Reproductive Toxicology, vol. 14, no. 1, p. 55-63.

HOUGHTON F. D. 2005. Role of gap junctions during early embryo development. Reproduction, vol. 129, no. 2, p. 129-135.

HUANG R. P., M. Z. Hossain, R. Huang, J. Gano, Y. Fan et A. L. Boynton. 2001. Connexin 43 (cx43) enhances chemotherapy-induced apoptosis in human glioblastoma cells. International Journal of Cancer, vol.92, no. 1, p. 130-138.

HUBER A. H. et W. I. Weis. 2001. The structure of the beta-catenin-E-Cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. Cell, vol. 105, p. 391-402.

HUGHES I. A., H. Martin et J. Jaaskelainen. 2006. Genetic mechanisms of fetal male undermasculinization: a background to the role of endocrine disruptors. Environmental Research, vol. 100, no. 1, p. 44-49.

HUYNH H. T., L. Alpert, D. W. Laird, G. Batist, L. Chalifour et M. A. Alaoui-Jamali. 2001. Regulation of the gap junction connexin 43 gene by androgens in the prostate. Journal of Molecular Endocrinology, vol. 26, p. 1-10.

IAMMARRONE E., R. Balet, A. M. Lower, C. Gillott et J. G. Grudzinskas. 2003. Male infertility. Best Practice & Research. Clinical Obstetric & Gynaecology, vol. 17, no. 2, p. 211-229.

IATROPOULOS M. J. 1994. Endocrine considerations in toxicologic pathology. Experimental and Toxicologic Pathology, vol. 45, no. 7, p. 391-410.

IGNATIUS P. T. 1996. Regulated Assembly of Connexin33 and Connexin43 into Rat Sertoli Cell Gap Junction. Biology of Reproduction, vol. 54, p. 1300-1310.

IKENOUCHI J., M.Furuse, K.Furuse, H. Sasaki, S. Tsukita et S. Tsukita. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. Journal of Cell Biology, vol. 171, no. 6, p. 939-945.

IMAMURA Y., M. Itoh, Y. Maeno, S. Tsukita et A. Nagafuchi. 1999. Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. Journal of Cell Biology, vol. 144, no. 6, p. 1311-1322.

INANO H., A. Machino et B. Tamaoki. 1969. In vitro metabolism of steroid hormones by cell-free homogenates of epididymides of adult rats. Endocrinology, vol. 84, no. 5, p. 997-1003.

IRANO S., S. T. Suzuki et C. Redies. 2003. The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. Frontiers in Bioscience, vol. 8, p. d306-355.

IRETON R. C., M. A. Davis, J. van Hengel, D. J. Mariner, K. Barnes, M. A. Thoreson, P. Z. Anastasiadis, L. Matrisian, L. M. Bundy, L. Sealy, B. Gilbert, F. van Roy et A. B. Reynolds. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. The Journal of Cell Biology, vol. 159, no. 3, p. 465-476.

IRVINE D. S. 1994. Falling sperm quality. *BMJ*, vol. 309, no. 6952, p. 476.

ISAACS J. T. 1987. Control of cell proliferation and cell death in the normal and neoplastic prostate: a stem cell model. In *Benign Prostatic Hyperplasia*. Dans NIH publication #87-2881, p. 85-94. Eds CH Rodgers, DS Coffey, G Cunha, JT Greyhack, F Hinman Jr & R Norton. Washington DC: US Department of Health and Human Services.

ISHIDO M., M. Morita, S. Oka, Y. Masuo. 2005. Alteration of gene expression of G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats. *Regulatory Peptides.*, vol. 126, no. 1-2, p. 145-153.

ITOH M., S. Yonemura, A. Nagafuchi, S. Tsukita et S. Tsukita. 1991. A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *Journal of Cell Biology*, vol. 115, no. 5, 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. *Journal of Cell Biology*, vol. 121, no. 3, p. 491-502.

ITOH M., A. Nagafuchi, S. Moroi et S. Tsukita. 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *Journal of Cell Biology*, vol. 138, no. 1, p. 181-192.

ITOH M., H. Sasaki, M. Furuse, H. Ozaki, T. Kita et S. Tsukita. 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *Journal of Cell Biology*, vol. 154, no. 3, p. 491-497.

IWAI H., O. Wada et Y. Arakawa. 1981. Determination of tri-, di-, and mono-butyltin and inorganic tin in biological materials and some aspects of their metabolism in rats. *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 5, no. 6, p. 300-306.

JABBOUR H. N., L. A. Clarke, A. S. McNeilly, M. Edery et P. A. Kelly. 1998. Is prolactin a gonadotrophic hormone in red deer (*Cervus elaphus*)? Pattern of expression of the prolactin receptor gene in the testis and epididymis. *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 20, no. 2, p.175-182.

JAFFER Z. M. et J. Chernoff. 2004. The Cross-Rho'ods of Cell-Cell Adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 34, p. 35123-35126.

JAGGI M., S. L. Johansson, J. J. Baker, L. M. Smith, A. Galich et K. C. Balaji. 2005. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urologic Oncology*, vol. 23, no. 6, p. 402-406.

JALKANEN J., I. Huhtaniemi et M. Poutanen. 2005. Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the Crisp family exclusively expressed in the

epididymis in an androgen-dependent manner. Biology of Reproduction, vol. 72, no. 5, p. 1268-1274.

JAMORA C. et E. Fuchs. 2002. Intercellular adhesion, signaling and the cytoskeleton. Nature Cell Biology, vol. 4, p. 101-108.

JANULIS L., J. M. Bahr, R. A. Hess, S. Janssen, Y. Osawa et D. Bunick. 1998. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. Journal of Andrology, vol. 19, no. 1, 65-71.

JANULIS L. et C. Lee. 1999. The prostate gland. Encyclopedia of Reproduction, vol. 4 p. 77-85. San Diego : Academic Press.

JARRED R. A., B. Cancilla, G. S. Prins, K. A. Thayer, G. R. Cunha et G. P. Risbridger. 2000. Evidence That Estrogens Directly Alter Androgens Regulated Prostate Development. Endocrinology, vol. 141, no. 9, p. 3471-3477.

JOHNSON L., G. U. Falk et G. E. Spode. 1999a. Male reproductive systems, nonhuman mammals. Encyclopedia of Reproduction, vol. 3 p. 49-60. San Diego : Academic Press.

JOHNSON L., T. A. McGowen et G. E. Keillor. 1999b. Testis, Overview. Encyclopedia of Reproduction, vol. 4, p. 769-783. San Diego : Academic Press.

JOHNSON K. J., S. R. Patel et K. Boekelheide. 2000. Multiple cadherin superfamily members with unique expression profiles are produced in rat testis. Endocrinology, vol. 141, no. 2, p. 675-683.

JONES R. C. 1999. To store or mature spermatozoa ? The primary role of the epididymis. International Journal of Andrology, vol. 22, no. 2, p. 57-67.

JONES R. 2004. Sperm survival versus degradation in the Mammalian epididymis: a hypothesis. Biology of Reproduction, vol. 71, no. 5, p. 1405-1411.

JOU T. S., E. E. Schneeberger et W. J. Nelson. 1998. Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. Journal of Cell Biology, vol. 142, no. 1, p. 101-115.

JOUANNET P., C. Wang, F. Eustache, T. Kold-Jensen et J. Auger. 2001. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. APMIS, vol. 109, no. 5, p. 333-344

JUNG-TESTAS I., M. T. Groyer, J. Bruner-Lorand, O. Hechter, E. E. Baulieu et P. Robel. 1981. Androgen and estrogen receptors in rat ventral prostate epithelium and stroma. Endocrinology, vol. 109, no. 4, p. 1287-9.

JUNGHANS D., I. G. Haas et R. Kemler. 2005. Mammalian cadherins and protocadherins: about cell death, synapses and processing. Current Opinion in Cell Biology, vol. 17, no. 5, p. 446-452.

KACHAR B. et P. Pinto da Silva. 1981. Rapid massive assembly of tight junctions strands. Science, vol. 213, no. 4507, p. 541-544.

KANNAN K., S. Tanabe, H. Iwata et R. Tatsukawa. 1995a. Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain Asian and Oceanian countries. Environmental Pollution, vol. 90, no. 3, p. 279-290.

KANNAN K., S. Tanabe, R. Tatsukawa et R. J. Williams. 1995b. Butyltin residues in fish from Australia, Papua New Guinea and the Solomon Islands. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, vol. 61, p. 263-273.

KANNAN K., S. Corsolini, S. Focardi, S. Tanabe et R. Tatsukawa. 1996. Accumulation pattern of butyltin compounds in dolphin, tuna, and shark collected from Italian coastal waters. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 31, no. 1, p. 19-23.

KANNAN K. et J. Falandysz. 1997. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissues for Polish Coast of the Baltic Sea. Marine Pollution Bulletin, vol. 34, no. 3, p. 203-207.

KANNAN K., K. Senthilkumar, J. E. Elliott, L. A. Feyk et J. P. Giesy. 1998. Occurrence of butyltin compounds in tissues of water birds and seaducks from the united states and Canada. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 35, no. 1, p. 64-69.

KANNAN K., R. A. Grove, K. Senthilkumar, C. J. Henny et J. P. Giesy. 1999. Butyltin compounds in river otters (*Lutra canadensis*) from the northwestern United States. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 36, no. 4, p. 62-68.

KARKUN T., M. Rajalakshmi et M. R. Prasad. 1974. Maintenance of the epididymis in the castrated golden hamster by testosterone and dihydrotestosterone. Contraception, vol. 9, p. 471-485.

KEIDING N., A. Giwercman, E. Carlsen et N. E. Skakkebaek. 1994. Falling sperm quality. BMJ, vol. 309, no. 6947, p. 131.

KEMLER R. 1992. Classical cadherins. Seminar in Cell Biology, vol. 3, no. 3, p. 149-155.

KEMLER R. 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. Trends in Genetics, vol. 9, p. 317-321.

KIERSZENBAUM A. L., O. Lea, P. Petrusz, F. S. French et L. L. Tres. 1981. Isolation, culture, and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from



pubertal and adult rats. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, vol. 78, p. 1675–1679.

KIRCHHOFF C., C. Osterhoff et L Young. 1996. Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. Biology of Reproduction, vol. 54, no. 4, p. 847-856.

KIRCHHOFF C. 2002. Specific gene expression in the human and non-human primate epididymis. The Epididymis, from Molecules to Clinical Practice, p. 201-218. New York : Kluwer Academics/Plenum Publishers.

KIRCHHOFF C, Y. Araki, I. Huhtaniemi, R. J. Matusik, C. Osterhoff, M. Poutanen, A. Samalecos, P. Sipila, K. Suzuki et M. C. Orgebin-Crist. 2004. Immortalization by large T-antigen of the adult epididymal duct epithelium. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 216, no. 1-2, p. 83-94.

KLINFELTER G. R., R. P. Amann et R. H. Hammerstedt. 1982. Culture of principal cells from the rat caput epididymidis. Biology of Reproduction, vol. 26, p. 885–901.

KLINFELTER G. R., J. W. Laskey, J. Ferrell, J. D. Suarez et N. L. Roberts. Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants. Journal of Andrology, vol. 18, no. 2, p. 139-150.

KNUST E. et O. Bossinger. 2002. Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. Science, vol. 298, no. 5600, p. 1955-1959.

KO D. C., J. Binkley, A. Sidow et M. P. Scott. 2003. The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A, vol. 100, p. 2518–2525.

KOBAYASHI T, B. Storrie, K. Simons, C. G. Dotti. 1993. A functional barrier to movement of lipids in polarized neurons. Nature, vol. 359, no. 6396, p. 647-650.

KOBIELAK A. et E. Fuchs. 2004.  $\alpha$ -catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. Nature Review in Molecular Cell Biology, vol. 5, p. 614–625.

KOWALCZYK A. P. et AB Reynolds. 2004. Protecting your tail: regulation of cadherin degradation by p120-catenin. Current Opinion in Cell Biology, vol. 16, no. 5, p. 522-527.

KRAJNC E. I., P.W. Wester, J. G. Loeber, F. X. van Leeuwen, J. G. Vos, H. A. Vaessen et C. A. van der Heidjen . 1984. Toxicity of bis (tri-n-butyltin) oxide in the rat, Short-term effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid systems. Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 30, p. 363-386.

KREGE J. H., J. B. Hodgins, J. F. Couse, E. Enmark, M. Warner, J. F. Mahler, M. Sar, K. S. Korach, J. A. Gustafsson et O. Smithies. 1998. Generation and reproductive phenotypes

of mice lacking estrogen receptor beta. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 95, p. 15677-15682.

KUEFER R., M. D. Hofer, C. S. Zorn, O. Engel, B. G. Volkmer, M. A. Juarez-Brito, M. Eggel, J. E. Gschwend, M. A. Rubin et M. L. Day. 2005. Assessment of a fragment of e-cadherin as a serum biomarker with predictive value for prostate cancer. British Journal of Cancer, vol. 92, no. 11, p. 2018-2023.

KUMAR V. L. et P. K. Majumder. 1995. Prostate Gland: Structure, functions and regulation. International Urology and Nephrology, vol. 27, no. 3, p. 231-243.

KUMAR T. R., Y. Wang, N. Lu et M. M. Matzuk. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. Nature Genetics, vol. 15, p. 201-204.

KWONG J, H. L. Choi, Y. Huang et F. L. Chan. 1999. Ultrastructural and biochemical observations on the early changes in apoptotic epithelial cells of the rat prostate induced by castration. Cell Tissue Research, vol. 298, no. 1, p. 123-136.

LAKOSKI K.A., C. P. Carron, C.L. Cabot et P. M. Saling. 1988. Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. Biology of Reproduction, vol. 38, p. 221-233.

LAMBARD S, I. Galeraud-Denis, H. Bouraima, S. Bourguiba, A. Chocat et S. Carreau. 2003. Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. Molecular Human Reproduction, vol. 9, no. 3, p. 117-124.

LARUE L., M. Ohsugi, J. Hirchenhain et R. Kemler. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A, vol. 91, no. 17, p. 8263-8267.

LAUF U., B. N. Giepmans, P. Lopez, S. Bracconnot, S. C. Chen et M. M. Falk. 2002. Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America, vol. 99, p. 10446-10451.

LAUGHLIN R. B. Jr, W. French et H. E. Guard. 1986. Accumulation of bis (tributyltin) oxide by the marine mussel *Mytilus edulis*. Environmental Science and Technology, vol. 20, no. 9, p. 884-890.

LEE C., J. M. Kozlowski et J. T. Grayhack. 1997. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. Prostate, vol. 31, p. 131-138.

LEE K. H., R. A. Hess, J. M. Bahr, D. B. Lubahn, J. Taylor et D. Bunick. 2000. Estrogen receptor alpha has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. Biology of Reproduction, vol. 63, p. 1873-1880.

LEE N. P., D. Mruk, W. M. Lee et C. Y. Cheng. 2003. Is the cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis? Biology of Reproduction, vol. 68, no. 2, p.489-508.

LEFFERS H., V. M. Navarro, J. E. Nielsen, A. Mayen, L. Pinilla, M. Dalgaard, M. M. Malagon, J. P. Castano, N. E. Skakkebaek, E. Aguilar et M. Tena-Sempere. Increased expression of alpha- and beta-globin mRNAs at the pituitary following exposure to estrogen during the critical period of neonatal sex differentiation in the rat. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 99, no. 1, p. 33-43.

LEGARE C., N. Verville et R. Sullivan. 2004. Vasectomy influences expression of HE1 but not HE2 and HE5 genes in human epididymis. Journal of Andrology, vol. 25, no. 1, p. 30-43.

LEI Z. M., S. Mishra, W. Zou, B. Xu, M Foltz, X. Li et C. V. Rao. 2001. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. Molecular Endocrinology, vol. 15, p. 184-200.

LEROY-MARTIN B., M. Bouhdiba, J. P. Peyrat, et P. Saint Pol. 1989. Peripheral effects of prolactin in reproductive function. I. Male reproductive function. Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction, vol. 18, no. 1, p. 39-45.

LEVY I. G., N. A. Iscoe et L. H. Klotz. 1998. Prostate cancer: 1. The descriptive epidemiology in Canada. Canadian Medical Association Journal, vol. 159, no. 5, p. 509-513.

LEWIS B. et R. J. Aitken. 2001. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. Biology of Reproduction, vol. 64, no. 5, p. 1545-1556.

LI J. C., D. Mruk et Y. Cheng CY. 2001. The inter-Sertoli tight junction permeability barrier is regulated by the interplay of protein phosphatases and kinases: an in vitro study. Journal of Andrology, vol. 22, no. 5, p. 847-856.

LI P., H. C. Chan, B. He, S. C. So, Y. W. Chung, Q. Shang, Y. D. Zhang et Y. L. Zhang. 2001. An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. Science, vol. 291, p. 1783-1785.

LIU L., J. Zhang, S. Bates, J. J. Li, D. M. Peehl, J. S. Rhim et G. P. Pfeifer. 2005. A methylation profile of in vitro immortalized human cell lines. International Journal of Oncology, vol. 26, no. 1, p. 275-85.

LO C. W. 1999. Genes, gene knockouts, and mutations in the analysis of gap junctions. Developmental Genetics, vol. 24, no. 1-2, p. 1-4.

LOEWENSTEIN W. R. et Kanno Y. 1966. Intercellular communication and the control of tissue growth : lack of communication between cancer cells. Nature, vol. 209, p. 1248-1249.

LOMBARDO F., P. Sgro, P. Salacone, B. Gilio, L. Gandini, F. Dondero, E. A. Jannini et A. Lenzi. 2005. Androgens and fertility. Journal of Endocrinological Investigation, vol. 28, no. 3 Suppl., p. 51-55.

LONG H., C. D. Crean, W. H. Lee, O. W. Cummings et T. G. Gabig. 2001. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. Cancer Research, vol. 61, no. 21, p. 878-881.

LU Q, L. J. Dobbs, C. W. Gregory, G. W. Lanford, M. P. Revelo, S. Shappell et Y. H. Chen. 2005. Increased expression of delta-catenin/neural plakophilin-related armadillo protein is associated with the down-regulation and redistribution of E-cadherin and p120ctn in human prostate cancer. Human Pathology, vol. 36, no. 10, p. 1037-1048.

LUBAHN D. B., J. S. Moyer, T. S. Golding, J. F. Couse, K. S. Korach et O. Smithies. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 90, p. 11162–11166.

LYE R. J. et B. T. Hinton. 2000. Transgenic technologies for the study of epididymal function. Asian Journal of Andrology, vol. 2, no. 1, p. 33-38.

MAHENDROO M. S., K. M. Cala, D. L. Hess et D. W. Russell. 2001. Unexpected virilization in male mice lacking steroid 5alpha-reductase enzymes. Endocrinology, vol. 142, p.4652–4662.

MARAN R. R. et M. M. Aruldas. 2002. Adverse effects of neonatal hypothyroidism on Wistar rat spermatogenesis. Endocrine Research, vol. 28, no. 3, p. 141-154.

MARTIN-DeLEON P. A. 2006. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 250, p. 114-121.

MARTIN-PADURA I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons et E. Dejana. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. Journal of Cell Biology, vol. 142, no. 1, p. 117-127.

MARTINEZ-PALOMO A., I. Meza, G. Beaty, et M. Cerejido. 1980. Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. Journal of Cell Biology, vol. 87, no. 3, pt. 1, p. 736-745.

MATTER K. et M. S. Balda. 2003. Signalling to and from tight junctions. Nature Reviews in Molecular Cell Biology, vol. 4, no. 3, p. 225-236.

MATTMUELLER D. R. et B. T. Hinton. 1991. In vivo secretion and association of clusterin (SGP-2) in luminal fluid with spermatozoa in the rat testis and epididymis. Molecular Reproduction and Development, vol. 30, no.1, p. 62-69.

McDAVID K., J. Lee, J. P. Fulton, J. Tonita et T. D. Thompson. 2004. Prostate cancer incidence and mortality rates and trends in the United States and Canada. Public Health Report (Washington D. C.), vol. 119, no. 2, p. 174-186.

McLACHLAN R. I., N. G. Wreford, L. O'Donnell, D. M. deKrester et D. M. Robertson. 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: Independent roles for testosterone and FSH. Journal of Endocrinology, vol. 148, p. 1-9.

McNEAL J. E. 1988. Normal histology of the prostate. Amerian Journal of Surgical Pathology, vol. 12, no. 8, 619-633.

McNEAL J. E., A. A. Villers, EA Redwine, FS Freiha et TA Stamey. 1990. Capsular penetration in prostate cancer: significance for natural history and treatment. American Journal of Surgical Pathology, vol. 14, p. 240-247.

MEDA P., M. Pepper, O. Traub, K. Willecke, D. Gros, E. Beyer, B. Nicholson, D. Paul et L. Orci. 1993 Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. Endocrinology, vol. 133, p. 2371-2378.

MENDIS-HANDAGAMA S. M. 1997. Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. Histology and Histopathology, vol. 12, p. 869- 882.

MENDIS-HANDAGAMA S. M. et H. B. Ariyaratne. 2004. Effects of thyroid hormones on Leydig cells in the postnatal testis. Histology and Histopathology, vol. 19, no. 3, p. 985-997.

MENG J., R.W. Holdcraft, J.E. Shima, M.D. Griswold et R.E. Braun. 2005. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America., vol. 102, no.46, p. 16696-16700.

MEHTA P. P., B. L. Lokeshwar, P. C. Schiller, M. V. Bendix, R. C. Ostenson, G. A. Howard et B. A. Roos. 1996. Gap-junctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP. Molecular Carcinogenesis, vol. 15, no. 1, p. 18-32.

MEHTA P. P., C. Perez-Stable, M. Nadji, M. Mian, K. Asotra et B. A. Roos. 1999. Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes. Developmental Genetics, vol. 24, no. 1-2, p. 91-110.

MESEGUER M., N. Garrido, J. A. Martinez-Conejero, C. Simon, A. Pellicer, J. Remohi. 2004. Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, vol. 21, no. 1, p. 445-451.

MEYER R. A., D. W. Laird, J. P. Revel et R. G. Johnson. 1992. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. Journal of Cell Biology, vol. 119, no. 1, p. 179-89.

MILLER W. L. 1988. Molecular Biology of steroid hormones. Endocrinology Reviews, vol. 9, p. 295-318.

MILLETTE C.F. 1999. Spermatozoa. Encyclopedia of reproduction, vol. 4, p. 586-596. San Diego : Academic Press.

MIN J., S. K. Lee et M. B. Gu. 2003. Effects of endocrine disrupting chemicals on distinct expression patterns of estrogen receptor, cytochrome P450 aromatase and p53 genes in oryzias latipes liver. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, vol. 17, no. 5, p. 272-277.

MIROSEVICH J, J. M. Bentel, N. Zeps, S. L. Redmond, M. F. D'Antuono et H. J. Dawkins. 1999. Androgen receptor expression of proliferating basal and luminal cells in adult murine ventral prostate. Journal of Endocrinology, vol. 162, no. 3, p. 341-350.

MIYAMOTO T., K. Morita, D. Takemoto, K. Takeuchi, Y. Kitano, T. Miyakawa, K. Nakayama, Y. Okamura, H. Sasaki, Y. Miyachi, M. Furuse et S Tsukita. 2005. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. Journal of Cell Biology, vol. 169, no. 3, p. 527-538.

MIYOSHI J. et Y. Takai. 2005. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 57, no. 6, p. 815-855.

MORIN P. J. 2005. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. Cancer Research, vol. 65, no. 21, p. 9603-9606.

MORITA K., M. Furuse, K. Fujimoto et S. Tsukita. 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proceedings of National Academy of Sciences United States of America, vol. 96, no. 2, p. 511-516.

MORITA K., H. Sasaki, M. Furuse et S. Tsukita S. 1999b. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. Journal of Cell Biology, vol. 147, no. 1, p. 185-194.

MORITA K., H. Sasaki, K. Fujimoto, M. Furuse et S. Tsukita. 1999c. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. Journal of Cell Biology, vol. 145, no. 3, p. 579-588.

MOROI S., M. Saitou, K. Fujimoto, A. Sakakibara, M. Furuse, O. Yoshida et S. Tsukita. 1998. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. American Journal of Physiology, vol. 274, no. 6, pt. 1, p. C1708-1717.

MRUK D. D. et C. Y. Cheng. 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocrine reviews, vol. 25, no. 5, p. 747-806.

MRUK D. D., A. S. Lau et A. M. Conway. 2005. Crosstalk between Rab GTPases and cell junctions. Contraception, vol. 72, no. 4, p. 280-290.

NACIFF J. M. et G. P. Daston. 2004 Toxicogenomic Approach to Endocrine Disrupters: Identification of a Transcript Profile Characteristic of Chemicals with Estrogenic Activity. Toxicologic Pathology, vol. 32, Suppl. 2, p. 59-70.

NAKAJIMA Y., G. Sato, S. Ohno et S. Nakajin. 2005. Tributyltin chloride suppresses the P450c17 transcription involved in testosterone production induced by gonadotropin stimulation in cultured pig Leydig cells. Environmental Toxicology and Pharmacology, vol. 20, p. 11-17.

NELSON W. J. 2003. Epithelial cell polarity from the outside looking in. News in Physiological Sciences, vol. 18, p. 143-146.

NEWCOMER M. E. 1993. Structure of the epididymal retinoic acid binding protein at 2.1 Å resolution. Structure, vol. 1, no. 1, p. 7-18.

NICHOLS L. S., R. Ashfaq et C. A. Jacobuzio-Donahue. 2004. Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. American Journal of Clinical Pathology, vol. 121, no. 2, p. 226-230.

NILSSON R. 2000. Endocrine modulators in the food chain and environment. Toxicologic Pathology, vol. 28, no. 3, p. 420-431.

NODA T., T. Yamano, M. Shimizu, M. Saitoh, T. Nakamura, A. Yamada et S. Morita. 1992a. Comparative teratogenicity of di-n-butyltin diacetate with n-butyltin trichloride in rats. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 23, no. 2, p. 216-222.

NODA T., T. Nakamura, M. Shimizu, T. Yamano et S. Morita. 1992b. Critical gestational day of teratogenesis by di-n-butyltin diacetate in rats. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 49, no. 5, p. 715-722.

NOLAN M. A., L. Wu, H. J. Bang, S. A. Jelinsky, K. P. Roberts, T. T. Turner, G. S. Kopf et D. S. Johnston. 2006. Identification of rat cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) as the ortholog to human CRISP1 and mouse Crisp4. Biology of Reproduction, vol. 74, no. 5, p. 984-991.

NOLLET F., P. Koolsa et F. van Roy. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. Journal of Molecular Biology, vol. 299, no. 3, p. 551-572.

NORMINGTON K. et D. W. Russell. 1992. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. Journal of Biological Chemistry, vol. 267, no. 27, p. 19548-19554.

OHHIRA S., M. Watanabe M et H. Matsui H. 2003. Metabolism of tributyltin and triphenyltin by rat, hamster and human hepatic microsomes. Archives in Toxicology, vol. 77, no. 3, p. 138-144.

OHNO S., Y. Nakajima et S. Nakajin. 2005. Triphenyltin and Tributyltin inhibit pig testicular 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and suppress testicular testosterone biosynthesis. Steroids, vol. 70, no. 9, p. 645-651.

OKO R. et Y. Clermont. 1999. Spermiogenesis. Encyclopedia of reproduction, vol. 4, p. 603-609. San Diego : Academic Press.

OLSON G. E., J. Jonas-Davies, L. H. Hoffman et M. C. Orgebin-Crist. 1983. Structural features of cultured epithelial cells from the adult rat epididymis. Journal of Andrology, vol. 4, no. 6, p. 347-360.

OMS (WHO). 1990. Environmental Health Criteria 116, Tributyltin compounds. United Nations Environment Program and the World health Organization. WHO Geneva.

OMURA M., R. Ogata, K. Kubo, Y. Shimasaki, S. Aou, Y. Oshima, A. Tanaka, M. Hirata, Y. Makita et N. Inoue. 2001. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. Toxicological Sciences, vol. 64, no. 2, p. 224-232.

ORGBIN-CRIST M. C., N. Jahad et L. H. Hoffman. 1976. The effects of testosterone, 5alpha-dihydrotestosterone, 3alpha-androstanediol, and 3beta-androstanediol on the maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture. Cell Tissue Research, vol. 167, no. 4, p. 515-525.

ORGBIN-CRIST M. C., B. C. Eller et B. J. Danzo BJ. 1983. The effects of estradiol, tamoxifen, and testosterone on the weights and histology of the epididymis and accessory sex organs of sexually immature rabbits. Endocrinology, vol. 113, no. 5, p. 1703-1715.

ORGBIN-CRIST M. C., J.J. Lareyre, K. Suzuki, Y. Araki, R.J. Matusik et D.E. Ong. 2002. Retinoids and epididymal function. Dans : *The Epididymis — from molecules to clinical practice*, B. Robaire and B.T. Hinton, Editors, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 339-352.

OSADA S., J. Nishikawa., T.Nakanishi, K.Tanaka et T. Nishihara. 2005 Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity. Toxicology Letters, vol. 155, no. 2, p. 329-335.

NEDERGAARD M. 1994. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. Science, vol. 263, no. 5154, p. 1768-1771.



- PALLADINO M. A. et B. T. Hinton. 1994. Expression of multiple gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid transcripts in the adult rat epididymis is differentially regulated by androgens and testicular factors in a region-specific manner. Endocrinology, vol. 135, no. 3, p. 1146-1156.
- PATRIARCA C., D. Petrella, B. Campo, P. Colombo, P. Giunta, M. Parente, N. Zucchini, R. Mazzucchelli et R. Montironi. 2003. Elevated E-cadherin and alpha/beta-catenin expression after androgen deprivation therapy in prostate adenocarcinoma. Pathology, Research and Practice, vol. 199, no. 10, p. 659-665.
- PAUL R., C. M. Ewing, D. F. Jarrard et W. B. Isaac. 1997. The cadherin cell-cell adhesion pathway in prostate cancer progression. British Journal of Urology, vol. 79, p. 37-43.
- PELLETIER R.M. et S. W. Byers. 1992. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. Microscope Research Techniques, vol. 20, no. 1, p. 3-33.
- PENNINKS A. H. 1993. The evaluation of data-derived safety factors for bis(tri-n-butyltin)oxide. Food Additives and Contaminants, vol. 10, no. 3, p. 351-361.
- PERREAULT S. D. et A. M. Cancel. 2001. Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. Reproduction, vol. 121, no. 2, p. 207-216.
- PEREZ-ARMENDARIZ E. M., E. Lamoyi, J. I. Mason, D. Cisneros-Armas, V. Luu-The et J. F. Bravo Moreno. Developmental regulation of connexin 43 expression in fetal mouse testicular cells. The Anatomical Record, vol. 264, no. 3, p. 237-246.
- PEREZ-MORENO M., C. Jamora, E. Fuchs. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. Cell, vol. 112, no. 4, p. 535-548.
- PFLIEGER-BRUSS S., S. Hagemann, W. Korner, V. Hanf, F. M. Kohn, C. Muller, W. B. Schill. 2006. Effects of single non-ortho, mono-ortho, and di-ortho chlorinated biphenyls on human sperm functions in vitro. Reproductive Toxicology, vol. 21, no. 3, p. 280-284
- POINTIS G., C. Fiorini, N. Defamie et D. Segretain. 2005. Gap junctional communication in the male reproductive system. Biochimica Biophysica Acta, vol. 1719, no. 1-2, p. 102-116.
- PORTER S. B., D. E. Ong, F. Chytil et M. C. Orgebin-Crist. 1985. Localization of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding protein in the rat testis and epididymis. Journal of Andrology, vol. 6, no. 3, p. 197-212.
- POTTER E., C. Bergwitz et G. Brabant. 1999. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. Endocrine Reviews, vol. 20, no. 2, p. 207-239.

- PRINS G. S. 1989. Differential regulation of androgen receptors in the separate rat prostate lobes: androgen independent expression in the lateral lobe. Journal of Steroid Biochemistry, vol. 33, no. 3, p. 319-326.
- PRINS G. S., L. Birch et G. L. Greene. 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. Endocrinology, vol. 129, no. 6, p. 3187-3199.
- PRINS G. S. 1992. Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. Endocrinology, vol. 130, no. 6, p. 3703-3714.
- RAHNER C., L. L. Mitic et J. M. Anderson. 2001. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. Gastroenterology, vol. 120, no. 2, p. 411-422.
- RANNIKKI, A. S., F. P. Zhang et I. T. Huhtaniemi. 1995. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 107, p. 199-208.
- RATNA KUMAR B. V., B. S. Setty et A. C. Shipstone. 1988. Ultrastructural changes in the principal cells of epididymis of adult rhesus monkey (*Macaca mulatta*) after castration and androgen replacement therapy. Acta Europaea Fertilitatis, vol. 19, p. 287-294.
- REID BL et K. W. Cleland. 1957. The structure and function of the epididymis. The histology of the rat epididymis. Australian Journal of Zoology, vol. 5, p. 223-246.
- REJRAJI H., P. Vernet et J. R. Drevet. 2002. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. Molecular Reproduction and Development, vol. 63, no. 1, p. 96-103.
- REYNOLDS A. B. et A. Rocznik-Ferguson. 2004. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. Oncogene, vol. 23, no. 48, p. 7947-7956.
- RIOS-DORIA J., K. C. Day, R. Kuefer, M. G. Rashid, A. M. Chinnaiyan, M. A. Rubin et M. L. Day. 2003. The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. Journal of Biological Chemistry, vol. 278, no. 2, p. 1372-1379.
- RISLEY M. S., I. P. Tan, C. Roy et J. C. Saez. 1992. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. Journal of Cell Science, vol. 103, no. 1, p. 81-96.
- RISLEY M. S. 2000. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. Biology of Reproduction, vol. 62, no. 3, p. 748-754.
- ROBAIRE B., L. L. Ewing, B. R. Zirkin et D. C. Irby. 1977. Steroid  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis. Endocrinology, vol. 101, no. 5, p. 1379-1390.

ROBAIRE B. et L. Hermo. 1998. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens : structure, functions, and their regulation. In : The physiology of reproduction . Editeurs Knobil E. et JD Neill. Raven Press Ltd, New York. p. 999-1080.

ROBAIRE B. et R. Viger. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. Biology of Reproduction, vol. 52, no. 2, p. 226-236.

ROBAIRE B., B. T. Hinton et M. C. Orgebin-Christ. 2006. The Epididymis. Dans Physiology of Reproduction. J. D. Neill JD Ed. Raven Press Ltd, New York. p. 1071-1148.

ROBAIRE B. et N. A. Henderson. 2006. Actions of 5alpha-reductase inhibitors on the epididymis. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 250, no. 1-2, p. 190-195.

ROBERTS K.P. et B.R. Zirkin. 1991. Androgen regulation of spermatogenesis in the rat. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 637, p. 90-106.

ROBERTSON K. M., L. O'Donnell, M. E. Jones, S. J. Meachem, W. C. Boon, C. R. Fisher, K. H. Graves, R. I. McLachlan et E. R. Simpson. 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, vol. 96, no. 14, p. 7986-7991.

ROBERTS K. P., J. A. Wamstad, K. M. Ensrud et D. W. Hamilton. 2003. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. Biology of Reproduction, vol. 69, no. 2, p. 572-581.

ROBERTS K. P., K. M. Ensrud, J. L. Wooters, M. A. Nolan, D. S. Johnston et D. W. Hamilton. 2006. Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 250. no. 1-2, p. 122-127.

RODRIGUEZ-BOULAN E et W. J. Nelson. 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. Science, vol. 245, no. 4919, p. 718-725.

ROSS W.D., E.A. Emmett, J. Steiner et R. Tureen. 1981. Neurotoxic effects of occupational exposure to organotins. The American Journal of Psychiatry, vol. 138, no. 8, p. 1092-1095.

RUIZ-BRAVO N. 1988. Tissue and cell specificity of immobilin biosynthesis. Biology of Reproduction, vol. 39, p. 901-911.

RURANGWA E, A. Biegniewska, E. Slominska, E. F. Skorkowski et F Ollevier. 2002. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology, vol. 131, no. 3, p. 335-344.

RUSSELL L. D. et R. N. Peterson. 1985. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. International Review of Cytology, vol. 94, p. 177-211.

RUSSELL L. D., A. Bartke et J. C. Goh. 1989. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. American Journal of Anatomy, vol. 184, no. 3, p.179–189.

SABERWAL G. S., M. K. Sharma, N. Balasinor, J. Choudhary, H. S. Juneja. 2002. Estrogen receptor, calcium mobilization and rat sperm motility. Molecular and Cellular Biochemistry, vol. 237, no. 1-2, p. 11-20.

SAEZ J.M. 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. Endocrine Reviews, vol. 15, no. 5, p. 574-626.

SAEZ F., G. Frenette et R. Sullivan. 2003. Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. Journal of Andrology, vol. 24, no. 2, p. 149-154.

SAITOU M., Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, J. Inazawa, K. Fujimoto et S. Tsukita. 1997. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. European Journal of Cell Biology, vol.73, no. 3, p. 222-231.

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 differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. Journal of Cell Biology, vol. 141, no. 2, p. 397-408.

SALADINO F, Carruba G, Quader ST, Amoroso M, Di Cristina A, Webber MM, Castagnetta LA. 2002. Connexin expression in nonneoplastic human prostate epithelial cells. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 963, p. 213-217.

SATOH K., F. Nagai et N. Aoki. 2001. Several Environmental Pollutants Have Binding Affinities for Both Androgen Receptor and Estrogen Receptor alpha. Journal of Health Sciences, vol. 47, no. 5, p. 495-501.

SAUNDERS P. T., R. M. Sharpe, K. Williams, S. Macpherson, H. Urquart, D. S. Irvine et M. R. Millar. 2001. Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. Molecular Human Reproduction, vol. 7, p. 227-236.

SCHLEICHER G., U. Drews et W. E. Stumpf. 1989. No evidence for aromatization of [3H]testosterone in oestrogen receptor containing cells of the epididymis. Journal of Steroid Biochemistry, vol. 2, no. 2, p. 299-302.

SCHNEEBERGER E. E. et R. D. Lynch. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. American Journal of Physiology and Cell Physiology, vol. 286, no. 6, p. C1213-1228.

- SEENUNDUN S. et B. Robaire. 2005. Cloning and characterization of the 5alpha-reductase type 2 promoter in the rat epididymis. Biology of Reproduction, vol. 72, no. 4, p. 851-861.
- SETCHELL B. P. et D. E. Brooks. 1988. Anatomy, vasclature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In 'The physiology of Reproduction. Eds E. Knobil et J. Neill. New-York : Raven Press Ltd. p. 753-836
- SETCHELL B. P., L. G. Sanchez-Partida et A. Chairussyuhur. 1993. Epididymal constituents and related substances in the storage of spermatozoa: a review. Reproduction, Fertility and Development, vol. 5, no. 6, p. 601-612.
- SHAPIRO L. 2001. beta-catenin and its multiple partners : promiscuity explained. Nature Scructural Biology, vol. 8, p. 484-487.
- SHARPE R. M. 2000. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. British Medical Bulletin, vol. 56, no. 3, p. 630-642.
- SHAWKY S. et H. Emons. 1999. Distribution pattern of organotin compounds at different trophic levels of aquatic ecosystems. Chemosphere, vol. 36, p. 523-535.
- SHIM W. J., J. R. Oh, S. H. Kahng, J. H. Shim et S. H. Lee. 1998. Accumulation of tributyl- and triphenyltin compounds in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, from the Chinhae Bay System, Korea. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 35, no. 1, p. 41-47.
- SHETH B., B. Moran, J. M. Anderson et T. P. Fleming. 2000. Post-translational control of occludin membrane assembly in mouse trophectoderm: a mechanism to regulate timing of tight junction biogenesis and blastocyst formation. Development, vol. 127, no. 4, p. 831-840.
- SHIMASAKI Y., T. Kitano, Y. Oshima, S. Inoue, N. Imada et T. Honjo. 2003. Tributyltin causes masculinization in fish. Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 22, no. 1, p. 141-144.
- SIAH A., J. Pellerin, J. C. Amiard, E. Pelletier et L. Viglino. Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology, vol. 135, no. 2, p. 145-156.
- SIMONS K. et S. D. Fuller. 1985. Cell surface polarity in epithelia. Annual Review in Cell Biology, vol. 1, p. 243-288.
- SIMONS K. et A. Wandinger-Ness. 1990. Polarized Sorting in Epithelia. Cell, vol. 62, no. 2, p. 207-210.

- SINAWAT S. 2000. The environmental impact on male fertility. Journal of the Medical Association of Thailand, vol. 83, no. 8, p. 880-885.
- SINGH J., C. O'Neill et D. J. Handelsman. 1995. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. Endocrinology, vol. 136, no. 12, p. 5311-5321.
- SINGH J. et D. J. Handelsman. 1996. The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin- deficient (hpg) mice. Journal of Andrology, vol. 17, no. 4, p. 382-393.
- SMIALOWICZ R. J. 2002. The rat as a model in developmental immunotoxicology. Human and Experimental Toxicology, vol. 21, no. 9-10, p. 513-519.
- SNOEIJ N. J., A. H. Penninks et W. Seinen. 1987. Biological activity of organotin compounds--an overview. Environmental Research, vol. 44, no. 2, p. 335-353.
- SPOONER N., P. E. Gibbs, G. W. Bryan et L. J. Goad. 1991. The effect of tributyltin upon steroids titers in the female Dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. Marine Environmental Research, vol. 32, p. 37-49.
- STAB J. A., T. P. Traas, G. Stroomberg, J. van Kesteren, P. Leonards, B. van Hattum, U. A. Brinkman et W. P. Cofino. 1996. Determination of organotin compounds in the foodweb of a shallow freshwater lake in the Netherlands. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 31, no. 3, p. 319-328.
- STEINER S. et N. L. Anderson. (2000). Expression profiling in toxicology: potential and limitations. Toxicology Letters, vol. 112-113, p. 467-471.
- 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. Journal of Cell Biology, vol. 103, no. 3, p. 755-766.
- STOCCO D. M. 1999. Testosterone Biosynthesis. Encyclopedia of Reproduction, vol. 4, p. 784-789. San diego : Academic Press.
- SUDARYANTO A., S. Takahashi, H. Iwata , S. Tanabe et A. Ismail. 2004. Contamination of butyltin compounds in Malaysian marine environments. Environmental Pollution, vol. 130, no. 3, p. 347-358.
- SUGIMURA Y., G. R. Cunha, A. A. Donjacour. 1986. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. Biology of Reproduction, vol., 34, no. 5, p. 973-983.

- SULLIVAN R., F. Saez, J. Girouard et G. Frenette. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. Blood Cells, Molecules and Diseases, vol. 35, no. 1, p. 1-10.
- SUMMERTON J. et D. Weller. 1997. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. Antisense and Nucleic Acid Drug Development, vol. 7, no. 3, p.187-195.
- SUN E. L. et C. J. Flickinger. 1979. Development of cell types and regional differences in the postnatal rat epididymis. American Journal of Anatomy, vol. 154, p. 27-56.
- SUNDARA. M. M., A. Sivaprasadarao, D. M. Aalten et J. B. Findlay. 1998. Expression, characterization and engineered specificity of rat epididymal retinoic acid-binding protein. The Biochemical Journal, vol. 334, no. 1, p. 155-160.
- SUTOVSKY P., R. Moreno, J. Romalho-Santos, T. Dominko, W. E. Thompson et G. Schatten. 2001. A putative ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. Journal of Cell Science, vol. 114, no. 9, p. 1665-1675.
- SUTOVSKY P. 2003. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. Microscopy Research and Technique, vol. 61, no. 1, p. 88-102.
- SUZUKI F. et T. Nagano. 1976. Changes in occluding tight junctions of epididymal epithelium in the developing and gonadectomized mammals. Journal of Cell Biology, vol. 70, p. 101a.
- SUZUKI T., H. Yamanaka, K. Suzuki, K. Nakajima, K. Kanatani, M. Kimura et N. Otaki. 1992. Immunohistochemical demonstration of metallothionein in the rat epididymis and spermatic chord. Zoological Science, vol. 9, p. 1009-1015.
- SUZUKI K., X. Yu, P. Chaurand, Y. Araki, J. J. Lareyre, R. M. Caprioli, R. J. Matusik et M. C. Orgebin-Crist. 2006. Epididymis-specific promoter-driven gene targeting: A transcription factor which regulates epididymis-specific gene expression. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 250, no. 1-2, p. 184-189.
- SWAN S. H., E. P. Elkin et L. Fenster. 2000. The question of declining sperm density revisited: An analysis of 101 studies published 1934-1996. Environmental Health Perspectives, vol. 108, no. 10, p. 961-966.
- SWISSHELM K., A. Machl, S. Planitzer, R. Robertson, M. Kubbies et S. Hosier. 1999. SEMP1, a senescence-associated cDNA isolated from human mammary epithelial cells, is a member of an epithelial membrane protein superfamily. Gene, vol. 226, no. 2, p. 285-295.

SYNTIN P., F. Dacheux, X. Druart, J. L. Gatti, N. Okamura et J. L. Dacheux. 1996. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. Biology of Reproduction, vol. 55, no. 5, p. 956-974.

TABUCHI Y., Y. Toyama, K. Toshimori, M. Komiyama, C. Mori et T. Kondo. 2005. Functional characterization of a conditionally immortalized mouse epididymis caput epithelial cell line MEPC5 using temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 329, vol. 3, p. 812-823.

TAKAHASHI S., S. Tanabe, I. I. Takeuchi et N. Miyazaki. 1999. Distribution and specific bioaccumulation of butyltin compounds in a marine ecosystem. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 37, no. 1, p. 50-61.

TAKEICHI M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. Development, vol. 102, no. 4, p. 639-655.

TAKEICHI M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. Annual Review in Biochemistry, vol. 59, p. 237-252.

TAKEICHI M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science, vol. 251, no. 5000, p. 1451-1455.

TAKEICHI M. 1995. Morphogenic roles of classic cadherins. Current Opinion in Cell Biology, vol. 7, p. 619-27.

TANAKA M et H. B. Grossman. 2004. Connexin 26 induces growth suppression, apoptosis and increased efficacy of doxorubicin in prostate cancer cells. Oncology Reports, vol. 11, no. 2, p. 537-541.

TANAKA H. et T. Baba. 2005. Gene expression in spermiogenesis. Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 62, no. 3, p. 344-354.

TATE A.W., T Lung, A. Radhakrishnan, S. D. Lim, X. Lin et M. Edlund. 2006. Changes in gap junctional connexin isoforms during prostate cancer progression. Prostate, vol. 66, no. 1, p. 19-31.

THIAGALINGAM S., K.H.Cheng, H.J.Lee, N. Mineva, A. Thiagalingam et J. F. Ponte. 2003. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 983, p.84-100.

THIBAUT R. et C. Porte. 2004. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 92, no. 5, p. 485-494.

TINDALL D. J., F. S. French et S. N. Nayfeh. Androgen uptake and binding in rat epididymal nuclei, in vivo. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 49, no. 6, p. 1391-1397.



TOPPARI J., J. C. Larsen, P. Christiansen, A. Giwercman, P. Grandjean, L. J. Jr Guillette, B. Jegou, T. K. Jensen, P. Jouannet, N. Keiding, H. Leffers, J. A. McLachlan, O. Meyer, J. Muller, E. Rajpert-De Meyts, T. Scheike, R. Sharpe, J. Sumpter et N. E. Skakkebaek. 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. Environmental Health Perspectives, vol. 104, suppl. 4, p. 741-803.

TOPPARI J., N. E. Skakkebaek. 1998. Sexual differentiation and environmental endocrine disrupters. Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 12, no. 1, p. 143-156.

TOSHIMORI K. 2003. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. Microscopy research and technique, vol. 61, no. 1, p. 1-6.

TOYAMA Y., M. Ohkawa, R. Oku, M. Maekawa et S. Yuasa. 2001. Neonatally administered diethylstilbestrol retards the development of the blood-testis barrier in the rat. Journal of Andrology, vol. 22, no. 3, p. 413-423.

TOYAMA Y., M. Maekawa et S. Yuasa. 2003. Ectoplasmic specializations in the Sertoli cell: new vistas based on genetic defects and testicular toxicology. Anatomical Science International, vol. 78, no. 1, p. 1-16.

TRASLER J. M., 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, no. 2, p. 463-479.

TSAI H., J. Werber, M. O. Davia, M. Edelman, K. E. Tanaka, A. Melman, G. J. Christ et J. Geliebter. 1996. Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 227, no. 1, p. 64-69.

TSUKITA S., M. Furuse et M. Itoh. 1999. Structural and signalling molecules come together at tight junctions. Current Opinion in Cell Biology, vol. 11, no. 5, p. 628-633.

TSUKITA S. et M. Furuse. 1999b. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? Trends in Cell Biology, vol. 9, no. 7, p. 268-273.

TULSIANI D. R. P. 2003. Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: Are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? Microscopy research and technique, vol. 61, no. 1, p. 18-27.

TUNGGAL J. A., I. Helfrich, A. Schmitz, H. Schwarz, D. Günzel, M. Fromm, R. Kemler, T. Krieg, et C. M. Niessen. 2005. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. The EMBO Journal, vol. 24, no. 6, p. 1146-1156.

TURNER T. T. 1991. Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 637, p. 364-383.

TURNER T. T. 1995. On the epididymis and its role in the development of a fertile ejaculate. Journal of Andrology, vol. 16, no. 4, p. 292-298.

TURNER T. T., T. A. Riley, M. Vagnetti, C. J. Flickinger, J. A. Caldwell et D. F. Hunt. 2000. Postvasectomy alterations in protein synthesis and secretion in the rat caput epididymidis are not repaired after vasovasostomy. Journal of Andrology, vol. 21, no. 2, p. 276-290.

VELTMAN K., M. A. Huijbregts, M. J. van den Heuvel-Greve, A. D. Vethaak et A. J. Hendriks. 2006. Organotin accumulation in an estuarine food chain: comparing field measurements with model estimations. Marine Environmental Research, vol. 61, no. 5, p. 511-530.

VERI J. P., L. Hermo et B. Robaire. 1993. Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. Journal of Andrology, vol. 14, no. 1, p. 23-44.

VIGLINO L., E. Pelletier et R. St-Louis. 2004. Highly persistent butyltins in northern marine sediments: a long-term threat for the Saguenay Fjord (Canada). Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 23, no. 11, p. 2673-2681.

VIGLINO L., E. Pelletier et L. E. Lee. 2006. Butyltin Species in Benthic and Pelagic Organisms of the Saguenay Fjord (Canada) and Imposex Occurrence in Common Whelk (*Buccinum undatum*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 50, no. 1, p. 45-59.

VOS J. G., E. Dybing, H. A. Greim, O. Ladefoged, C. Lambre, J. V. Tarazona, I. Brandt et A. D. Vethaak. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Critical Reviews in Toxicology, vol. 30, no. 1, p. 71-133.

YAMABE Y., A. Hoshino, N. Imura, T. Suzuki et S. Himeno. 2000. Enhancement of Androgen-Dependent Proliferation by Tributyltin and Triphenyltin in Human Prostate Cancer Cells. Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 169, p. 177-184.

YAMANO Y., K. Ohyama, M. Ohta, T. Sano, A. Ritani, J. Shimada, N. Ashida, E. Yoshida, K. Ikehara et I. Morishima. 2005. A novel spermatogenesis related factor-2 (SRF-2) gene expression affected by TCDD treatment. Endocrine Journal, vol. 52, no. 1, p. 75-81.

YAP A. S., C. M. Niessen et B. M. Gumbiner. 1998. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. Journal of Cell Biology, vol. 141, no. 3, p. 779-789.

YAP A. S. et E. M. Kovacs. 2003. Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. The journal of Cell Biology, vol. 160, no. 1, p. 11-16.

- YEUNG C. H., E. Sonnenberg-Riethmacher et T. G. Cooper. 1998. Receptor tyrosine kinase c-ros knockout mice as a model for the study of epididymal regulation of sperm function. Journal of Reproduction and Fertility, supplement, vol. 53, p. 137-147.
- YEUNG C.-H. et T. G. Cooper. 2002. Acquisition and Development of Sperm Motility upon Maturation in the Epididymis, The Epididymis, from Molecules to Clinical Practice, p. 417-434. New York : Kluwer Academics/Plenum Publishers.
- YU L. C. et Y. H. Chen. 1993. The developmental profile of lactoferrin in mouse epididymis. The Biochemical Journal, vol. 296, no. Pt 1, p. 107-111.
- YU WJ, B. J. Lee, S. Y. Nam, Y. C. Kim, Y. S. Lee et Y. W. Yun. 2003. Spermatogenic disorders in adult rats exposed to tributyltin chloride during puberty. The Journal of Veterinary Medical Science, vol. 65, no. 12, p. 1331-1335.
- YUAN H., A. Liu, L. Zhang, H. Zhou, Y. Wang, H. Zhang, G. Wang, R. Zeng, Y. Zhang et Z. Chen. 2006. Proteomic profiling of regionalized proteins in rat epididymis indicates consistency between specialized distribution and protein functions. Journal of Proteome Research, vol. 5, no. 2, p. 299-307.
- Van HAASTER L. H., F. H. De Jong, R. Docter et D. G. De Rooij. 1992. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. Endocrinology, vol. 131, p. 1574-1576.
- VERI J. P., Hermo L. et Robaire B. 1993. Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. Journal of Andrology, vol. 14, no. 1, p. 23-44.
- VIGER R. 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, no. 1, p. 27-34.
- VIGLINO L., E. Pelletier et L.E. Lee. 2006. Butyltin species in benthic and pelagic organisms of the Saguenay Fjord (Canada) and Imposex occurrence in common whelk (*Buccinum undatum*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 50, no. 1, p. 45-59.
- WEST M. R., D. J. Ferguson, V. J. 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 Communication and Adhesion, vol. 9, no. 1, p. 29-44.
- WHITE T. W. et D. L. Paul. 1999. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. Annual Review in Physiology, vol. 61, p. 283-310.

WILLERT K. et R. Nusse. 1998. Beta-catenin: a key mediator of wnt signaling. Current Opinion in Genetics and Development, vol. 8, no. 1, p. 95-102.

Vom SAAL F. S., B. G. Timms, M. M. Montano, P. Palanza, K. A. Thayer, S. C. Nagel, M. D. Dhar, V. K. Ganjam, S. Parmigiani et W. V. Welshons. 1997. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America, vol. 94, no. 5, p. 2056-2061.

WONG P. Y. D., X. D. Gong, G. P. H. Leung et B. L. Y. Cheuk. 2002. Formation of the epididymal fluid Microenvironment. The Epididymis, from Molecules to Clinical Practice, p. 119-130. New York : Kluwer Academics/Plenum Publishers.

WONG C. H., D. D. Mruk, W. Y. Lui et C. Y. Cheng. 2004. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study. Journal of Cell Science, vol. 117, no. 5, p. 783-798.

WONG C. H. et C. Y. Cheng. 2005. Mitogen-activated protein kinases, adherens junctions, and spermatogenesis: a review of recent data. Developmental Biology, vol. 286, no. 1, p. 1-15.

WORKING P. K. et M. E. Hurtt. 1987. Computerized videomicrographic analysis of rat sperm motility. Journal of Andrology, vol. 8, no. 5, p. 330-337.

ZHANG H. et P. A. Martin-DeLeon. 2003. Mouse Epididymal Spam1 (PH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. Journal of Andrology, vol. 24, no. 1, p. 51-58.

ZHENG J. Y., D. Yu, M. Foroohar, E. Ko, J. Chan, N. Kim, R. Chiu et S. Pang. 2003. Regulation of the expression of the prostate-specific antigen by claudin-7. The journal of membrane biology, vol. 194, no. 3, p. 187-197.

ZHOU C. X., Y. L. Zhang, L. Xiao, M. Zheng, K. M. Leung, M. Y. Chan, P. S. Lo, L. L. Tsang, H. Y. Wong, L. S. Ho, Y. W. Chung et H. C. Chan. 2004. An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. Nature Cell Biology, vol. 6, no. 5, p. 458-464.

ZHU L. J., M. P. Hardy, I. V. Inigo, I. Huhtaniemi, C. W. Bardin et A. J. Moo-Young. 2000. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. Biology of Reproduction, vol. 63, no. 2, p. 368-376.

ZIRKIN B. R., C. Awoniyi, M. D. Griswold, L. D. Russell et R. Sharpe R. 1994. Is FSH required for adult spermatogenesis? Journal of Andrology, vol. 15, no. 44, p. 273-276.