

Université du Québec
INRS-Institut Armand Frappier

**RÔLES DES CONNEXINES DANS LES GONADES MÂLES D'OMBLE DE FONTAINE
(*Salvelinus fontinalis*), UN MARQUEUR DE MATURATION**

Par Benjamin de Montgolfier, M.Sc.

Thèse présentée
pour l'obtention du doctorat de Biologie

Jury d'évaluation

Examinateur externe	Vance Trudeau, Université d'Ottawa
Examinateur externe	R-Marc Pelletier, Université de Montréal
Examinateur interne	Jacques Bernier, INRS-Institut Armand Frappier
Directeur de recherche	Daniel G. Cyr, INRS-Institut Armand Frappier
Codirectrice de recherche	Céline Audet, ISMER-UQAR

« Pour convaincre, la vérité ne peut suffire... »
Isaac Asimov

RÉSUMÉ

La spermatogenèse est un processus nécessitant de nombreuses interactions entre cellules germinales et somatiques. Les jonctions lacunaires sont identifiées comme jouant un rôle important dans la communication cellulaire. Les jonctions lacunaires permettent le passage bidirectionnel de petites molécules (< 1 kDa) entre cellules adjacentes. Ce sont des structures composées de deux connexons, eux-mêmes constitués par six protéines oligomérisées autour d'un pore central, appelées connexines (Cxs). Parmi ces protéines, la Cx43 est présente dans le testicule de rongeurs et d'humain et des études ont démontré qu'une baisse de Cx43 dans le testicule entraînait une diminution de la spermatogenèse, voire son inhibition complète.

L'omble de fontaine est un salmonidé qui se reproduit chaque automne. Durant la spermatogenèse, les cellules germinales se développent de façon synchrone. Il devient alors aisément de suivre étape par étape ce processus, et d'étudier avec précision chaque stade de maturation des gonades.

L'objectif principal de cette thèse était de déterminer si les Cxs régulent la spermatogenèse chez l'omble de fontaine. Plus précisément, nous avons défini quatre sous-objectifs : 1) identifier et localiser les connexines dans le testicule de truite arc-en-ciel ; 2) étudier l'impact des effluents municipaux sur les niveaux d'expression des ARNm des connexines chez l'omble de fontaine ; 3) établir le lien entre les hormones stéroïdiennes et l'expression des connexines, chez l'omble de fontaine ; et 4) étudier les mécanismes de régulation du promoteur de *cx43*.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier quatre Cxs possédant une expression et une localisation spécifique dans le testicule de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et de l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) (Cx43, Cx43.4, Cx30 et Cx31). De plus, l'exposition d'ombles de fontaine à des effluents municipaux a permis de montrer l'augmentation précoce des niveaux de Cx43 et Cx31 dans le testicule d'individus dont la spermatogenèse était initiée. Ces résultats suggèrent le rôle possible de la Cx43 comme marqueur précoce de la maturation. Les suivis des variations des hormones stéroïdes, des Cxs et des récepteurs aux androgènes, aux hormones thyroïdiennes et de la gonadotropine I, ont permis d'observer les niveaux des Cxs durant la spermatogenèse et de montrer *in vitro* que les niveaux de *cx43* n'étaient pas régulés par

la 11-CT, mais dépendant des niveaux d'AMPc (messager secondaire de la GtH I) et de T₃. Enfin, nous avons étudié le promoteur de *cx43*. Une séquence partielle de 607 pb de son promoteur a été séquencée. Des expériences de retardement sur gel, puis des expériences de transfection avec différents fragments du promoteur de *cx43* d'omble de fontaine dans des cellules gonadiques de truite arc-en-ciel (RTG-2) ont démontré que la fixation de C/EBP et *tr-beta* sur le promoteur activait l'expression de *cx43* confirmant ainsi les observations précédentes.

En conclusion, ces travaux ont permis d'identifier et de localiser pour la première fois ces quatre Cxs dans le testicule de salmonidés et de montrer que leur expression varie durant la spermatogenèse. Toutefois, la 11-CT n'a aucun effet sur les niveaux d'ARNm de *cx43*, à l'inverse de la FSH et de T₃ qui semblent augmenter son expression dans le testicule d'omble de fontaine.

Benjamin de Montgolfier

Daniel G. Cyr

REMERCIEMENTS

Cinq ans de doctorat représentent une longue aventure et cela fait beaucoup de monde à remercier. J'aimerais prendre le temps de remercier tous ceux qui ont collaboré à cette thèse, que ce soit sur un plan scientifique et/ou humain.

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement mon directeur de recherche, Daniel Cyr, qui m'a accueilli dans son laboratoire, mis à disposition toutes les ressources nécessaires pour mener à bien ce projet. Merci pour ton encadrement et tes conseils qui m'ont permis d'avancer tout au long du projet.

Un grand merci à ma co-directrice Céline Audet qui m'a fait revenir au Québec. Merci pour ta disponibilité et tes conseils malgré la distance. Merci pour ta confiance et ta ténacité durant toutes ces années de travail en commun.

Je tiens à remercier les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et la correction de ma thèse, ainsi que pour leurs commentaires et remarques.

Le laboratoire est avant tout un travail d'équipe, je souhaite remercier tous les membres côtoyés. Merci à Mary Gregory pour son aide et ses remarques utiles. Merci aussi à Julie Dufresne, pour son aide précieuse tout au long de ces années. Elle a su m'apprendre tous les petits trucs non écrits de la biologie moléculaire et m'aider lors d'impasses.

Je souhaite remercier aussi les étudiantes du laboratoire : Johanna Barthélémy, Isabelle Plante, Michèle Picard-Aiken, Aurore Nicol, Sara Edwards, Nathalie Gallet, Amélie Gravel et Evelyne Dubé pour toutes les discussions (scientifiques ou pas) qui furent une aide précieuse.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement Michel Fournier, avec qui j'ai collaboré durant ce projet. Merci pour tes conseils et ton écoute qui m'ont permis de continuer.

Je souhaite remercier chaleureusement « l'équipe de l'ombre » de Pointe-Claire, ceux qui sont présents tous les jours et sans qui, le travail serait plus fastidieux : Francine Leclerc, Jocelyne Ash, Jacques Lussier et Daniel Venne. Merci pour votre bonne humeur et votre constante disponibilité pour répondre à tous nos besoins.

Je tiens aussi à remercier les différents organismes qui ont financé ce projet : Le Réseau Aquaculture Québec, le CRSNG et la Fondation Armand Frappier.

Plus personnellement je tiens de remercier ma famille, et particulièrement mes parents, qui ont permis à un petit garçon de 11 ans d'accomplir son rêve : devenir chercheur en biologie. Ils ont su m'encourager puis me laisser m'envoler afin de poursuivre ma passion. Merci pour votre confiance et les efforts que toute cette aventure a engendrés. Merci à mes deux frères et leurs « blondes » : Matthieu et Laëtitia, Martin et Sophie, toujours là malgré les kilomètres de

VIII

distance, prêts à tous les coups. Bienvenue à Maya, ma petite nièce, qui démarre l'aventure de la vie.

Félicitations à mon grand-père, qui à 80 ans passés a su comprendre mon projet et me faire part d'hypothèses de recherche ; le tout *via* MSN.

Je tiens à remercier vivement Louis Sénecal. Il a été l'homme aux multiples casquettes durant ces années. Responsable informatique, Co-voitureur, Bricoleur d'appart, Conseiller, bref un véritable ami. Si ce séjour à l'institut fut aussi agréable, tu en es l'un des principaux responsables.

Merci aussi aux amis, éparpillés un peu partout dans le monde : François et Marie-Laure, Bertrand, Camille, Séb et Virginie, Olivier et Sandra, Matthieu et Sandrine, Jong, François et Rachel, Mickaël et Isabelle, Steve et Nathalie. Vive MSN et Skype !!!

Merci à tous ceux que je ne pourrai nommer et que j'ai côtoyé depuis cet hiver 2004. Une pensée rugbystique toute particulière pour les gars de l'Apéro.

Enfin, je tiens à remercier Joanna. Ce doctorat est devenu une grande aventure humaine le jour où nous nous sommes rencontrés à l'institut. La vie avec un doctorant n'est pas toujours facile...

Je terminerai avec une pensée toute particulière pour mon grand-père paternel, décédé l'automne passé. Il a été mon premier commanditaire pour le départ de ce doctorat ; le coup de pouce qui a permis de lancer cette histoire. Merci à toi pour ces trente années.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	V
REMERCIEMENTS	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES TABLEAUX	XIX
AVANT-PROPOS	XXI
INTRODUCTION.....	1
PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LITTÉRATURE	5
PREMIÈRE PARTIE, SECTION 1 : LA SPERMATOGENÈSE CHEZ LES SALMONIDÉS	7
1.1 Présentation du modèle d'étude : l'omble de fontaine	7
1.2 La spermatogenèse.....	8
1.2.1 Structure du testicule.....	9
1.2.2 Les étapes de la spermatogenèse	10
1.3 Le contrôle hormonal de la spermatogenèse : l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique	14
1.3.1 Les gonadotropines (GtH).....	15
1.3.2 Les récepteurs des gonadotropines	17
1.4 Les hormones stéroïdes.....	18
1.4.1 La 11-cétotestostérone (11-CT).....	21
1.4.2 La testostérone (T)	22
1.4.3 Le 17 β -oestradiol (E ₂)	23
1.4.4 Les récepteurs aux androgènes (RA)	24
1.5 Les hormones thyroïdiennes.....	26
1.5.1 La thyronine (T ₃) et la thyroxine (T ₄)	27
1.5.2 Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (RHT)	28
PREMIÈRE PARTIE, SECTION 2 : LES JONCTIONS LACUNAIRES	31

2.1 Communication intercellulaire et jonctions lacunaires.....	31
2.2 Structure des jonctions lacunaires	32
2.2.1 Le connexon	32
2.2.2 Les connexines (Cx _s).....	35
2.2.3 Structures des connexines	36
2.3 Le contrôle de la communication intercellulaire.....	38
2.3.1 Le contrôle rapide	38
2.3.2 Le contrôle moyen	39
2.3.3 Le contrôle lent.....	40
2.4 Jonctions lacunaires et spermatogenèse.....	40
2.5 Importance de la Cx43 dans le testicule	43
PREMIÈRE PARTIE, SECTION 3 : LA MODULATION DE LA SPERMATOGENÈSE.....	49
3.1 La maturation précoce	49
3.2 Les facteurs génétiques et biotiques	51
3.2.1 La croissance et les facteurs génétiques.....	51
3.2.2 Les facteurs biotiques.....	52
3.3 Les facteurs environnementaux.....	53
3.3.1 La photopériode	53
3.3.2 La température	54
3.3.3 La salinité	54
3.4 Les facteurs anthropiques : les modulateurs endocriniens.....	55
3.4.1 Les sources de modulateurs endocriniens	55
3.4.2 Les alkylphénols	56
3.4.3 Le bisphénol A.....	57
3.4.4 Les pesticides organochlorés.....	58
3.4.5 Les effluents d'usines de pâtes à papier	58
3.4.6 Les effluents municipaux	59
3.5 Les effets des effluents municipaux sur la spermatogenèse des poissons	61
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	65
DEUXIÈME PARTIE : ARTICLES.....	67
DEUXIÈME PARTIE, SECTION 1 : THE EXPRESSION OF MULTIPLE CONNEXINS THROUGHOUT SPERMATOGENESIS IN THE RAINBOW TROUT TESTIS SUGGESTS A ROLE FOR COMPLEX INTERCELLULAR COMMUNICATION.....	69

1.1 Résumé français de l'article	69
1.2 Contribution de l'étudiant	70
DEUXIÈME PARTIE, SECTION 2 : INFLUENCE OF MUNICIPAL EFFLUENTS ON THE EXPRESSION OF CONNEXINS IN THE BROOK TROUT (<i>Salvelinus fontinalis</i>) TESTIS.	103
2.1 Résumé français de l'article	103
2.2 Contribution de l'étudiant	104
DEUXIÈME PARTIE, SECTION 3 : SEANONAL VARIATIONS ON TESTICULAR CONNEXIN LEVELS AND THEIR REGULATION IN THE BROOK TROUT, <i>Salvelinus fontinalis</i>.	141
3.1 Résumé français de l'article	141
3.2 Contribution de l'étudiant	142
DEUXIÈME PARTIE, SECTION 4: CHARACTERIZATION OF THE BROOK TROUT CX43 PROMOTER: ROLE OF THE THYROID HORMONE RECEPTOR-BETA AND C/EBP BINDING SITES IN TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION.....	181
4.1 Résumé français de l'article	181
4.2 Contribution de l'étudiant	182
TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	219
TROISIÈME PARTIE, SECTION 1 : DISCUSSION.....	221
1.1 Combien de Cxs testiculaires ?.....	234
1.2 Les Cxs, marqueurs précoces de maturation.....	234
1.3 Le rôle essentiel des Cxs dans la spermatogenèse.....	234
1.4 Régulation de la cx43.....	231
1.5 Perspectives.....	233
TROISIÈME PARTIE, SECTION 2 : CONCLUSIONS ET AVANCEMENT DES CONNAISSANCES.....	235
RÉFÉRENCES CITÉES.....	237

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3,5,3'-triiodo-L-Thyronine : T₃

11-cétotestostérone : 11-CT

17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one : 17α,20β-DHP

Acide aminé : a.a.

Acide désoxyribonucléique : ADN

Acide désoxyribonucléique complémentaire : ADNc

Acide ribonucléique : ARN

Acide ribonucléique messager : ARNm

Adénosyl mono phosphate cyclique : AMPc

Barrière hémato-testiculaire : BHT

Claudine : Cld

Connexine : Cx

Éthinyloestradiol : EE₂

Gap Junction Alpha 1 : GJA1

Gonadolibérine : GnRH

Gonadotropine : GtH

Gonadotropine I : GtH I

Gonadotropine II : GtH II

Hormone chorionique gonadotrope : HCG

Hormone folliculostimulante : FSH

Hormone lutéinisante : LH

Jontion serrée : JS

Junction-associated membrane protein : JAM

L-Thyroxine : T₄

Molécule de jonction adhérente : MJA

Occludine : Occ

Oestradiol : E₂

Récepteur aux androgènes : RA

Récepteur aux gonadotropines I : GtHR I

Récepteur aux gonadotropines II : GtHR II

Récepteur à l'hormone folliculostimulante : RFSH

Récepteur à l'hormone lutéinisante : RLH

Récepteur aux hormones thyroïdiennes : RT

Récepteur aux oestrogènes : RO

Testostérone : T

Vitellogénine : VTG

LISTE DES FIGURES

PREMIÈRE PARTIE, REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1: Présentation des différentes étapes de la spermatogenèse.....	11
Figure 2: Présentation schématique de la synthèse des différentes hormones stéroïdiennes chez les salmonidés	21
Figure 3 : Schéma d'une jonction lacunaire.	33
Figure 4 : Schéma représentant les différents types de connexons et de canaux associés.	34
Figure 5 : Représentation de la structure d'une connexine.....	37

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 1 : THE EXPRESSION OF MULTIPLE CONNEXINS THROUGHOUT SPERMATOGENESIS IN THE RAINBOW TROUT TESTIS SUGGESTS A ROLE FOR COMPLEX INTERCELLULAR COMMUNICATION.

Figure 1: RT-PCR amplification of cx mRNAs from rainbow trout testes at different stages of spermatogenesis (stages 1 to 6).....	86
Figure 2: Western blot analysis of Cx43, Cx43.4, Cx31, and Cx30 in the trout testis.....	88
Figure 3: Immunolocalization of Cx43 and Cx43.4 in rainbow trout testes.....	89
Figure 4: Immunolocalization of Cx30 and Cx31 in rainbow trout testes.....	91

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 2 : INFLUENCE OF MUNICIPAL EFFLUENTS ON THE EXPRESSION OF CONNEXINS IN THE BROOK TROUT (*Salvelinus fontinalis*) TESTIS.

Figure 1: Hepatic vtg mRNA levels in male brook trout exposed to different concentrations of municipal effluent for 4 (A), and 12 weeks (B).....	116
Figure 2: Expression of testicular <i>cx43</i> (A), <i>cx43.4</i> (B), <i>cx30</i> (C), and <i>cx31</i> (D) mRNA levels in brook trout exposed to different concentrations of municipal effluent for 4 weeks.....	117
Figure 3: Expression of testicular <i>cx43</i> (A), <i>cx43.4</i> (B), <i>cx30</i> (C), and <i>cx31</i> (D) mRNA levels in brook trout exposed to different concentrations of municipal effluent for 12 weeks.....	119

Figure 4: Immunolocalization of Cx43 and Cx43.4 in brook trout testes.....	120
Figure 5: Immunolocalization of Cx30 and Cx31 in brook trout testes.....	122
Figure 6: Expression of vegf mRNA in brook trout testis exposed to municipal effluent for four (A) and twelve weeks (B).....	123

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 3 : SEANONAL VARIATIONS ON TESTICULAR CONNEXIN LEVELS AND THEIR REGULATION IN THE BROOK TROUT, *Salvelinus fontinalis*.

Figure 1: Seasonal variations in the stages of spermatogenesis, gonadosomatic indices (A), plasma testosterone (B), and plasma 11-KT (C) levels.....	155
Figure 2: Seasonal variations in mRNA levels of testicular <i>ar-alpha</i> (A) <i>ar-beta</i> (B), <i>tr-alpha</i> (C) <i>tr-beta</i> (D) and <i>rgthI</i> (E).....	157
Figure 3: Variations in testicular Cx43 (A), Cx43.4 (B), Cx30 (C), and Cx31 (D) protein levels between immature and maturing fish in June and July when fish were at the same stage of spermatogenesis.....	159
Figure 4: Seasonal variations in testicular Cx43 (A), Cx43.4 (B), Cx30 (C), and Cx31 (D) protein levels during gonadal maturation.....	161
Figure 5: Effects of 11-KT on <i>cx43</i> mRNA levels <i>in vitro</i>	162
Figure 6: Effects of either cAMP or T ₃ on <i>cx43</i> mRNA levels.....	163
Figure 7: Effects of cAMP and T ₃ on testicular <i>cx43</i> mRNA levels.....	165

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 4 : CHARACTERIZATION OF BROOK TROUT CX43 PROMOTER: TR-BETA AND c/EBP BINDING SITES CONTRIBUTE TO TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION.

Figure 1: Schematic representation of the <i>cx43</i> promoter.....	199
Figure 2: Determination of the <i>cx43</i> gene transcription start site by RACE.....	200
Figure 3: EMSA on the promoter region of the <i>cx43</i> gene containing the C/EBP binding site (A) and the <i>tr-beta</i> binding site (B).....	201
Figure 4: Identification by RT-PCR of <i>cx43</i> (A) and <i>tr-beta</i> (B) expression in the RTG-2 cell line.....	203

Figure 5: Relative luciferase activity of sequential deletion constructs of the <i>cx43</i> promoter...	204
Figure 6: Relative luciferase activity of the different <i>cx43</i> promoter constructs mutated at the C/EBP or tr-beta binding sites.....	206

TROISIÈME PARTIE, SECTION 1 : DISCUSSION

Figure 1: Activation de la synthèse de <i>cx43</i> en début de spermatogenèse dans les cellules de Sertoli	230
--	-----

LISTE DES TABLEAUX

PREMIÈRE PARTIE, REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau 1: Présentation des différents stades de maturation du testicule	13
Tableau 2: Localisation des Cxs dans les testicules.....	41

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 1 : THE EXPRESSION OF MULTIPLE CONNEXINS THROUGHOUT SPERMATOGENESIS IN THE RAINBOW TROUT TESTIS SUGGESTS A ROLE FOR COMPLEX INTERCELLULAR COMMUNICATION.

Table 1: DNA sequence of RT-PCR primers used to identify different Cxs present in the rainbow trout testis.....	78
Table 2: Similarity of rainbow trout Cx sequences with other vertebrate species.....	80
Table 3: Peptide sequences used for the synthesis of antibodies against Cx30 and Cx31.....	82

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 2 : INFLUENCE OF MUNICIPAL EFFLUENTS ON THE EXPRESSION OF CONNEXINS IN THE BROOK TROUT (*Salvelinus fontinalis*) TESTIS.

Table 1: Sequence of oligonucleotide primers used to amplify the different cxs, vtg, vegf, and gapdh used in this study.....	111
Table 2: Sample size, somatic weight, length of male fish exposed to wastewater effluent for 4 and 12 weeks.....	114

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 3 : SEANONAL VARIATIONS ON TESTICULAR CONNEXIN LEVELS AND THEIR REGULATION IN THE BROOK TROUT, *Salvelinus fontinalis*.

Table 1: Gene-specific primer sequences used for RT-PCR to identify ar-alpha, ar-beta, tr-alpha, tr-beta, rgthl and gadph in adult brook trout testes.....	151
--	-----

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 4 : CHARACTERIZATION OF BROOK TROUT CX43 PROMOTER : TR-BETA AND c/EBP BINDING SITES CONTRIBUTE TO TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION.

Table 1: Gene-specific primer sequences used for RT-PCR to identify <i>cx43</i> in adult brook trout testes.....	190
Table 2: Gene-specific primer sequences used for RACE-PCR in adult brook trout testes.....	191
Table 3: Sequence of the promoter fragments used as DNA probes for EMSA.....	193
Table 4: List of primers used to generate the <i>cx43</i> promoter sequential deletion constructs.....	196

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 5: LOCALIZATION AND REGULATION OF OCCLUDIN IN BLOOD-TESTIS BARRIER OR BROOK TROUT (*Salvelinus fontinalis*).

TROISIÈME PARTIE, SECTION 1 : DISCUSSION

Tableau 1: Similitudes de localisation entre les Cxs de truite et les Cxs de mammifère dans le testicule.....	234
---	-----

AVANT-PROPOS

Trois des chapitres ont été publiés. Même si nous avons conservé le format d'origine pour les références et les normes d'édition propres aux revues, les articles sont présentés à double interligne avec figures et tableaux à la page suivant leur première mention. Les trois revues ont confirmé que ces articles pouvaient être réutilisés en tout ou en partie dans la thèse de l'étudiant.

L'ensemble des figures et des tableaux présentés dans cette thèse ont été préparés par l'auteur.

Afin d'éviter toute confusion durant la lecture du manuscrit, nous présentons ici un tableau synthétisant la nomenclature en vigueur pour désigner les gènes, les acides nucléiques et les protéines chez les poissons et les mammifères qui sera utilisée dans la thèse et les articles.

Espèces	Gène	ADN, ARN	Protéine
Humain	<i>CX43</i>	<i>CX43</i>	CX43
Rongeurs	<i>Cx43</i>	<i>Cx43</i>	CX43
Poissons	<i>cx43</i>	<i>cx43</i>	Cx43

INTRODUCTION

La spermatogenèse est un phénomène complexe, impliquant des hormones, des messagers secondaires, ainsi que de la communication intercellulaire. Les salmonidés possèdent une maturation sexuelle saisonnière. Cela signifie que toutes les cellules germinales se multiplient et se différencient de façon synchrone, afin d'aboutir en fin de maturation, à un testicule rempli de spermatozoïdes. Pour cette raison, ils sont considérés comme de bons modèles d'étude pour la spermatogenèse. On rencontre en élevage aquacole l'apparition de maturation précoce, ce qui signifie que des individus trop jeunes ont une maturation gonadique complète. Ce phénomène pose des problèmes pour l'industrie puisqu'un animal qui investit dans la reproduction investit moins dans la croissance, ce qui entraîne des coûts de production supplémentaires.

Plusieurs études ont montré que la communication intercellulaire joue un rôle essentiel dans l'initiation et la régulation de la spermatogenèse (Pointis *et al.* 2005). Parmi les différentes structures favorisant la communication, les jonctions lacunaires permettent un échange direct entre cellules adjacentes (Goodenough *et al.* 1996). Elles sont formées par des connexons, qui sont des structures hexamériques de protéines transmembranaires appelées connexines (Goodenough *et al.* 1996 ; Lal et Lin 2001). Les jonctions lacunaires permettent le passage bidirectionnel de molécules inférieures à 1 KDa (Goodenough *et al.* 1996). De façon générale, les jonctions lacunaires assurent le maintien de l'homéostasie dans les tissus et la coordination des cellules au sein d'un organe (Oyamada *et al.* 2005). Plusieurs études ont démontré le rôle essentiel des jonctions lacunaires dans la spermatogenèse, et plus particulièrement le rôle de la connexine 43 (*Cx43*, connue aussi sous l'appellation *GJA1*). En effet, une diminution de l'expression de *Cx43* dans le testicule induit une baisse de la fertilité chez les rongeurs ainsi que chez l'humain (Steger *et al.* 1999; Batias *et al.* 2000; Bravo-Moreno *et al.* 2001).

L'étude des Cxs durant la maturation saisonnière des gonades permettra une compréhension précise du rôle des Cxs à chaque stade de maturation. De plus, cela permettra d'apporter une réponse quant à l'implication des Cxs dans l'apparition de la maturation précoce des gonades de salmonidés.

Le principal objectif de ce projet était de cerner le rôle des connexines dans la spermatogenèse de salmonidés. Afin de répondre à cela, cinq objectifs ont été élaborés : 1) identifier et localiser les connexines dans le testicule d'un salmonidé, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*); 2) étudier l'impact des effluents municipaux sur l'expression des connexines chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*); puis, 3) établir le lien entre les hormones stéroïdiennes et l'expression des connexines, toujours chez l'omble de fontaine ; enfin, 4) étudier la régulation du promoteur de *cx43* par l'AMPc et la T₃ chez l'omble de fontaine. L'ensemble de ces expériences a été réalisé soit *in vivo* sur des individus élevés à la station de l'ISMER (Pointe-au-Père, Québec) et échantillonnés mensuellement (de mai à novembre), ou exposés à des effluents municipaux à la station de traitement des eaux usées de Montréal afin d'induire une perturbation dans l'initiation de la spermatogenèse et d'observer une corrélation avec les niveaux de Cxs, soit *in vitro*, grâce au développement d'un protocole de culture primaire de tubules testiculaires, permettant d'induire tous les stades de maturation, avant le frai, en 30 jours.

Cette thèse débute par une revue de littérature afin de présenter les différents thèmes abordés. La première section présente la spermatogénèse chez les salmonidés, le phénomène de la maturation précoce et le modèle animal choisi durant l'étude, l'omble de fontaine. La deuxième section décrit en détails la structure et les caractéristiques des jonctions lacunaires. Enfin, la troisième et dernière section est un état des connaissances sur les facteurs modulant la spermatogenèse chez les poissons.

La deuxième partie de la thèse est constituée des manuscrits rédigés à partir des résultats obtenus lors de ce doctorat. Le premier chapitre a été publié en 2007 dans la revue « *Biology of Reproduction* » et traite de l'identification et de la localisation de 4 Cxs dans le testicule de truite arc-en-ciel. Le deuxième a été publié en 2008 dans la revue « *Aquatic Toxicology* » et montre l'influence des effluents municipaux sur les niveaux d'expression des Cxs. Le troisième chapitre, publié dans la revue « *General and Comparative Endocrinology* », présente le suivi des hormones stéroïdiennes, de différents récepteurs nucléaires (récepteurs aux androgènes, aux hormones thyroïdiennes, à la gonadotropine I), et des 4 Cxs, durant la spermatogenèse de l'omble de fontaine, afin de mieux cerner le rôle spécifique des Cxs dans la maturation des gonades mâles. Le quatrième chapitre, dont l'article est en préparation pour soumission, établit l'activation de la *cx43* par la fixation d'éléments de réponse à l'AMPc et du récepteur de type *beta* des hormones thyroïdiennes.

La thèse se termine par une discussion sur l'ensemble des résultats obtenus et propose de nouvelles hypothèses. La contribution des travaux réalisés dans le cadre de ce projet de doctorat dans les domaines de la reproduction et de l'écotoxicologie est également abordée.

PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LITTÉRATURE

PREMIÈRE PARTIE, SECTION 1 : LA SPERMATOGENÈSE CHEZ LES SALMONIDÉS

1.1 Présentation du modèle d'étude : l'omble de fontaine

La famille des salmonidés compte 66 espèces réparties en 11 genres différents (Froese et Pauly 2004). Parmi elles, se trouvent certaines des espèces les plus importantes d'un point de vue économique et élevées depuis plusieurs décennies à différents endroits de la planète.

En Amérique du Nord, on recense 7 genres et 44 espèces différents de salmonidés qui présentent de fortes disparités phénotypiques (Burr et Mayden 1992). Parmi elles, l'omble de fontaine est une espèce présente dans les cours d'eaux froides et lacs de haute altitude en Amérique du Nord et dans d'autres pays de l'hémisphère Sud. Une des principales caractéristiques de l'omble de fontaine est sa capacité à occuper des environnements d'eaux douces, comme d'eaux salées (Magnan *et al.* 2002). Mais tous les individus ne sont pas présents dans les deux milieux. En effet, parmi les individus retrouvés en rivière, certains ne migrent pas et restent en eau douce en tous temps ; on appelle ces individus des « résidents ». D'autres en revanche, vont effectuer une migration en mer, acquérir les caractères adultes, puis remonter la rivière afin de se reproduire ; ce sont des individus « anadromes » (Curry 2005). On note par ailleurs une différence significative de taille entre les anadromes et les résidents, due à une croissance accrue lors du séjour en mer des individus anadromes (McCormick et Naiman 1984; Björnsson *et al.* 1989; Clarke et Blackburn 1994).

L'omble de fontaine constitue l'espèce de poisson possédant la plus forte valeur économique pour l'aquaculture québécoise, représentant environ 50% de la production piscicole (site internet du MAPAQ). Le François *et al.* (2002) ont comparé le potentiel aquacole de 47 espèces différentes de poissons, dont 4 espèces de salmonidés. En se basant sur les caractéristiques du cycle vital (vitesse de croissance, âge et taille à la maturité sexuelle), les auteurs ont noté le fort potentiel aquacole de cette espèce au Québec, que ce soit en eau douce comme en eau de mer.

Depuis plusieurs années, des études indiquent une baisse régulière des stocks naturels de plusieurs espèces de poissons, dont les salmonidés, dans les rivières de l'est du Canada. L'aquaculture est considérée comme une alternative durable afin de suppléer les manques engendrés par la baisse de ces stocks. La salmoniculture, en permettant de diversifier le nombre d'espèces élevées, contribue ainsi à la stabilisation économique de ce secteur.

Les poissons sont les vertébrés qui possèdent le plus fort taux de croissance et il est relativement facile de faire un suivi sur plusieurs générations. De plus, la maturation sexuelle est un phénomène annuel chez l'omble de fontaine mâle et femelle. Il est alors possible de suivre précisément l'évolution du testicule stade après stade et d'étudier les processus de régulation intervenant à chacun des stades de la spermatogenèse.

1.2 La spermatogenèse

Chez les poissons, comme pour d'autres espèces, la spermatogenèse s'effectue en quatre étapes : 1) la prolifération spermatogoniale et leur différenciation ; 2) la méiose au sein des spermatocytes et la formation des spermatides ; 3) la spermiogenèse, qui est la maturation des

spermatides en spermatozoïdes ; enfin 4) la spermiation (McLachlan *et al.* 2002; Yoshida *et al.* 2007). Cependant, il a été démontré que le développement et la maturation des gonades chez les salmonidés sont deux phénomènes qui dépendent avant tout des réserves énergétiques de l'individu, et plus particulièrement des réserves lipidiques (Rowe et Thorpe 1990; Roche-Mayzaud *et al.* 1998). L'étude de Kadri *et al.* (1995) a montré que le saumon atlantique (*Salmo salar*) ne cessait de s'alimenter qu'une fois atteint le taux de réserves nécessaires pour assurer la reproduction. Une autre étude, portant sur la même espèce, a montré que si un individu ne pouvait combler les réserves énergétiques entre les mois de mars et mai, alors la maturation des gonades était stoppée et reportée à l'année suivante (Rowe et Thorpe 1990).

1.2.1 Structure du testicule

Les testicules des Salmoniformes sont de type tubulaire réticulé. Cela signifie que les tubules spermatiques forment un réseau continu et ne se terminent pas en culs-de-sacs à la périphérie des testicules. Les testicules de truite immature se reconnaissent de par leur forme, leur couleur et leur structure histologique. En effet, il s'agit d'organes pairs, rosés, aplatis et ne contenant que des spermatogonies, avant l'initiation de la spermatogenèse (van den Hurk et Slof 1981).

À l'arrivée de la période de frai, les tubules séminifères contiennent majoritairement des spermatozoïdes matures, prêts à féconder les ovocytes (Mellinger 2002). Une fois dans la lumière des tubules, les spermatozoïdes sont mélangés avec peu de fluide, augmentant ainsi leur concentration. Avant la libération des gamètes, les spermatozoïdes sont « hydratés » à nouveau. Les spermatoblastes vont alors libérer leurs spermatozoïdes directement dans le lobule qui est alors en continuité avec les voies spermatiques. Après éjaculation, les lobules se rétractent grâce

à l'action de cellules contractiles présentes dans le tissu conjonctif qui entoure le lobule. Durant la rétraction, la lumière des lobules dans le spermiducte disparaît.

Une fois la période de reproduction passée, des études montrent que toute la paroi du lobule est renouvelée en vue de la spermatogenèse de l'année suivante (Dziewulska et Domagala 2003; 2004).

1.2.2 Les étapes de la spermatogenèse

On distingue deux phases dans la maturation des gonades mâles : la spermatogenèse, qui comprend l'augmentation du nombre de spermatogonies par mitoses et la méiose ; et la spermiogenèse, qui est la différentiation cellulaire des spermatides en spermatozoïdes (Figure 1). Chez les individus immatures ainsi qu'au tout début du cycle de maturation sexuelle, les seules cellules germinales présentes sont les spermatogonies. On distingue deux populations de cellules spermatogoniales : les spermatogonies de type A, qui constituent le bassin de cellules souches permettant le renouvellement des cellules germinales lors de la maturation suivante et les spermatogonies de type B qui sont différencierées et vont engendrer les spermatoocytes.

Les spermatogonies de type A sont moins nombreuses que celles de type B et ne sont pas reliées par des ponts inter-cytoplasmiques (Dziewulska et Domagala 2003). Lors de l'initiation de la spermatogenèse, les spermatogonies de type A vont entrer dans une série de mitoses (le nombre varie suivant les espèces) ; il en résulte la formation de spermatogonies de type B qui sont reliées par des ponts inter-cytoplasmiques (Fishelson 2003).

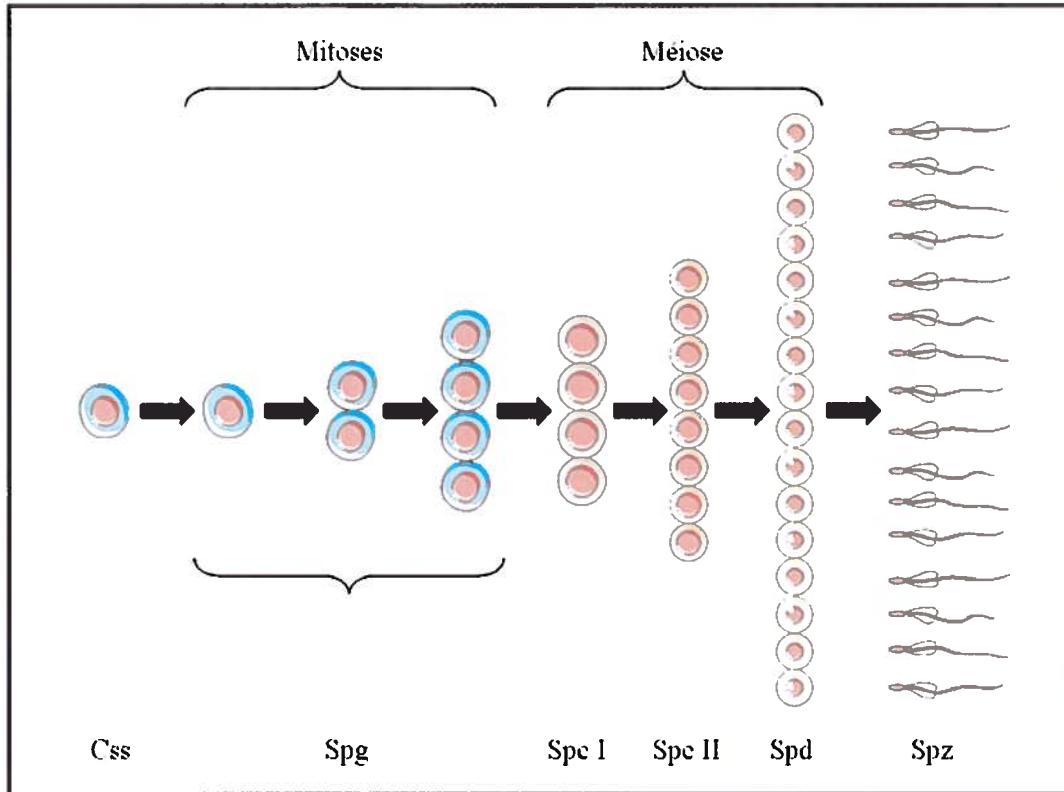


Figure 1: Présentation des différentes étapes de la spermatogenèse. Une cellule souche spermatogoniale (Css) va se différencier en une spermatogonie (Spg) qui va par la suite se multiplier par mitoses successives. Les spermatogonies vont ensuite se différencier en spermatocytes de type I (Spc I) qui vont entrer en méiose et donner les spermatocytes de type II (Spc II) après la première division, puis les spermatides (Spd) après la seconde division de méiose. La phase de spermiogenèse assure la maturation des spermatides en spermatozoïdes (Spz).

Les spermatogonies de type B vont ensuite se différencier et donner des spermatocytes de premier ordre. La méiose se déroule en deux étapes : la première division va donner deux cellules filles identiques, des spermatocytes de second ordre à $2n$ chromosomes ; la seconde division va donner deux autres cellules, des spermatides à n chromosomes.

La spermogenèse entre alors en jeu afin de donner un faisceau isogène de spermatozoïdes (Sacolie et Benfey 2005). Les différentes espèces de poissons présentent des spermatozoïdes très variés (Jamieson 1991; Cosson *et al.* 2008). Durant cette étape, on observe une diminution du cytoplasme des spermatides, la condensation de la chromatine, et la mise en place du flagelle (Fishelson 2003). Les salmonidés possèdent des spermatozoïdes uniflagellés, constitués de trois parties distinctes que sont la tête, la pièce centrale, et la queue. Ils sont, de plus, dépourvus d'acrosome (Billard 1983; Lahnsteiner *et al.* 1996)

Afin de décrire les différents stades de la spermogenèse chez l'omble de fontaine, nous utiliserons les travaux de Shulz (1984) et de Bouma et Nagler (2001), qui ont décrit les étapes de la spermogenèse chez la truite arc-en-ciel (Tableau 1). Six stades ont été identifiés : le stade 1 débutant à la fin de la période de latence hivernale, jusqu'au stade 5 lorsque le testicule est constitué essentiellement de spermatozoïdes prêts pour le frai. Le stade 6 est le stade de résorption du testicule qui suit la reproduction.

Tableau 1: Présentation des différents stades de maturation du testicule. SPG: Spermatogonies; SPC I: Spermatocytes de type I; SPC II: Spermatocytes de type II; SPD: Spermatides; SPZ: Spermatozoïdes.

Stades de maturation	Stades des cellules germinales				
	SPG	SPC I	SPC II	SPD	SPZ
I	++++				
II	+++	++	++		
III	++	++	+++	+	
IV	+		+	++	+++
V	+		+	+	++++
VI	++		+	+	+++

1.3 Le contrôle hormonal de la spermatogenèse : l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique

Le développement des gonades est sous la dépendance du système endocrinien, et résulte plus précisément de la communication entre le cerveau, l'hypophyse et les gonades.

La première hormone qui déclenche la cascade de réactions est la gonadolibérine (GnRH *Gonadotropin-Releasing Hormone*), qui est sécrétée par l'hypothalamus. Il s'agit de l'hormone principalement impliquée dans la production de gonadotropines (Lethimonier *et al.* 2004). La GnRH est constituée d'un décapeptide pour lequel 14 variants ont été identifiés chez les vertébrés. Chaque espèce synthétise deux à trois types de molécules de GnRH différents. Parmi différentes espèces de téléostéens, on observe que les formes GnRH-II de poulet et GnRH de saumon étaient les plus communes, même si certaines espèces expriment parfois un troisième type (King et Millar 1992; Lescheid *et al.* 1997). Chaque type de GnRH est synthétisé par des régions distinctes du cerveau. Par exemple, Sherwood et Adams (2005) ont montré chez les poissons que les neurones situés dans l'aire préoptique, qui innervent l'hypophyse, produisaient la GnRH de saumon ou le troisième type de GnRH. Étant donné la localisation particulière de ces neurones, le type de GnRH qu'ils sécrètent est la forme majoritairement présente dans l'hypophyse (Collins *et al.* 2001; Amano *et al.* 2002).

La biosynthèse et la libération des gonadotropines sont sous la dépendance directe de neurones peptidergiques du système nerveux central : les neurones à GnRH, dont la fréquence de libération est pulsatile (Habibi 1991). Toutefois, les profils plasmatiques des gonadotropines étant différents suivant les phases du cycle de spermatogenèse, une autonomie partielle des systèmes

de contrôle entre aussi en jeu. Cette régulation différentielle est assurée par des rétroactions gonadiques (Kawauchi *et al.* 1989; Amano *et al.* 1994; Schulz *et al.* 2001; Yaron *et al.* 2001; Swapna et Senthilkumaran 2007).

La GnRH induit ensuite la production des gonadotropines par l'hypophyse, qui elles-mêmes stimulent la sécrétion gonadique des stéroïdes sexuels. Des récepteurs de la GnRH (GnRH-R) ont été identifiés chez plusieurs espèces de téléostéens (Madigou *et al.* 2000; Madigou *et al.* 2002). Ces récepteurs sont constitués de sept domaines transmembranaires ; de par leurs caractéristiques, les GnRH-R ont été classés en deux types différents, chacun possédant plusieurs sous-types (Lethimonier *et al.* 2004). Chez les poissons, la présence de ces récepteurs est montrée dans les testicules de truite arc-en-ciel. De plus, Madigou *et al.* (2002) ont observé, toujours chez la truite arc-en-ciel, une augmentation du taux d'ARNm d'un des GnRH-R en présence de la GnRH correspondante, ce qui suggère que la GnRH agit directement dans le testicule pour réguler les fonctions gonadiques. Si l'action spécifique de la GnRH dans le testicule des téléostéens est encore inconnue, des travaux portant sur des ovaires de poisson rouge, *Carassius auratus*, ont montré que la GnRH stimulait directement la synthèse d'hormones stéroïdes dans les follicules ovariens (Pati et Habibi 2000).

1.3.1 Les gonadotropines (GtH)

La première source du contrôle endocrinien est la production de gonadotropines par l'hypophyse. Les gonadotropines sont des hormones glycoprotéiques, constituées de deux sous-unités différentes, appelées α et β , associées de manière non-covalente en structure quaternaire (Schulz *et al.* 2001). Pour une espèce donnée, la sous-unité α possède une séquence d'acides

aminés totalement identique pour toutes les hormones glycoprotéiques. En revanche, la sous-unité β présente une séquence variable d'une hormone à l'autre (Schulz *et al.* 2001).

Chez les poissons, comme chez les mammifères, deux types de gonadotropines ont été identifiés, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH). Chez les poissons, ces deux hormones sont aussi appelées GtH I (qui est analogue à FSH) et GtH II (qui est analogue à LH) (Swanson *et al.* 1991; Van der Kraak *et al.* 1992). Ces deux gonadotropines sont produites dans l'hypophyse mais par deux types cellulaires différents (Nozaki *et al.* 1990a; b). En effet, des études immunohistochimiques ont révélé que les cellules situées au niveau de la *pars distalis* proximale, associées avec les cellules somatotropes montraient un marquage spécifique pour la FSH alors que les cellules marquées avec l'anticorps spécifique pour la LH étaient situées dans la partie centrale de la *pars distalis*; de plus leur sécrétion n'est pas identique durant la maturation des gonades chez la truite arc-en-ciel (Gomez *et al.* 1999).

Une étude réalisée *in vitro* par Loir (1999) a montré le rôle essentiel des GtH dans la spermatogenèse, dans laquelle une population de cellules spermatogoniales a été isolée puis cultivée. L'ajout de FSH dans le milieu de culture a permis d'induire la stimulation des spermatogonies de type A et B. Cette étude n'a toutefois pas permis de démontrer si l'action de la FSH sur les spermatogonies s'effectuait directement sur celles-ci ou par l'intermédiaire d'hormones stéroïdes dont elle modulerait l'expression. La LH ne modifie pas la stimulation des spermatogonies en stade I. En revanche, elle peut les stimuler lorsque le testicule est en stade III de maturation, c'est-à-dire au début de la spermogénèse. Cette observation s'explique par le fait qu'*in vivo* la LH n'est pas sécrétée en début du cycle de spermatogenèse, mais intervient plus tardivement, lors du stade III.

La FSH est synthétisée en tout début de maturation des gonades et permet d'activer la synthèse des hormones stéroïdes, la croissance et la différenciation des gonades (Miura *et al.*

1991; Nagahama *et al.* 1994). Le taux de FSH diminue avant la maturation finale des gonades. Des expériences *in vitro* sur le testicule d'anguille ont démontré que la FSH était essentielle afin d'induire l'ensemble des stades de spermatogenèse (Miura *et al.* 1996). La FSH va ensuite interagir avec des récepteurs situés sur les cellules de Leydig et inhiber la production de protéines inhibitrices de la spermatogenèse comme ZP2 et ZP3 (Miura *et al.* 1998). La liaison de la FSH avec les récepteurs va aussi activer une série de réactions enzymatiques aboutissant à la production de 11-CT. La 11-CT agit ensuite sur les cellules de Sertoli qui synthétisent l'activine- β , capable d'induire la prolifération des spermatogonies (Nagahama *et al.* 1997).

La castration de saumons coho mâles, *Oncorhynchus kisutch*, induit une diminution des concentrations en stéroïdes sexuels et une augmentation des taux plasmatiques de FSH et LH, suggérant que les stéroïdes sexuels exercent un rétro-control négatif sur les GtH (Larsen et Swanson 1997). De plus, cette étude a montré que l'augmentation des deux GtH n'était pas identique durant la maturation. En effet, le taux de FSH augmentait durant toute la spermatogenèse alors que la concentration de LH augmentait uniquement durant la spermiation.

1.3.2 Les récepteurs des gonadotropines

Chez les salmonidés (Itoh *et al.* 1988; Suzuki *et al.* 1988a; b; Swanson *et al.* 1991), comme chez d'autres espèces de poissons (Lin *et al.* 1992; Van der Kraak *et al.* 1992), deux types de récepteurs aux gonadotropines ont été identifiés, le RFSH (aussi appelé GtHR I) et le RLH (aussi appelé GtHR II). Le RFSH peut se lier aux deux types de gonadotropines alors que le RLH ne se fixe uniquement qu'à la LH (Miwa *et al.* 1994). Le complexe ainsi formé va moduler l'expression de gènes *via* des messagers secondaires impliquant l'AMPc (Young *et al.* 1983; Kanamori et Nagahama 1988). En effet, Oba *et al.* (1999a) ont observé une augmentation

d'AMPc dans les cellules COS-7 transfectées avec le récepteur RFSH, en présence de gonadotropines.

Les RFSH sont présents durant toute la spermatogenèse et sont localisés sur la membrane des cellules de Sertoli. Les RLH sont détectés quant à eux, uniquement lors de la spermiation et sont localisés au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules de Leydig (Miwa *et al.* 1994). L'expression et la localisation des récepteurs dans les gonades mâles sont spécifiques pour chacun des deux récepteurs aux gonadotropines, ce qui suggère un rôle différent des deux hormones dans le testicule.

Chez les mammifères, FSH a pour cible les cellules de Sertoli, et LH les cellules de Leydig. Mais il faut tout de même noter la présence de récepteurs à la FSH dans la membrane des cellules de Leydig chez les mammifères, alors que chez le saumon coho, RFSH est principalement localisé à la membrane des cellules de Sertoli, et les cellules de Leydig ne possèdent que le RLH (Miwa *et al.* 1994)

1.4 Les hormones stéroïdes

L'importance des hormones stéroïdes dans la reproduction des mâles téléostéens a été montrée par plusieurs études et rapportée par Borg (1994). Les androgènes sont les intermédiaires majeurs des GtH dans la régulation de la spermatogenèse (Miura *et al.* 1991), du développement des caractéristiques sexuelles secondaires, comme les modifications de la robe (Mayer *et al.* 1992) et la modification du comportement (Kobayashi *et al.* 1998). Ils sont aussi impliqués dans les phénomènes de changements de sexe, comme chez le poisson perroquet, *Sparisoma viride* (Cardwell et Liley 1991). Chez les mâles salmonidés, de fortes concentrations d'hormones

stéroïdes ont été observées durant la spermatogenèse (Scott et Sumpter 1989). En effet, les auteurs ont constaté de très fortes augmentations des concentrations de T et 11-CT durant la phase de méiose. Les concentrations de 11-CT diminuaient lors de la spermiogenèse, alors que celles de T restaient élevées jusqu'au frai. Cependant, aucune variation de concentration d'hormones n'a pu être associée avec un stade de maturation (Scott et Sumpter 1989).

On distingue deux types de cellules dans le testicule : les cellules somatiques et les cellules germinales. Le rôle des cellules somatiques est d'assurer l'apport en nutriments au tissu en développement, mais aussi de synthétiser et de fournir les hormones au milieu afin de permettre le bon développement du testicule. Les cellules de Sertoli permettent le développement des cellules germinales (Grier 1993). Lors de la maturation des gonades, la taille des spermatocystes augmente et la paroi, constituée par les cellules de Sertoli, devient de plus en plus fine. L'autre type majeur de cellule somatique constituant le testicule de salmonidé est la cellule de Leydig. Ces cellules sont le siège de la synthèse des hormones stéroïdes (Pudney 1996).

La synthèse des hormones stéroïdes chez les poissons, tout comme chez d'autres vertébrés, met en jeu une série complexe d'enzymes (Nagahama 1994). Plusieurs gènes, exprimés dans les cellules somatiques des testicules sont impliqués dans leur synthèse, permettant ainsi la production d'un panel d'hormones (Omura et Morohashi 1995). Des études ont révélé la présence d'enzymes stéroïdes telles que P450scc, P450c17, la 11 β -hydroxylase, dans les cellules de Leydig mais pas dans les cellules germinales, ni dans les cellules de Sertoli (Kobayashi *et al.* 1998). Ces résultats démontrent que chez les poissons, les cellules de Leydig, sont le principal site de production des androgènes.

Deux hormones sont identifiées comme jouant un rôle majeur dans la régulation de la spermatogenèse : la 11-CT et la T dont les concentrations peuvent parfois être supérieures à celles de 11-CT. Une autre hormone, la 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnene-3-one (17 α ,20 β -DHP),

joue aussi un rôle lors de la fin du cycle de maturation des gonades (Antonopoulou *et al.* 1999). Scott et Sumpter (1989) ont montré que la concentration de 17 α ,20 β -DHP n'était pas associée aux stades de maturation, mais à la présence des spermatides et des spermatozoïdes dans le testicule de truite arc-en-ciel. Cette étude montre l'importance de la 17 α ,20 β -DHP lors de la maturation finale des gonades. Miura *et al.* (1996) ont montré l'action des androgènes sur la prolifération et la maturation des cellules germinales, mais ces hormones agissent aussi au niveau de l'apparition de caractères sexuels secondaires et de comportements associés à la reproduction (Borg 1994).

La stéroïdogenèse débute avec la synthèse du précurseur : la prégnénolone, *via* le clivage du cholestérol par P450scc, qui est une enzyme mitochondriale (Figure 2). Cette synthèse est ensuite suivie par la production de progestérone, de 17 α -hydroxypregnénolone, de 17 α -hydroxyprogestérone, de déhydroépiandrostérone, et d'androsténédione, grâce à l'enzyme 17 α -hydroxylase, en combinaison avec la 3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase (Nagahama 1994). L'androsténédione peut ensuite être convertie en testostérone par la 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase. Cavaco *et al.* (1998) ont observé dans des testicules de carpes, *Cyprinus carpio*, *in vitro*, la conversion de la prégnénolone en androsténédione, alors qu'*in vivo* l'androgène circulant le plus abondant est la 11-CT. Ces résultats suggèrent donc la conversion de la 11 β -hydroxyandrosténédione en 11-CT par la 11 β -hydroxystéroïde déhydrogénase.

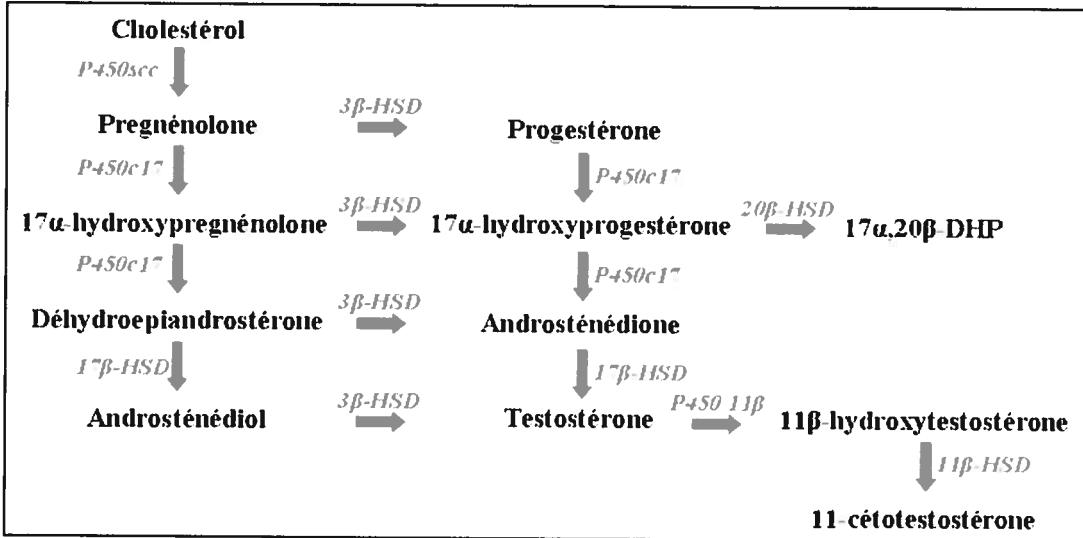


Figure 2: Présentation schématique de la synthèse des différentes hormones stéroïdiennes chez les salmonidés. ((Inspiré de Faye 2006)).

1.4.1 La 11-cétotestostérone (11-CT)

La 11-CT est une hormone qui joue un rôle important lors de l'initiation, mais aussi à la fin de la spermatogenèse. En effet, Miura *et al.* (1994) ont montré que lors du stade I de maturation, alors que le testicule n'est constitué que de spermatogonies de types A et B, la 11-CT est nécessaire à l'initiation de la spermatogenèse. Par ailleurs, d'autres études montrent que la 11-CT joue un rôle prédominant en fin de spermatogenèse (Fostier *et al.* 1984 Hourigan *et al.* 1991; Antonopoulou *et al.* 1995). Une étude réalisée par Amer *et al.* (2001), chez *Hucho perryi*, a montré que les changements histologiques étaient corrélés avec les variations des concentrations de 11-CT. La faible sécrétion de 11-CT active la prolifération des spermatogonies de type A, puis leur division en spermatogonies de type B. L'augmentation de la concentration de 11-CT lors des stades suivants, coïncide aussi avec l'apparition des spermatozoïdes, ce qui suggère l'importance de cette hormone pour l'initiation de la spermatogenèse, mais aussi pour la production de spermatozoïdes.

L'action de la 11-CT s'effectue plus précisément au niveau de l'activation des cellules de Sertoli. Ces cellules produisent certains facteurs de croissance, comme l'activine B, qui induisent la mitose des spermatogonies, permettant ensuite la formation des spermatocytes (Miura *et al.* 1991; Nagahama 1994; Miura et Miura 2003). Les concentrations effectives de 11-CT nécessaires, afin d'induire une spermatogenèse complète, varient en fonction des espèces. Si 10 ng/ml de 11-CT induisent uniquement la prolifération spermatogoniale chez *Hucho perryi*, la même concentration induit une spermatogenèse complète *in vitro* chez l'anguille japonaise, *Anguilla japonica*, (Miura *et al.* 1991). Ces études indiquent que l'implication des hormones stéroïdiennes peut varier suivant les espèces, et donc que les molécules associées aux phases de mitoses et de méioses sont, elles aussi, spécifiques pour chaque espèce (Miura *et al.* 1997; Loir 1999).

1.4.2 La testostérone (T)

Si la 11-CT permet la spermatogenèse chez plusieurs espèces de téléostéens, il ne semble pas en être de même pour la testostérone chez les mêmes espèces. En effet, l'injection seule de testostérone chez le poisson chat africain, *Clarias gariepinus*, n'a qu'un effet très limité sur le déroulement de la maturation (Cavaco *et al.* 1998). En revanche, Cochran (1992) a observé que la T permettait le développement de la maturation des gonades chez le choquemort, *Fundulus heteroclitus*.

Plus généralement, les actions de la testostérone semblent se situer à plusieurs niveaux. Cavaco *et al.* (2001b) ont montré qu'elle était nécessaire afin d'induire une activité gonadotrope chez le juvénile du poisson-chat africain, *Clarias gariepinus*. D'autres travaux réalisés par Cavaco *et al.* (2001a) montrent quant à eux, que la testostérone a un effet inhibiteur de la

stimulation induite par la 11-CT. Il semble donc qu'elle joue un rôle dans le contrôle de l'activité des cellules germinales.

La testostérone pourrait agir soit directement *via* les récepteurs aux androgènes, soit *via* les récepteurs aux œstrogènes, après aromatisation (Larsson *et al.* 2002).

1.4.3 Le 17 β -oestradiol (E₂)

La 17 β -oestradiol (E₂) est connue en tant qu'œstrogène chez les vertébrés. Elle joue cependant un rôle dans le contrôle de la spermatogenèse et la préparation du tractus reproductif chez les rats mâles (Hess *et al.* 1997). Chez l'anguille, Miura *et al.* (1999) ont montré que E₂ stimulait la prolifération des spermatogonies dans le testicule d'anguilles japonaises. Cependant, à la différence de la prolifération engendrée par la 11-CT ou DHP, celle induite par E₂ n'est pas suivie par une différenciation des cellules. Il semblerait donc qu'E₂ soit plus spécifiquement impliqué dans le renouvellement des cellules souches spermatogoniales.

Contrairement aux variations de 11-CT et de T, la concentration de E₂ ne présente pas de variations caractéristiques durant la maturation des gonades chez *Hucho perryi* (Amer *et al.* 2001). La production, comme l'action de l'E₂, semblent donc restreintes à des moments précis durant la spermatogenèse, comme les phases de mitoses et de méioses. D'autres études sont nécessaires afin de mieux cerner le rôle particulier de E₂ dans la spermatogenèse des poissons, et des salmonidés en particulier.

1.4.4 Les récepteurs aux androgènes (RA)

Les actions de la 11-CT et de la T, lors de la maturation des gonades, sont clairement distinctes. Deux types de récepteurs (*ar-alpha* et *ar-beta*) différents ont été identifiés dans les gonades de poissons téléostéens (Ikeuchi *et al.* 1999; Sperry et Thomas 1999a; b; Takeo et Yamashita 1999). Plusieurs études ont démontré que les affinités de ces deux récepteurs étaient différentes pour chaque hormone. En effet, si l'un des récepteurs se lie indifféremment à tous les stéroïdes, le second possède une affinité plus forte pour la T (Takeo et Yamashita 1999; Sperry et Thomas 2000). Les travaux d'Ikeuchi *et al.* (2001) ont montré que les deux types de récepteurs étaient uniquement localisés dans les cellules de Sertoli et de Leydig, et qu'aucun marquage n'était observé dans les cellules germinales. Ces résultats suggèrent que l'action des androgènes sur la maturation des cellules germinales s'effectue *via* les cellules somatiques.

Le mécanisme d'action des hormones stéroïdiennes implique le passage de l'hormone au travers de la membrane cytoplasmique des cellules cibles, puis la liaison au récepteur spécifique situé sur la membrane nucléaire. Une fois activé, le complexe va se lier à des éléments de réponse sur des gènes cibles et influencer leur transcription.

1.4.4.1 La structure des récepteurs

Les RA appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires qui inclue notamment les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, les récepteurs à la vitamine D3 et les récepteurs à l'acide rétinoïque. Ils possèdent une structure moléculaire similaire, qui comprend cinq domaines distincts (Mangelsdorf *et al.* 1995). Le domaine de transactivation est situé dans la partie N-terminale et est responsable du recrutement des co-activateurs durant la transcription par le domaine d'activation AF-1. On observe ensuite un domaine de liaison à l'ADN qui est la région

de la protéine qui se lie avec les éléments de réponse du gène cible, une fois activée par la liaison avec le récepteur. Ce domaine est fortement conservé et possède deux doigts de zinc qui vont faciliter la liaison entre le récepteur et la chromatine (Umesono et Evans 1989; Ikeuchi *et al.* 1999). Ce domaine est aussi responsable de la dimérisation du récepteur et possède une séquence de localisation nucléaire qui identifie le récepteur dans le noyau (Umesono et Evans 1989). Le domaine suivant diffère en fonction du type de récepteur. Le domaine qui suit est celui assurant la liaison avec le ligand. Il est situé sur la partie C-terminale de la protéine et est fortement conservé parmi les différentes espèces. Ce domaine possède aussi une séquence de localisation nucléaire ainsi qu'un domaine de transactivation, AF-2, responsable du recrutement de co-activateurs (Dehm et Tindall 2006; Estebanez-Perpina *et al.* 2007).

1.4.4.2 Les récepteurs aux androgènes chez les salmonidés

Chez plusieurs espèces de poissons, dont certaines espèces de salmonidés comme la truite arc-en-ciel, deux types différents de RA ont été identifiés : *ar-alpha*, et *ar-beta* (Ikeuchi *et al.* 1999). Chez les salmonidés, Takeo et Yamashita (1999) ont observé un fort degré d'homologie entre les deux types de récepteurs et ont émis l'hypothèse que cette homologie serait due à la tétraploïdie que l'on rencontre chez ces espèces.

Cependant, la présence de deux types de récepteurs ne signifie pas pour autant qu'ils soient tous les deux fonctionnels. Des études réalisées chez la truite arc-en-ciel ont montré que seul *ar-alpha* était fonctionnel, alors que chez l'anguille japonaise les deux types de récepteurs le sont (Ikeuchi *et al.* 1999; Takeo et Yamashita 1999). De plus, l'affinité de ces récepteurs pour les androgènes varie suivant les espèces. En effet, chez l'anguille japonaise, *ar-alpha*, et *ar-beta* possèdent la même affinité pour la DHT et la 11-CT, alors que l'affinité pour la T est beaucoup moins élevée (Ikeuchi *et al.* 1999).

Ces différences d'affinité pour les hormones stéroïdiennes pourraient s'expliquer par les structures des deux types de récepteurs. En effet, chez les mammifères, le récepteur aux androgènes possède trois régions de transactivation, dont deux particulièrement actives, AF-1 et AF-5, et une autre, AF-2, à plus faible activité (Gronemeyer et Laudet 1995; Olsson *et al.* 2005). L'activation d'AF-1, AF-2 et AF-5 est dépendante des co-activateurs présents afin d'initier la transcription ; il est donc possible que des différences structurelles dans ces régions, au niveau des deux types de récepteurs chez les salmonidés, expliquent les variations de sensibilité aux différentes hormones (Heinlein et Chang 2002).

Les travaux de Sperry et Thomas (1999a) sur le tambour brésilien, ont permis de démontrer que les deux isoformes des RA (RA1 et RA2) identifiés chez cette espèce, possédaient des différences notables dans leur capacité de liaison avec les hormones et dans leur distribution tissulaire. En effet, alors que RA1 possède une forte affinité pour T et est présent principalement dans le cerveau, RA2 possède plus d'affinité pour la DHT et est surtout retrouvé dans le cerveau (comme RA1) mais aussi dans les gonades. Ces différences dans la distribution et l'affinité de ces deux types de récepteurs suggèrent que RA1 et RA2 possèdent des fonctions physiologiques différentes.

Cependant, si de nombreuses études ont porté sur l'expression des RA dans les testicules de différentes espèces de poissons, leur localisation tout comme leur régulation restent inconnues.

1.5 Les hormones thyroïdiennes

Depuis les années 1950, plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer la nature du contrôle de l'hypothalamus sur la glande thyroïde des poissons (Leatherland 1994). Ces études

ont montré une diminution de l'activité de la glande thyroïde chez des poissons hypophysectomisés. À l'inverse, *in vitro*, on observe une augmentation de l'activité des follicules thyroïdiens lorsqu'on ajoute des extraits hypophysaires dans le milieu de culture (Eales 1979).

Chez les mammifères, l'action des hormones thyroïdiennes sur les cellules de Sertoli est bien connue. En effet, T₃ inhibe la prolifération et induit la différenciation des cellules de Sertoli chez les rats (Cooke et Meisami 1991; Cooke *et al.* 1991; van Haaster *et al.* 1993). De plus, des récepteurs aux hormones thyroïdiennes ont été identifiés et localisés dans les noyaux des cellules de Sertoli, ce qui suggère une régulation directe de l'activité de ces cellules (Palmero *et al.* 1995; Buzzard *et al.* 2000). Les actions des hormones thyroïdiennes sur les poissons sont très nombreuses ; elles jouent un rôle sur la croissance, la pigmentation, le développement du système nerveux, l'osmo-régulation, les processus migratoire, et la reproduction (Blanton et Specker 2007; Arjona *et al.* 2008). Mais si ces hormones jouent un rôle dans la reproduction chez les poissons, peu d'études ont été réalisées afin de comprendre avec précision le rôle des hormones thyroïdiennes sur la spermatogenèse.

1.5.1 La thyonine (T₃) et la thyroxine (T₄)

Le système thyroïdien est contrôlé par l'axe hypophysaire (Eales et Brown 1993). Les cellules de l'hypothalamus agissent directement sur les cellules thyréotropes de l'hypophyse et régulent ainsi la sécrétion de la thyrotrophine (TSH). La TSH agit sur la glande thyroïde et déclenche la synthèse, puis la sécrétion, des deux hormones, 3,5,3'-triodo-L-thyronine (T₃), et L-thyroxine (T₄), qui vont ensuite agir sur plusieurs systèmes et réguler le développement, le métabolisme, et l'homéostasie chez les poissons (Blanton et Specker 2007).

Chez les poissons, T₄ est principalement sécrétée par la glande thyroïde et la T₃ est synthétisée par déiodination de la boucle aromatique. Il s'agit d'une étape essentielle de l'action régulatrice des hormones thyroïdiennes car la T₃ possède dix fois plus d'affinité que T₄ pour les récepteurs nucléaires. On considère donc la T₄ comme une pro hormone faiblement active et la T₃ comme l'hormone active (Cyr et Eales 1996).

Plusieurs études ont montré l'existence d'une relation entre les hormones thyroïdiennes et l'activité gonadique chez les poissons (Nagahama 1983; Leatherland 1994). En effet, des variations saisonnières des deux hormones thyroïdiennes, que sont la T₃ et la T₄, semblent être corrélées avec le développement des ovaires chez différentes espèces de salmonidés (Cyr et Eales 1988, 1989).

1.5.2 Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (RHT)

Les RHT ont été identifiés chez plusieurs espèces de téléostéens (Liu *et al.* 2000; Nowell *et al.* 2001), dont plusieurs salmonidés comme la truite arc-en-ciel et le saumon atlantique (Jones *et al.* 2002). Ces études ont permis d'observer la présence de deux récepteurs isoformes *tr-alpha* et *tr-beta*, comme chez les tétrapodes.

Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes ont été identifiés au niveau de la membrane nucléaire des cellules de Sertoli chez le rat (Jannini *et al.* 1990); Jana et Bhattacharya (1993) ont quant à eux localisé les récepteurs nucléaires de T₃ dans les cellules de Leydig chez la perche grimpeuse, *Anabas testudineus*.

Les séquences des RHT chez différentes espèces de téléostéens présentent de très fortes similarités avec d'autres espèces de vertébrés. En effet, *tr-alpha* possède 86% et *tr-beta* 85% de similitude au niveau de leur séquence d'acides aminés avec les récepteurs orthologues chez

l'humain (Swapna et Senthilkumaran 2007). Les RHT appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires, comme les RA, leur structure comprenant cinq domaines est similaire à celle des RA décrite précédemment.



PREMIÈRE PARTIE, SECTION 2 : LES JONCTIONS LACUNAIRES

2.1 *Communication intercellulaire et jonctions lacunaires*

La communication entre les cellules est essentielle pour le maintien de l'homéostasie, la morphogenèse, la différenciation cellulaire et le contrôle de la croissance chez les organismes multicellulaires (Oyamada *et al.* 2005). Plusieurs types de communication intercellulaire permettent de réguler plusieurs de ces fonctions (Goodenough *et al.* 1996; Trosko et Ruch 1998). Des cellules éloignées les unes des autres peuvent échanger plusieurs types d'informations *via* la communication extracellulaire. Dans ce cas, des hormones et des neurotransmetteurs sont véhiculés dans l'organisme jusqu'aux cellules cibles où elles provoqueront un stimulus (Kardami *et al.* 2007). Ce stimulus engendre une réponse de la part de la cellule cible; cette réponse est le deuxième niveau de communication cellulaire : la transduction intracellulaire. Afin de pouvoir interpréter les signaux reçus, la cellule possède des récepteurs spécifiques sur lesquels vont se fixer les messagers. De ces liaisons va naître une cascade d'utilisation d'autres messagers agissant à l'intérieur de la cellule, tel que le Ca^{2+} , l'AMPc, le NO, qui vont permettre l'interprétation de ce message et l'adaptation de la réponse en fonction des stimuli (Elias et Kriegstein 2008). Mais l'ensemble de ces mécanismes de communication est assez lent et ne permet pas une adaptation rapide des cellules à un stimulus.

Afin de pouvoir réagir rapidement à certains stimuli, il existe une autre voie de communication intercellulaire, la communication *via* les jonctions lacunaires (GJIC, « Gap Junction Intercellular Communication »).

Au niveau cellulaire, la communication permet le contrôle de différentes fonctions tissulaires (Mese *et al.* 2006; Vinken *et al.* 2006). Elle détermine la réponse de chaque cellule à un signal global, afin de maintenir l'homéostasie, l'homéostasie étant définie comme « le processus de régulation par lequel l'organisme maintient les différentes constantes du milieu intérieur entre les limites des valeurs normales » (Encyclopédie Larousse en ligne). Outre ce maintien, les jonctions lacunaires participent à d'autres fonctions (Holder *et al.* 1993; Krutovskikh *et al.* 2002). En effet, les jonctions lacunaires permettent la conduction des vagues électriques dans les cellules excitables afin de préserver les contractions coordonnées (Kreuzberg *et al.* 2006a; b).

2.2 Structure des jonctions lacunaires

2.2.1 Le connexon

Les jonctions lacunaires sont composées d'amas de pores aqueux. Chaque pore est constitué d'un demi-canal appelé connexon. Le connexon possède une structure quasi cylindrique de 7,5 nm de long et de 7 nm de diamètre (Goodenough *et al.* 1996; Lal et Lin 2001). Chaque cellule synthétise ses connexons qui, une fois intégrés dans la membrane, se lieront avec ceux des cellules adjacentes afin de former un canal. Le connexon est constitué de six protéines oligomérisées, appelées des connexines (Cxs). La structure des Cxs permet la formation de cette structure hexamérique (Figure 3).

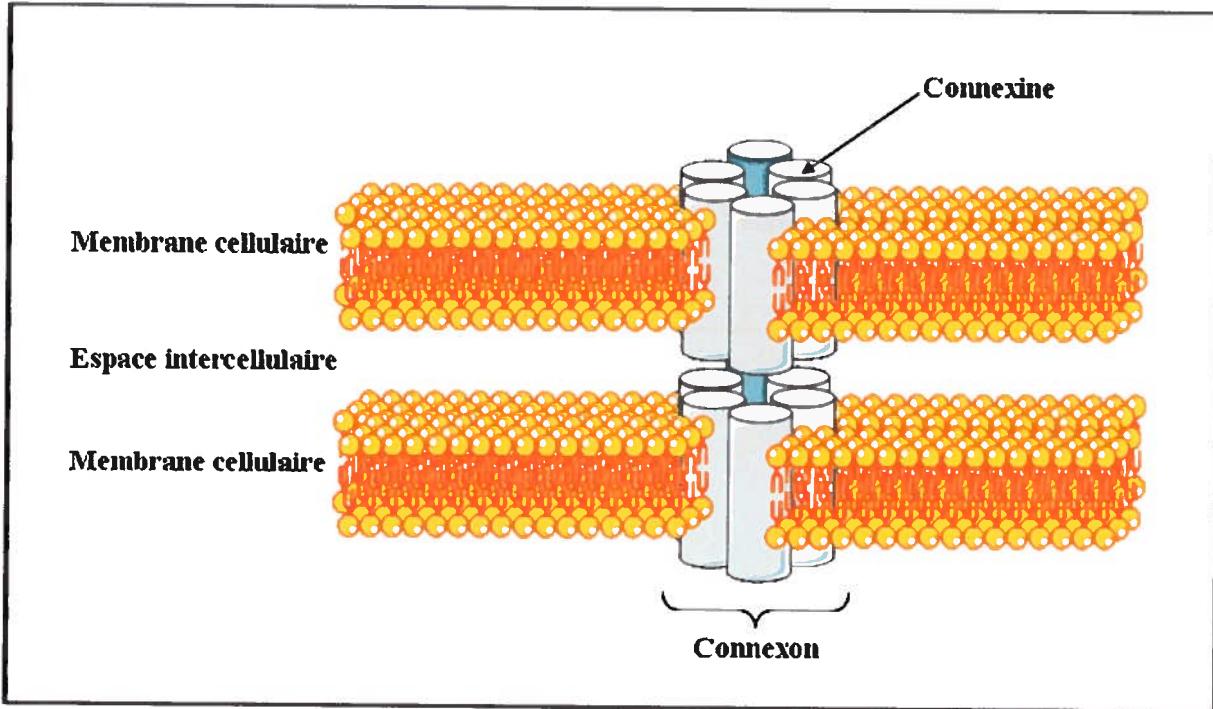


Figure 3 : Schéma d'une jonction lacunaire. Six Cxs sont assemblées autour d'un pore central et forment un connexon. Les connexons de deux cellules adjacentes s'alignent et forment ainsi une jonction lacunaire. (Inspiré de Simon et Goodenough 1998).

D'un tissu à l'autre, les connexons ne sont pas tous identiques ; ils diffèrent en fonction du type de Cxs qui les composent. Les connexons peuvent être constitués d'un seul type de Cx (homomériques) (Sosinsky et Nicholson 2005), ou bien de Cxs de types différents (hétéromériques) (Stauffer 1995; Jiang et Goodenough 1996). Étant donné la présence de Cxs différentes dans les connexons, les deux types de connexons possèdent des propriétés de perméabilité et de régulation qui diffèrent, augmentant ainsi les possibilités de régulation des signaux qui transitent par ces pores (Figure 4).

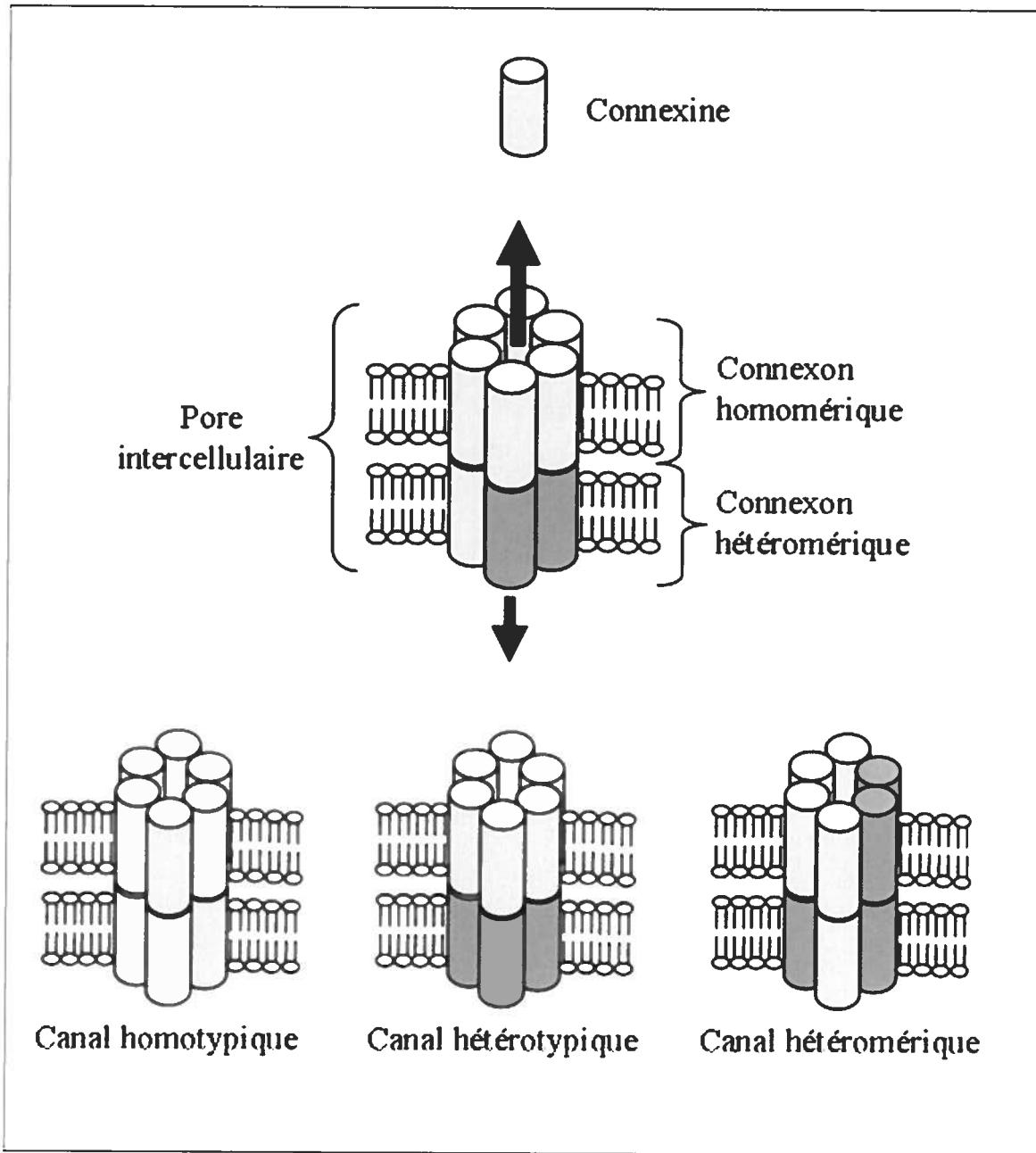


Figure 4 : Schéma représentant les différents types de connexons et de canaux associés. Lorsqu'il est constitué d'un seul type de connexine, le connexon est homomérique, s'il est constitué par différents types de connexines, il est hétéromérique. Cela entraîne la formation de différents types de pores intercellulaires. En effet, lorsque les pores sont formés par deux connexons de même types, ils sont appelés homotypiques, et lorsqu'ils sont constitués par des connexons de types différents, ce sont des pores hétérotypiques. Enfin, si la jonction est constituée par deux types de connexons différents, on parle de pore hétéromérique. (Inspiré du livre « *Molecular Biology of the Cell* » 4^{ème} Ed.).

Chaque cellule adjacente possédant ses propres connexions, il peut donc y avoir la formation de jonctions lacunaires constituées par un même type de connexions (homotypiques) ou par des connexions de types différents (hétérotypiques ou hétéromériques). Cependant, toutes les associations n'aboutissent pas nécessairement à la formation d'une jonction fonctionnelle. En effet, les différentes Cxs identifiées ont été classées en deux familles (décris plus en détails ci-dessous). Les travaux de Falk et Lauf (2001) ont montré que les Cxs appartenant à la même famille pouvaient former des canaux hétéromériques et hétérotypiques, alors que des Cxs appartenant à deux familles différentes ne peuvent constituer que des canaux homotypiques. De plus, le diamètre du pore de la jonction peut varier de 1,5 à 2 nm en fonction des Cxs qui le composent. De la même façon que les différents types de connexions augmentent les possibilités de régulation, un arrangement différent des Cxs confère donc des propriétés sélectives plus étendues.

2.2.2 Les connexines (Cxs)

Les jonctions lacunaires sont constituées à partir de protéines oligomérisées, appelées les Cxs et possédant un ensemble de caractéristiques communes. Les premières Cxs ont été identifiées puis clonées à la fin des années 1980 (Paul 1986; Beyer *et al.* 1987; Kumar et Gilula 1996). Depuis, une vingtaine de Cxs ont été identifiées chez les vertébrés (Söhl et Willecke 2004). Chez les poissons, Eastman *et al.* (2006) ont récemment identifié 37 Cxs différentes sur le génome du poisson zèbre, *Danio rerio*. La première nomenclature des Cxs faisait directement référence à leur poids moléculaire (Beyer *et al.* 1987). Ainsi, l'identification d'une Cx d'un poids moléculaire de 43 kDa a été appelée connexine 43 (Cx43). Aujourd'hui, cette nomenclature est remise en question car une même Cx peut avoir un poids différent selon l'espèce considérée. De

plus, deux Cxs différentes peuvent avoir un poids moléculaire identique chez une même espèce (Lo 1999). Une nouvelle nomenclature a donc été mise en place, faisant cette fois référence à la similarité des séquences des protéines (Kumar et Gilula 1992). Trois familles de Cxs ont été ainsi définies : α , β , et γ (O'Brien 1998). Au sein de chaque classe, une Cx est associée à un numéro propre (par exemple Cx43 : GJA1 pour « *Gap Junction Alpha 1* »).

La variété des Cxs observée est due à des gènes différents. En effet, plusieurs gènes de Cxs ont été localisés sur des chromosomes différents (Trosko et Ruch 1998). La distribution des Cxs varie d'un tissu à l'autre, et un type de Cx peut n'être présent que dans certains tissus spécifiques (Yamasaki *et al.* 1996), alors qu'un autre type, comme la Cx43, peut se retrouver dans une grande variété de tissus. Cette variété dans les types de Cxs semble s'expliquer par des différences au niveau de leur fonction, de leur expression, et dans la perméabilité de leurs canaux (Goodenough *et al.* 1996). Toutes ces différences suggèrent une importance spécifique de chaque Cx.

2.2.3 Structures des connexines

Plusieurs études, portant sur différentes Cxs, ont permis d'identifier précisément les caractéristiques de la structure de ces protéines membranaires (Zimmer *et al.* 1987; Hertzberg *et al.* 1988; Evans *et al.* 1992; Falk *et al.* 1994). Les Cxs possèdent deux domaines extracellulaires (boucles E1 et E2), un domaine cytoplasmique en boucle, deux queues cytoplasmiques (un domaine C-terminal et N-terminal) et enfin quatre domaines transmembranaires traversant la membrane de façon parallèle (M1-M4 ; Figure 5). Le domaine M3, qui constitue l'intérieur du pore (Nunn *et al.* 2001), semble être particulièrement important dans la fonction de la Cx. Ce domaine possède en effet des acides aminés hydrophiles et une étude a démontré qu'une mutation

dans ce domaine de la séquence de Cx43 inhibait la communication cellulaire par une fermeture des canaux ou un arrêt du transport des complexes à la membrane (Krutovskikh *et al.* 2002).

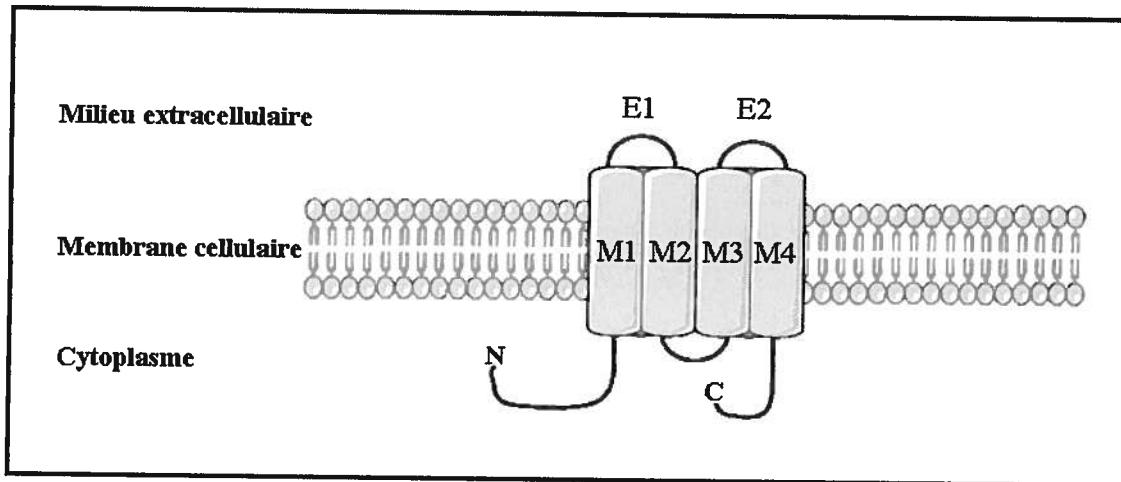


Figure 5 : Représentation de la structure d'une connexine. Cette protéine est constituée de 4 domaines transmembranaires en hélice α (M1-M4), de 2 boucles extracellulaires (E1, E2), d'une boucle intracellulaire, et d'une partie N-terminale (N) et C-terminale (C). (Inspiré de Simon et Goodenough 1998).

Une forte conservation de la structure des deux boucles extracellulaires (E1 et E2) est constatée parmi les différents types de Cxs (excepté pour Cx31). En effet, le nombre d'acides aminés situés entre les cystéines de la première et de la seconde boucles est constant. La structure de la première boucle est C-X₆-C-X₃-C et celle de la seconde C-X₅-C-X₅-C, où C est une cystéine, et X un acide aminé quelconque (Kumar et Gilula 1996). Les cystéines sont particulièrement importantes au niveau structural car elles contribuent au repliement des deux boucles (Krutovskikh et Yamasaki 2000). Les cystéines d'une Cx faisant face avec celles d'une Cx de cellule adjacente, forment des ponts disulfures qui stabilisent ainsi la jonction ainsi formée (Dupont *et al.* 1989; Krutovskikh et Yamasaki 2000).

Les autres domaines de la protéine, que sont les domaines intramembranaires et la partie N-terminale, sont aussi bien conservés entre les différents types de Cxs. En revanche, la partie C-terminale varie d'une Cx à l'autre par sa longueur ou sa séquence en acides aminés. Étant donné la conservation de tous les autres domaines, on constate généralement que plus la partie C-terminale est longue, plus le poids moléculaire de la Cx est élevé (Mese *et al.* 2006).

2.3 Le contrôle de la communication intercellulaire

Afin de préserver l'homéostasie dans les différents organes, les cellules doivent pouvoir réguler le passage des molécules et autres messagers de cellule à cellule. Pour cela, les cellules peuvent effectuer un contrôle en fonction de la taille de la molécule, mais aussi en bloquant le passage emprunté par celle-ci : le pore intercellulaire. Les jonctions lacunaires peuvent effectuer un contrôle de trois façons différentes : le contrôle rapide, le contrôle moyen et le contrôle lent (Holder *et al.* 1993; Krutovskikh et Yamasaki 1997).

2.3.1 Le contrôle rapide

Le contrôle rapide permet aux cellules l'ouverture ou la fermeture rapide (quelques millisecondes) des canaux. Pour se faire, une rotation des Cxs, dans l'axe du pore, entraîne la fermeture progressive de celui-ci. La phosphorylation, par des protéines kinases (PKA), serait responsable de ce mouvement rapide des Cxs. Les Cxs sont principalement des phosphoprotéines, donc la phosphorylation joue un rôle important dans la régulation de l'assemblage des connexons et les caractéristiques physiologiques des canaux formés (Lampe et

Lau 2004; King et Lampe 2005). Il existe une exception, la Cx26 qui n'est pas une phosphoprotéine, sa régulation passe donc par d'autres mécanismes (Goodenough *et al.* 1996). Des changements de concentrations ioniques intracellulaires de Ca^{2+} , H^+ , ainsi que l'influence de certains radicaux libres pourraient permettre un contrôle rapide de l'ouverture du pore (Chanson *et al.*, 2007). Sous certaines conditions, comme un stress ischémique ou mécanique, l'ouverture des canaux peut être facilitée par la libération de certains facteurs comme l'ATP, le glutamate et le NAD⁺ dans l'espace extracellulaire. Il s'agit d'une régulation engendrant une adaptation rapide du tissu aux variations des conditions environnementales (Evans *et al.* 2006)

2.3.2 Le contrôle moyen

La synthèse des Cxs s'effectue au niveau de l'appareil de Golgi (Diez *et al.* 1999 ; Das Sarma *et al.* 2001). De là, les Cxs sont acheminées jusqu'à la membrane cytoplasmique afin de former les jonctions lacunaires (Van Slyke et Musil, 2000). Les Cxs ont une durée de vie assez courte. On trouve dans la littérature de nombreuses études qui rapportent la demi-vie des différentes Cxs (Fallon et Goodenough 1981 ; Traub *et al.* 1989 ; Laird *et al.* 1991 ; Fernandes *et al.* 2004 ; Hunter *et al.* 2005). Hervé *et al.* (2007) concluent, à partir de différentes études que la demi-vie des Cxs varie entre 1,3 et 10 h. Si les mécanismes permettant le transport des Cxs, depuis le lieu de synthèse jusqu'à la membrane, sont ralentis, alors la quantité de jonctions lacunaires présentes à la membrane de la cellule va diminuer (Hervé *et al.* 2007). Ce processus nécessite quelques minutes, voire quelques heures, afin de permettre une régulation du signal. Là encore, il semble que l'état de phosphorylation des Cxs soit déterminant pour leur localisation (Holder *et al.* 1993).

2.3.3 Le contrôle lent

Ce type de contrôle s'effectue au niveau de l'ARNm et non au niveau de la protéine. Le temps de vie des Cxs étant assez court, les niveaux d'ARNm des Cxs peuvent être affectés par différents facteurs modulant leur stabilité. La région 5'-UTR de l'ARNm de la *Cx43* possède un site de fixation des ribosomes qui augmente ses niveaux de transcription (Werner 2000). L'augmentation de la concentration de l'AMPc, dans une culture d'hépatocytes de rat, induit une augmentation des niveaux d'ARNm de *Cx32*, suggérant en fait une augmentation de la stabilité des ARNm de *Cx32* (Saez *et al.* 1989). Si la transcription est inhibée, cela entraînera une diminution de la quantité de protéines à la membrane cellulaire et donc une baisse de la communication intercellulaire. Il s'agit d'un type de contrôle important dans la régulation de la communication intercellulaire (Herve *et al.* 2007).

2.4 Jonctions lacunaires et spermatogenèse

Parmi les vingt Cxs identifiées, onze Cxs différentes ont été identifiées dans le testicule de rats matures (Risley 2000). Il s'agit de *Cx26*, *Cx30.2*, *Cx31*, *Cx31.1*, *Cx32*, *Cx33*, *Cx37*, *Cx40*, *Cx43*, *Cx46* et *Cx50*. Les Cxs ont été identifiés entre des cellules somatiques, les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig, ainsi qu'entre certaines cellules germinales (Tableau 2).

La principale Cx présente dans le testicule est la *Cx43* (Risley *et al.* 1992; Batias *et al.* 1999). La *Cx43* a été localisée à différents endroits dans le testicule. On la trouve au niveau des cellules de Leydig, qui expriment uniquement celle-ci (Perez-Armendariz *et al.* 1994). La *Cx43* a

Tableau 2: Localisation des Cxs dans les testicules. CS: Cellule de Sertoli; CE: Cellule endothéliale des vaisseaux sanguins; CL: Cellule de Leydig ; CG: Cellule germinale ; Spg: Spermatogonie ; Spc I: Spermatocyte de premier ordre ; Spc II : Spermatocyte de second ordre ; Spd : Spermatide ; CM : Cellule myoïde. (Inspiré de Pointis *et al.* 2005).

Connexines	Espèces	Types cellulaires où les Cxs sont présentes	Références
Cx26	Rat, Souris	CS	(Risley <i>et al.</i> 1992)
Cx30.2	Souris	CE, CL, entre CS et CG	(Nielsen 2003)
Cx31	Rat	Spg, Spc I	(Mok <i>et al.</i> 1999)
Cx32	Rat, Souris	CS	(Risley <i>et al.</i> 1992)
Cx33	Rat, Souris	CS	(Fischer <i>et al.</i> 2005; Juneja <i>et al.</i> 1999; Tan <i>et al.</i> 1996)
Cx37	Rat	CE	(Batias <i>et al.</i> 1999; Batias <i>et al.</i> 2000; Defamie <i>et al.</i> 2003; Perez-Armendariz <i>et al.</i> 1994; Risley <i>et al.</i> 1992; Steger <i>et al.</i> 1999; St-Pierre <i>et al.</i> 2003; Tan <i>et al.</i> 1996)
Cx43	Rat, Souris, Humain	CS, CL, CM	
Cx50	Rat	Spc II, Spd	(Risley 2000)

aussi été identifiée entre les cellules de Sertoli, ainsi qu'entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales (Risley *et al.* 1992 ; Pelletier 1995 ; Batias *et al.* 1999 ; Batias *et al.* 2000 ; Pointis *et al.* 2005).

Parmi les autres Cxs localisées dans le testicule, CX31 a été localisée par Mok *et al.* (1999) au niveau des spermatogonies et des spermatocytes de premier ordre. Le rôle de la CX31 est assez difficile à établir car elle ne peut former de jonctions lacunaires avec les autres Cxs présentes dans le testicule, de par sa structure particulière (Elfgang *et al.* 1995). Les CX26 et CX32 ont été localisées dans les régions apicales des tubules séminifères, sans qu'une localisation plus spécifique ne soit établie (Risley *et al.* 1992). Il faut tout de même souligner qu'avant nos travaux (chapitre 1 : de Montgolfier *et al.* 2007), la Cx32 était la seule Cx à avoir été identifiée au niveau des cellules germinales dans le testicule du silure tigre, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Batlouni *et al.* 2005).

La Cx33 est une Cx qui est exprimée uniquement dans le testicule et qui est localisée dans le compartiment basal des tubules séminifères, plus précisément dans la membrane des cellules de Sertoli, ainsi que des spermatocytes de second ordre et des spermatides (Tan *et al.* 1996; Chung *et al.* 1999; Risley 2000; Fiorini *et al.* 2004). La Cx33 présente en plus certaines caractéristiques qui la distinguent des autres Cxs rencontrées dans le testicule. Une étude réalisée dans les oocytes de xénope, a montré que la CX33 était incapable de former d'elle-même des jonctions lacunaires fonctionnelles (Chang *et al.* 1996). De plus, elle ne semble pas s'apparier aux CX32, CX37 et CX43 (3 Cxs présentes dans le testicule), pour former des jonctions fonctionnelles (Chang *et al.* 1996). L'expression de Cx33 dans l'oocyte de xénope a entraîné l'inhibition de l'expression de Cx37 et de Cx43, mais pas celle de Cx32. Il semble donc que la CX33 joue un rôle d'inhibiteur spécifique de certaines Cxs dans le testicule. Ce rôle particulier

pourrait permettre une meilleure synchronisation des cellules par rapport aux facteurs de différenciation et de maturation (Chang *et al.* 1996).

Plusieurs Cxs sont donc nécessaires afin d'assurer le déroulement normal de la spermatogenèse chez les vertébrés. Certaines Cxs, comme la *Cx43*, semblent jouer un rôle majeur dans la maturation des gamètes (Saez *et al.* 2003).

2.5 Importance de la *Cx43* dans le testicule

Si la *Cx43* est la Cx qu'on retrouve le plus fréquemment dans les différents organes, elle est aussi la Cx la plus abondante dans le testicule des mammifères (Sridharan *et al.* 2007) De plus, plusieurs études ont montré son rôle essentiel au niveau de la prolifération et de la différentiation cellulaire durant la spermatogenèse, que ce soit chez l'humain ou les rongeurs (Risley *et al.* 1992 ; Batias *et al.* 1999 ; Juneja *et al.* 1999 ; Batias *et al.* 2000 ; St-Pierre *et al.* 2003 ; Decrouy *et al.* 2004 ; Gilleron *et al.* 2006). En effet, une diminution de son expression dans le testicule entraîne une baisse de la fertilité, voire même une infertilité complète (Batias *et al.* 1999; Pointis et Segretain 2005). Que ce soit chez le rat ou l'humain, elle est localisée au niveau des cellules de Sertoli, des cellules de Leydig, des spermatogonies et des spermatocytes (Steger *et al.* 1999; Defamie *et al.* 2003). Cependant, aucune étude n'a observé la présence de la *Cx43* chez les poissons, seules deux études ont identifié par microscopie électronique la présence de Cxs dans le testicule et supposent un rôle, sans autre précision, dans le déroulement de la spermatogenèse (Marina *et al.* 2002; Batlouni *et al.* 2005).

Chez les rongeurs, Risley *et al.* (1992) ont observé par immunohistochimie que la CX43 était localisée au niveau de la membrane des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig, et que

son expression variait en fonction de l'âge de l'individu. Ils ont remarqué que la CX43 était très fortement présente (90%) dans les tubules de rats immatures et que ce pourcentage diminuait à 60% chez les individus matures.

Sridharan *et al.* (2007) ont montré que la Cx43 jouait un rôle prépondérant dans la prolifération et la maturation des cellules de Sertoli chez la souris. La présence de jonctions lacunaires entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales faciliterait la coordination entre les cellules de Sertoli et permettrait ainsi la propagation des signaux de maturation entre les cellules de Sertoli mais aussi vers les autres cellules germinales (Pointis *et al.* 2005b). En effet, il semble y avoir chez les rongeurs une forte relation entre les jonctions lacunaires et les jonctions serrées. L'expression de la *Cx43* est dépendante du stade de maturation du testicule chez le rat et permettrait ainsi la réorganisation de la cellule de Sertoli afin de faciliter le passage des spermatocytes du compartiment basal vers le compartiment adluminal (Pelletier 1995; Tan *et al.* 1996; Batias *et al.* 2000). Une baisse de l'expression de *Cx43* au niveau des cellules de Sertoli est observée après le passage des spermatocytes (Risley *et al.* 1992; Tan *et al.* 1996).

Le fait que l'expression de la *Cx43* soit reliée au stade de maturation testiculaire indique une très forte relation avec les cellules germinales (Risley *et al.* 1992; Tan *et al.* 1996; Batias *et al.* 1999; Batias *et al.* 2000). Des études ont montré l'absence de la *Cx43* chez des souris ayant subi des mutations du gène de la *Cx43* et une délétion partielle d'un des brins du chromosome Y (Kotula-Balak *et al.* 2007). Le rôle essentiel de la *Cx43* dans la spermatogenèse a été aussi montré en substituant les séquences codantes de celle-ci par celles de la *Cx32* ou de la *Cx40* (Plum *et al.* 2000). Les souris générées avec mutations étaient toutes viables, mais les mâles étaient stériles et on observait uniquement la présence de cellules de Sertoli dans les tubules séminifères et non celle de cellules germinales. L'impossibilité de substituer la *Cx43* par une autre, l'apparition d'une mauvaise communication entre les cellules de Sertoli et les cellules

germinales, et les modifications des molécules impliquées dans les propriétés des canaux des jonctions démontrent le rôle primordial de la *Cx43* dans le déroulement de la spermatogenèse (White et Bruzzone 2000). Malgré tout, notre connaissance de la régulation spécifique de la *Cx43* dans le testicule reste fort limitée.

Les jonctions lacunaires sont présentes au niveau des différentes cellules germinales et devraient être régulées par des facteurs endocriniens et paracrines. Plusieurs études, réalisées dans divers tissus, ont montré la régulation de Cxs par des hormones. Cyr *et al.* (1996) ont montré que la localisation de la CX43 était régulée par les androgènes dans l'épididyme de rat. Dans le testicule de rat, l'hormone chorionique gonadotrope (HCG), qui induit la sécrétion de T, diminue l'expression de l'ARNm de *Cx43* et provoque une redistribution périphérique dans la cellule de Leydig (You *et al.* 2000). Une autre étude a montré que cette diminution d'expression de CX43 par la T est due à une interaction directe entre l'hormone et la structure protéolitique de la membrane, ce qui entraînerait un changement dans la conformation des jonctions lacunaires et modifierait ainsi leur fonctionnement (Pluciennik *et al.* 1996).

La CX43 a été localisée dans la membrane des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig. Pluciennik *et al.* (1994) ont observé que l'expression des jonctions lacunaires était augmentée par la FSH. Sachant que le second messager de la FSH est l'AMPc, l'hypothèse que celui-ci joue un rôle dans la régulation de la *Cx43* a été aussi avancée (Atkinson *et al.* 1995 ; Darrow *et al.* 1996 ; Paulson *et al.* 2000 ; Buzzard *et al.* 2003 ; Holsberger et Cooke 2005 ; Gilleron *et al.* 2006). D'autres études ont démontré que l'expression de la *Cx43* diminuait fortement en présence de testostérone et de 17 β -œstradiol sous formes estérifiées, et diminuait plus faiblement en présence de stéroïdes sexuels non estérifiés (Herve *et al.* 1996; Pluciennik *et al.* 1996). Ces résultats indiquent que des molécules comme les stéroïdes peuvent exercer une action de régulation directe sur la *Cx43*. Mais d'autres hormones pourraient, elles-aussi, jouer un

rôle dans la régulation de cette Cx. En effet, plusieurs études récentes ont montré que les hormones thyroïdiennes pourraient influencer directement la localisation de la *Cx43* sans affecter sa concentration. St-Pierre *et al.* (2003) ont observé qu'en présence de propylthiouracil, un agent induisant l'hypothyroïdisme, on notait une perte de la localisation membranaire de la CX43 au profit d'une présence cytoplasmique dans les cellules de Sertoli.

Des études suggèrent un rôle de la *Cx43* au niveau des cellules de Sertoli. La CX43 est associée à l'expression de différentes kinases et inhibiteurs de kinases, comme SKP2, CDKN1B (Zhang *et al.* 2003), qui sont eux-mêmes des régulateurs connus de la prolifération des cellules de Sertoli (Holsberger *et al.* 2005; Holsberger et Cooke 2005). L'utilisation du système Cre-Lox a permis à Brehm *et al.* (2007) d'observer qu'en l'absence de CX43, la population des cellules de Sertoli était significativement augmentée dans le testicule. Une autre étude montre également la prolifération de quelques spermatogonies au sein des testicules de souris mutées pour la *Cx43* (Sridharan *et al.* 2007). Ces résultats suggèrent que la *Cx43* est essentielle au déroulement de la spermatogenèse, mais qu'elle ne régule pas la prolifération des spermatogonies.

Au niveau environnemental, plusieurs polluants ont été identifiés comme modifiant l'expression de la *Cx43* chez les rongeurs. En effet, l'hexachlorocyclohexane, le dichlorodiphényltrichloroéthane, le pentachlorophénol, et les xénœstrogènes (nonylphénol) agissent sur la localisation de la CX43 dans les cellules de Sertoli, passant d'une localisation membranaire à cytoplasmique (Defamie *et al.* 2001; Fiorini *et al.* 2004; Aravindakshan et Cyr 2005), sur la phosphorylation de la Cx ou encore sur l'activation de protéines kinases (Aravindakshan et Cyr 2005).

Même si aucune information n'est disponible sur l'expression et la localisation de la *cx43* dans le testicule de poissons. L'ensemble des données rapportées chez les vertébrés dans la

littérature suggère que cette Cx pourrait intervenir dans la régulation de la spermatogenèse chez les poissons.

PREMIÈRE PARTIE, SECTION 3 : LA MODULATION DE LA SPERMATOGENÈSE

Il existe plusieurs facteurs stimulant ou inhibant les fonctions de reproduction chez les poissons ; certains sont génétiques, d'autres environnementaux ou encore d'origines anthropiques. L'objectif de cette section est de présenter sommairement les différentes perturbations (positives et négatives) existant chez les poissons afin de mieux cerner l'intérêt d'induire une perturbation sur la spermatogenèse de l'omble de fontaine pour observer la relation entre les niveaux de Cxs et le déroulement de la spermatogenèse.

3.1 La maturation précoce

La maturité sexuelle précoce correspond à la maturité complète des gonades chez des individus considérés comme « trop jeunes » par rapport à l'âge normal de la première maturation sexuelle. Ce phénomène se rencontre fréquemment chez les salmonidés, qui ont un cycle de reproduction annuel, et reste un problème de taille pour l'industrie aquicole. La maturation précoce apparaît plus fréquemment chez les mâles que chez les femelles. De plus, les individus d'un même groupe peuvent présenter une variation par rapport à l'âge d'atteinte de maturité sexuelle (Adams et Huntingford 1997). Les conséquences font qu'au sein d'une même cohorte, on note une variation dans la taille des individus et dans l'atteinte de maturité sexuelle (Heath *et al.* 1996).

Durant tout le processus de maturation gonadique jusqu'à la période de frai, on observe une diminution progressive de l'alimentation et une réduction du taux de croissance des mâles

chez l'omble chevalier, *Salvelinus alpinus* (Tveiten *et al.* 1996). Ainsi les individus qui entrent en maturation précoce, allouent plus d'énergie dans le développement des gonades en plus d'assurer leur croissance, d'où une dépense énergétique accrue en comparaison avec les individus qui demeurent immatures.

En aquaculture, la maturité sexuelle précoce est un phénomène bien connu (Amano *et al.* 1994; Adams et Huntingford 1997; Kausea *et al.* 2003; Martyniuk *et al.* 2003; Dziewulska et Domagala 2005; Sacobie et Benfey 2005). Ce phénomène est souvent associé à une réduction de taille de l'individu, entraînant des coûts supplémentaires pour l'industrie aquicole avant la mise sur le marché de ces poissons (Heath *et al.* 1996). En effet, la taille adéquate en aquaculture, appelée « taille portion », tout comme la qualité de la chair, et sa teneur en eau et en gras, sont des critères importants qui déterminent le prix de vente sur le marché (Mellinger 2002). Comprendre et contrôler l'apparition de maturité sexuelle précoce représente donc un objectif majeur pour cette industrie.

Diverses études portant sur la reproduction des salmonidés ont mis en évidence le rôle de divers facteurs influençant l'apparition de la maturité sexuelle. Il faut considérer que l'âge d'atteinte de maturité sexuelle est variable selon l'espèce étudiée, entre 1⁺ et 4⁺¹ par exemple chez les mâles d'omble de fontaine, et il a été observé que la maturité est fortement liée à la taille des individus (McCormick et Naiman 1984). Des études ont testé l'influence de facteurs environnementaux, comme la photopériode et la température, sur l'apparition et la réduction de ce phénomène (Taranger *et al.* 1998). D'autres ont observé l'action des stéroïdes sexuels (androgènes) dans le développement et la maturation des gonades (Sangalang et Freeman 1974; Dickey et Swanson 1998; Tveiten *et al.* 1998; Rahman *et al.* 2000; Campbell *et al.* 2003).

¹ Pour les poissons, on considère qu'un individu qui n'a pas encore un an est appelé 0+. Un individu 1+ est donc dans sa 2^{ième} année, et un 4+ dans sa 5^{ième} année.

3.2 Les facteurs génétiques et biotiques

3.2.1 La croissance et les facteurs génétiques

La croissance de l'individu est un critère qui semble important pour l'apparition de la maturité sexuelle chez certaines espèces de salmonidés ; en effet, les individus à forte croissance sont plus susceptibles de développer une maturité sexuelle précoce (Heath *et al.* 1996; Adams et Huntingford 1997). Les travaux de Tveiten *et al.* (1996) sur la croissance de l'omble chevalier montrent que chez les mâles âgés de plus d'un an, les individus en maturation ont une croissance pondérale plus élevée que les individus immatures durant la période correspondant à la maturation des gonades, soit entre avril et août. De plus, le taux de croissance des individus en maturation est moins élevé que chez les individus immatures durant les trois mois qui précèdent le frai. Ce ralentissement de croissance correspondrait à un changement dans l'allocation des ressources afin de finaliser la spermatogenèse (Adams et Huntingford 1997).

En étudiant trois générations successives de truite arc-en-ciel, Martyniuk *et al.* (2003) ont montré, en utilisant des marqueurs microsatellites de masse appelés « *body mass quantitative tract loci* » (QTL), que l'apparition de la maturité sexuelle précoce était en partie héritable. Dans la même étude, ils ont observé que des individus, ayant ou non une maturité sexuelle précoce, peuvent engendrer une descendance qui présentera à nouveau une précocité de maturation des gonades. Mais il faut considérer que les individus qui ont une maturation précoce ont une descendance qui présente elle-aussi, un taux de maturité précoce plus important. Enfin, les auteurs ont montré une corrélation positive entre la croissance et l'héritabilité de la maturité sexuelle précoce chez la truite arc-en-ciel.

3.2.2 Les facteurs biotiques

Les interactions entre individus de sexes opposés, tout comme la structure sociale au sein de la population semblent être déterminantes dans la reproduction et peuvent moduler le taux de sécrétion des androgènes chez le mâle. La présence de femelles en nidification peut en effet augmenter la synthèse de $17\alpha,20\beta$ -DHP, de T et de 11-CT plasmatiques chez le mâle par l'intermédiaire de phéromones (Waring *et al.* 1996; Olsén *et al.* 1998). Par ailleurs, Cardwell *et al.* (1996) ont montré, chez deux espèces de salmonidés, que le changement de statut social des mâles, passant de soumis à dominants, entraînait une variation dans la production de T et de $17\alpha,20\beta$ -DHP plasmatiques.

La maturation des gonades mâles serait donc influencée par des interactions entre plusieurs facteurs d'origine environnementale, génétique, et sociale. Il faut aussi considérer le système endocrinien qui contrôle le déroulement des différentes étapes aboutissant à la reproduction. De nombreuses études ont montré la diversité des facteurs exerçant une action sur les individus mâles et faisant varier la précocité de la maturation des gonades. Cela étant, il reste encore beaucoup de zones d'ombres dans l'apparition de ce phénomène, et il n'existe pas à ce jour de marqueurs permettant d'identifier l'initiation de la spermatogenèse avant que l'individu n'ait véritablement débuté le développement gonadique, et que cela soit observable histologiquement.

3.3 Les facteurs environnementaux

3.3.1 La photopériode

Parmi les différents facteurs environnementaux influençant la maturation sexuelle, la photopériode semble être un des paramètres environnementaux ayant une action prépondérante sur son apparition. En effet, la manipulation de la période de frai par des changements dans la photopériode chez l'omble de fontaine est une technique connue depuis la première moitié du XX^e siècle (Hoover et Hubbard 1937). Plus récemment, Duston *et al.* (2003) ont montré la relation directe entre la photopériode et l'apparition de la maturité sexuelle chez l'omble chevalier, et ce pour les deux sexes. De plus, la photopériode a une action qui varie en fonction de l'âge des individus chez les salmonidés (Taranger *et al.* 1998).

L'impact de la photopériode sur la maturation des gonades chez les salmonidés s'explique par le fait que la spermatogenèse est initiée par l'augmentation de la concentration en GtH I au printemps (Oba *et al.* 1999) ; l'augmentation de la concentration de GtH II n'arrivant que plus tard dans le cycle. Maisse et Breton (1996) ont observé chez des femelles de truite arc-en-ciel, que la concentration maximale de GtH I pouvait apparaître plus tôt s'ils avançaient artificiellement l'apparition des « jours longs », c'est-à-dire en augmentant la durée d'éclairage par rapport au temps d'obscurité.

L'ensemble de ces études a permis la mise en place de techniques de programmation de la date de ponte chez les salmonidés afin de permettre une production plus régulière pour les marchés.

3.3.2 La température

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle majeur joué par la température sur la croissance des salmonidés. Baum *et al.* (2005) ont observé que des saumons Atlantique, *Salmo salar*, situés en aval de rejet d'effluents à température plus chaude, avaient une croissance et une maturation accélérées comparativement aux individus de la même espèce situés en amont de la zone de rejet, où la température était plus froide. Cependant, ils ont conclu que l'activation de la maturation était due à l'atteinte de la taille seuil, et non à l'augmentation de la température. La température jouerait donc un rôle indirect, augmentant la vitesse de croissance qui déclencherait alors la maturation gonadique.

Une autre étude a toutefois démontré qu'une exposition à des températures élevées prolongées (22°C en comparaison à 14°C), diminuait de moitié la sécrétion plasmatique de testostérone, d'oestradiol et de vitellogénine chez les femelles de saumon atlantique (King *et al.* 2007). De plus, les taux de fertilité des individus exposés aux températures élevées étaient significativement plus faibles que chez ceux exposés aux températures plus froides (de 45 à 70%), suggérant cette fois un rôle important de la température sur la fertilité des individus et donc dans le succès de la reproduction.

3.3.3 La salinité

Plusieurs études ont montré que la salinité pouvait également jouer un rôle important sur la qualité du sperme produit chez certaines espèces de salmonidés. En effet, maintenir des individus matures en eau salée induit un débalancement osmotique qui entraîne alors une diminution voire une inhibition complète de la spermatogenèse (Thorpe *et al.* 1982; Baglinière et Maisse 1985; Boeuf et Payan 2001).

Atse *et al.* (2002) ont analysé de façon indépendante et groupée les effets de la salinité et de la température sur la composition des œufs et les caractéristiques du sperme chez l'omble chevalier. Leurs résultats démontrent clairement que chez cette espèce, la salinité est un facteur important dans la composition du sperme. En effet, les individus mâles élevés dans une eau salée avaient une concentration en spermatozoïdes plus élevée que ceux en eau douce.

Mais la salinité ne semble pas avoir d'effet similaire chez toutes les espèces de salmonidés. Clarke *et al.* (1977) n'ont pas observé d'effet de la salinité sur le sperme du saumon coho. De même chez le saumon atlantique, la salinité entraîne une baisse de la fertilité, même en cas de retour en eau douce plusieurs mois avant la reproduction (Haffray *et al.* 1995).

La salinité est donc un facteur environnemental qui peut influencer différemment le déroulement de la spermatogenèse suivant les espèces de salmonidés.

3.4 Les facteurs anthropiques : les modulateurs endocriniens

3.4.1 Les sources de modulateurs endocriniens

On dénombre la présence d'une grande quantité de composés chimiques d'origine anthropique dans tous les écosystèmes mondiaux. De plus, la présence de plusieurs modulateurs endocriniens en même temps dans l'environnement peut avoir des effets variés. En effet, ces composés peuvent augmenter leurs effets, on parle alors d'effet additif. Ils peuvent aussi s'opposer, ou bien produire un effet multiplié (synergique).

Les processus de maturation sont des phénomènes complexes et facilement altérables. Plusieurs études ont montré que certaines substances rejetées dans les cours d'eau modifiaient sensiblement les capacités de reproduction chez plusieurs espèces de poissons (Adams *et al.*

1992). Folmar *et al.* (1996; 2001), ainsi que Jobling *et al.* (1998), ont montré qu'il existait des corrélations entre la présence d'eaux usées dans le milieu, les concentrations de stéroïdes sexuels et des altérations dans le développement des gonades. Il semble que certains composés (alkylphénol, polyéthoxylates, phthalates, ainsi que certains insecticides) provenant des eaux usées agissent en tant que compétiteurs des oestrogènes (Jobling *et al.* 1995; Sumpter et Jobling 1995). On observe que certaines hormones influencent l'expression des connexines. Étant donné l'impact des effluents municipaux chez les poissons, il serait intéressant d'étudier plus en détails l'action de ces polluants sur l'expression des connexines afin de savoir précisément quels impacts ils ont.

3.4.2 Les alkylphénols

En 1998 lors de la convention Oslo-Paris, l'Union européenne a élaboré l'objectif de cesser tout rejet et émission de substances dans l'environnement marin d'ici 2020. Les alkylphénols ont été inscrits sur la première liste, celle des substances dangereuses nécessitant une action prioritaire (<http://www.ospar.org/fr/html/welcome.html>). Les alkylphénols sont des composés très lipophiles, utilisés principalement dans la production de résines d'alkylphénols éthoxylates (Nimrod et Benson, 1996). Ils sont aussi utilisés dans la production de plastiques. On estime que 65% des alkylphénols et dérivés entrant dans les stations d'épuration sont rejetés dans l'environnement (Ahel *et al.* 1994). Le terme octylphénol désigne un grand nombre de composés isomères dont la formule générale est $C_8H_{17}C_6H_4(OH)$. Le groupe octyle (C_8H_{17}) peut être ramifié de diverses manières ou constituer une chaîne droite et peut être situé dans la position 2-, 3- ou 4- sur l'anneau de benzène. Parmi ces isomères potentiels, le 4-*tert*-octylphénol est le plus important du point de vue commercial (White *et al.* 1994). Le nonylphenol est aussi utilisé dans

la préparation d'huiles lubrifiantes, dans la fabrication du « polyvinyl chloride » (PVC). Il n'existe pas à ce jour d'étude montrant la synthèse naturelle de ces composés ; leur présence dans l'environnement est donc uniquement d'origine anthropogénique.

Sabik *et al.* (2003) ont montré que l'accumulation d'alkylphénols, dans les sédiments situés en aval d'effluents municipaux dans le fleuve Saint Laurent, représentait une source d'exposition importante pour les moules d'eau douce, *Elliptio complanata*, vivant dans ces eaux. Des études ont démontré le potentiel toxicologique des alkylphénols en tant que perturbateur endocrinien sur la faune, mais aussi sur l'homme (Safe 2000). Les alkylphénols peuvent se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes et entraîner la synthèse de protéines comme la vitellogénine et altérer le métabolisme stéroïdien et la croissance testiculaire chez les mâles (Ying *et al.* 2002).

3.4.3 Le bisphénol A

Le bisphénol A appartient à la famille des diphenylalkanes et est utilisé dans la production de résines époxy et de plastiques polycarbonates. Depuis les travaux de Dodds et Lawson (1938) sur des rates ovarectomisées, le bisphénol A a été identifié comme un composé possédant une action œstrogénique aussi élevée que le flutamide. Des travaux plus récents, portant sur les RA chez l'humain, ont démontré que l'action anti-androgène du bisphénol A était due à l'inhibition de la dihydrotestostérone (Sohoni et Sumpter 1998). Depuis, de nombreuses études ont confirmé ces effets sur les poissons mâles en utilisant diverses techniques *in vivo* et *in vitro* (Celius *et al.* 1999; Islinger *et al.* 1999; Arukwe *et al.* 2000; Van den Belt *et al.* 2003). Ces études ont par ailleurs montré l'interaction du bisphénol A avec les récepteurs aux œstrogènes (RO) et les protéines de liaison aux stéroïdes (Tollefsen 2002; Tollefsen *et al.* 2004).

3.4.4 Les pesticides organochlorés

Il s'agit de composés principalement utilisés en agriculture afin d'éliminer les insectes nuisibles. Ils présentent une très grande variété de structures moléculaires. Étant donné leurs effets négatifs sur la santé humaine et animale, les organochlorés ont été interdits aux Etats-Unis dès le début des années 1970. Cependant, la stabilité de ces composés est telle, qu'on a constaté une bioaccumulation dans les tissus de plusieurs espèces. Un des composés les plus connus de cette famille est le DDT et ses dérivés.

L'exposition de poissons à ces produits entraîne une perturbation du système reproducteur. Les cyclodiènes (comme le dieldrine, le toxaphène et le chlordane) entraînent toute une gamme d'effets nocifs chez diverses espèces de poissons comme une baisse de la concentration des hormones stéroïdiennes, une diminution de la fertilité, de la ponte et du taux de survie larvaire (Gross *et al.* 2002).

3.4.5 Les effluents d'usines de pâtes à papier

Depuis quelques décennies, les impacts des effluents des usines de pâtes à papier sur les poissons ont été largement étudiés. Un des effets majeurs observés est la perturbation de la reproduction, due à des altérations de la sécrétion des hormones stéroïdes, du développement et de la maturation des gonades, ainsi que des caractères sexuels secondaires (Hewitt *et al.* 2006; Orrego *et al.* 2006; Orlando *et al.* 2007; Hewitt *et al.* 2008). Cependant, les composés responsables de ces effets sont difficiles à identifier avec précision du fait que suivant les régions d'études, les essences de bois varient, tout comme les traitements employés par les usines. Il en résulte une grande disparité dans la composition des effluents. Malgré tout, les techniques de traitement et de séparation des composés du bois, relarguent des résines, des acides gras, des

stérols végétaux et des sucres. De plus, le traitement utilisé peut amener la présence de chlorophénols et de guaicols dans les effluents. Lehtinen *et al.* (1999) ont observé que les composés chlorés n'étaient pas les seuls agents actifs dans les perturbations engendrées sur la reproduction des poissons. En effet, une analyse des composés chimiques des effluents de ces usines a permis d'identifier des dérivés de nonylphénols, possédant des activités œstrogéniques (Lee et Peart 1992), des acides gras, des résines et des stérols (MacLatchy et Van Der Kraak 1995; Lehtinen *et al.* 1999).

Les effluents des usines de pâtes à papier induisent une série de perturbations au niveau des fonctions de l'hypophyse, diminuent la synthèse d'hormones stéroïdiennes, et modifient l'apparition des caractères sexuels secondaires. La variabilité de la composition de ces effluents est grande, ce qui explique la multitude d'effets observés, qu'ils soient andro- ou œstrogéniques.

3.4.6 Les effluents municipaux

Les effluents provenant de stations de traitements des eaux usées peuvent induire des perturbations œstrogéniques chez les mâles exposés et provoquer une synthèse de VTG. Plusieurs études ont ainsi noté une augmentation de la féminisation de ces mâles (Jobling *et al.* 1998; Tyler *et al.* 1998; Liney *et al.* 2005). Mais les réponses diffèrent en fonction des espèces exposées aux effluents contaminés. Liney *et al.* (2005) ont montré une féminisation permanente et dose-dépendante des gonades de goujon lors d'une exposition à de jeunes stades de développement. Cependant, ils ont aussi noté que les effets n'étaient plus permanents si l'exposition avait lieu au stade adulte. Des analyses chimiques de ces effluents couplées à des études biologiques ont identifié plusieurs composés œstrogéniques naturels (E_2) et synthétiques, utilisés principalement

pour le contrôle de fertilité (éthinylestradiol, EE₂), des dérivés des alkylphénols, et des plastiques (comme le bisphénol A).

Une étude réalisée par le laboratoire sur les effets de l'exposition de queues à tâche noire, *Notropis hudsonius*, aux effluents municipaux a montré plusieurs effets chez les poissons exposés (Aravindakshan *et al.* 2004). Ainsi, les individus présentaient une augmentation des niveaux d'ARNm de *vfg* hépatique et une baisse de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes. De plus, les poissons exposés aux effluents présentaient un retard dans la spermatogenèse par rapport aux individus contrôles.

Les œstrogènes synthétiques sont certainement la source majeure de contamination œstrogénique pour les poissons exposés aux effluents municipaux. Ces composés possèdent un très fort pouvoir d'action, ce qui les rend actifs même à de très faibles concentrations. Purdom *et al.* (1994) ont observé une induction de la VTG chez des mâles de truite arc-en-ciel exposés à des doses d'EE₂ aussi faibles que 0,1 ng/l. Ces résultats laissent présager un impact régulier sur les poissons lorsque les concentrations sont égales ou supérieures à celle de l'étude. Chez le mâle, EE₂ est un puissant antagoniste des récepteurs aux œstrogènes, et induit la synthèse de protéines spécifiques aux femelles comme la VTG et les *zona radiata* (Denslow *et al.* 2001; Islinger *et al.* 2003; Van den Belt *et al.* 2003).

On observe aussi une masculinisation des femelles lors d'exposition au 17 β -trenbolone (Ankley *et al.* 2003) qui possède une très forte affinité pour les RA. L'exposition de femelles à ce composé provoque une diminution de la synthèse de VTG, entraînant une faible qualité des œufs, la production d'hormones mâles et parfois même l'apparition de caractères sexuels secondaires mâles. Les mécanismes d'action du trenbolone sur la synthèse de la VTG ne sont pas encore identifiés, mais plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que la molécule agirait sur l'expression des gènes régulant la synthèse des androgènes et des œstrogènes.

3.5 Les effets des effluents municipaux sur la spermatogénèse des poissons

Les effluents municipaux sont « une soupe » contenant des centaines de composés différents. Dans le cas des effluents d'une grande agglomération, comme Montréal, on y retrouve généralement la plupart des différentes familles de perturbateurs endocriniens.

Plusieurs effets des modulateurs endocriniens sur la spermatogénèse des poissons ont été observés. Étant donné les grandes variétés interspécifiques et la nature des modulateurs endocriniens, on constate qu'un même composé peut induire des effets opposés chez des espèces différentes (cf. Gregory *et al.* 2007).

Un des modulateurs endocriniens les plus étudiés est E₂, et les xénoestrogènes dérivés. En Grande-Bretagne, la féminisation de poissons mâles et la présence d'intersexes ont été reliées à l'exposition de différentes espèces de poissons à des xénoestrogènes (Purdom *et al.* 1994; Jobling *et al.* 1998; 2002). Outre l'augmentation de la présence d'intersexes, les auteurs ont constaté à chaque fois une augmentation des niveaux de VTG hépatique, ainsi qu'une diminution de la croissance des testicules. De plus, la spermatogénèse était fortement altérée chez les individus présentant un fort taux d'intersexes, mais les auteurs ont observé qu'elle était retardée chez une majorité d'individus (Jobling *et al.* 2002).

Dans le cas d'une action directe d'E₂ sur la spermatogénèse, la présence de RO a été caractérisée dans les testicules de poissons ; plusieurs isoformes ont même été identifiées chez différentes espèces (Andreassen *et al.* 2003; Choi et Habibi 2003). De plus, le taux de *er-alpha* testiculaire est augmenté en cas de traitement avec E₂, ce qui suggère alors qu'une exposition à

des composés oestrogéniques peut provoquer une augmentation du niveau de RO dans le testicule et donc augmenter sa sensibilité à ces composés.

Parmi la liste des composés présents dans les effluents municipaux, les alkyphénols sont connus pour avoir une activité oestrogénique. Bien que Jobling *et al.* (1996) n'aient observé aucun effet de l'exposition d'oestrogènes sur la spermatogenèse de truites matures, les auteurs ont démontré que les effets de ces produits sur la spermatogenèse étaient dus à des expositions doses et temps dépendants. On observe chez des mâles de *Zoarces viviparus*, exposés à de fortes doses de E₂ durant 25 jours, une baisse significative de leur index gonado-somatique, ainsi que la dégénérescence des lobules séminifères dans les testicules (Christiansen *et al.* 1998). Gronen *et al.* (1999) ont également observé l'inhibition de la spermatogenèse chez le medaka, *Oryzias latipes*, lors d'une exposition de 21 jours à de l'octylphénol.

Le bisphénol A inhibe ou retarde la maturation des gonades chez le mené tête-de-boule, *Pimephales promelas* exposé durant 71 ou 164 jours (Sohoni *et al.* 2001). Kinnberg et Toft (2003) ont observé que le bisphénol A avait un effet dose-dépendant sur la quantité de spermatocytes présents dans le testicule de Guppy, *Poecilia reticulata* adultes. En effet, lors d'exposition à 500 µg/l de bisphénol A, le nombre de spermatocytes était significativement inférieur à celui des contrôles. Les individus exposés aux plus fortes doses (5000 µg/l) avaient un nombre encore plus réduit de spermatocytes que ceux exposés aux doses plus faibles et que les individus contrôles.

Différentes études effectuées dans notre laboratoire ont montré que l'exposition de queues à tâche noire, *Notropis hudsonius*, à des effluents municipaux de la ville de Montréal, induisait une diminution marquée de la concentration en spermatozoïdes et de leur mobilité, ainsi qu'une augmentation de la présence d'intersex (Aravindakshan *et al.* 2004). De plus, les individus

exposés présentaient une hausse significative des niveaux de vitellogénine hépatique, indiquant une exposition à des xénoestrogènes.

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Pour progresser normalement, la spermatogenèse est un processus qui nécessite une communication cellulaire efficace et les jonctions lacunaires jouent un rôle essentiel dans un système de communication intercellulaire rapide. Par ailleurs, le rôle crucial de la *Cx43* dans la spermatogenèse a d'ores et déjà été mis en évidence chez les mammifères. Cependant, si certaines études indiquent la présence de Cxs dans le testicule de poisson, aucune donnée n'est disponible concernant leur nombre, leur localisation et surtout leur régulation.

De nombreuses études ont montré que l'exposition à des effluents municipaux provoquait des perturbations sévères sur la spermatogenèse des poissons. Cependant, aucune n'a montré si ces perturbations étaient dues à des changements dans la communication intercellulaire. La littérature chez les mammifères montre clairement le rôle primordial de la *Cx43* dans la spermatogenèse. De par sa localisation, au niveau des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig, cette Cx semble jouer un rôle déterminant dans la maturation gonadique.

Mon hypothèse de recherche était que les Cxs jouent un rôle dans la régulation de la spermatogenèse chez l'omble de fontaine et que l'expression et la localisation des différentes Cxs peuvent donner des indices probants d'un tel rôle.

L'objectif principal de la thèse de doctorat était donc d'étudier le rôle des connexines dans la spermatogenèse de l'omble de fontaine. Cinq sous objectifs ont été ciblés : 1) identifier et localiser des Cxs dans le testicule de salmonidés, en utilisant comme modèles l'omble de fontaine et la truite arc-en-ciel ; 2) étudier l'influence des effluents municipaux sur les niveaux de Cxs chez l'omble de fontaine ; 3) établir les variations des Cxs durant la spermatogenèse chez l'omble

de fontaine, ainsi que celles de différents récepteurs hormonaux, afin de comprendre leur régulation; 4) identifier des facteurs de régulation de la cx43 d'omble de fontaine.

Chacun des chapitres suivants présente les expériences relatives à l'un de ces sous-objectifs.

DEUXIÈME PARTIE : ARTICLES

**DEUXIÈME PARTIE, SECTION 1: THE EXPRESSION OF
MULTIPLE CONNEXINS THROUGHOUT SPERMATOGENESIS
IN THE RAINBOW TROUT TESTIS SUGGESTS A ROLE FOR
COMPLEX INTERCELLULAR COMMUNICATION.**

Benjamin de Montgolfier, Julie Dufresne, Myriam Letourneau, James J. Nagler, Alain Fournier, Céline Audet, and Daniel G. Cyr

Publié dans **Biology of Reproduction** 2007; 76: 2-8.

1.1 Résumé français de l'article

Plusieurs espèces de poissons, dont la truite arc-en-ciel, possèdent une reproduction saisonnière. La spermatogenèse chez cette espèce est un processus synchrone, où toutes les cellules germinales se trouvent au même stade de développement à un temps donné. Pour cette raison, la truite arc-en-ciel constitue un modèle d'étude particulièrement intéressant pour mieux comprendre la spermatogenèse. Les jonctions lacunaires forment des canaux intercellulaires qui permettent le passage bi-directionnel de petites molécules, de messagers secondaires et d'ions dont la taille est inférieure à 1 KDa. Ces structures sont composées de connexons qui résultent de l'oligomérisation de protéines transmembranaires appelées connexines. Les objectifs de cette étude étaient d'identifier et de localiser différentes connexines dans le testicule de truite arc-en-ciel, et d'observer si leur expression était reliée à un stade du développement gonadique en particulier. Des truites arc-en-ciel mâles ont été sacrifiées à chaque stade de maturation, l'ARN total a été extrait pour chaque individu, et un testicule a été fixé puis conservé dans de l'éthanol

70% pour les études histologiques. Des RT-PCR ont été réalisés en utilisant deux paires d'amorces dégénérées, correspondant aux deux familles de connexines α et β . Plusieurs produits de PCR ont été observés, indiquant la présence de plusieurs connexines dans le testicule de truite. Ces produits ont ensuite été purifiés et séquencés. Des comparaisons avec des séquences d'autres connexines chez les mammifères ont permis de montrer que les produits correspondaient aux Cx43, Cx43.4, Cx30 et Cx31. Les analyses immunohistochimiques ont permis de localiser spécifiquement chaque connexine. La Cx43 était présente à la membrane des cellules de Sertoli. La Cx43.4 était localisée au niveau des spermatogonies, et des spermatocytes de premier et de second ordre. La Cx30 est présente au niveau des cellules de Leydig, alors que la Cx31 se trouve dans l'épithélium des vaisseaux sanguins. L'expression de chaque connexine varie durant la spermatogenèse, suggérant que chaque protéine est spécifiquement régulée durant la maturation. L'ensemble de ces résultats montre la présence d'un réseau de communication complexe dans le testicule de truite arc-en-ciel, impliquant plusieurs types de canaux différents et une régulation spécifique.

1.2 Contribution de l'étudiant

L'identification et le séquençage des 4 ADNc des Cxs ont été réalisés par Julie Dufresne. La synthèse de peptides pour la création d'anticorps dirigés contre Cx30 et Cx31 a été réalisée par Myriam Létourneau, du laboratoire du Pr Alain Fournier. La reprise de l'expérience d'identification des Cxs durant les différents stades de spermatogenèse, ainsi que l'identification et la localisation des Cxs, par immunobuvardages de type Western et immunohistochimie, ont été réalisées par l'étudiant. La première version du manuscrit de l'article a été écrite par l'étudiant.

De plus, l'étudiant a participé à la version finale du manuscrit en apportant les corrections nécessaires et en participant au choix du journal.

The Expression of Multiple Connexins Throughout Spermatogenesis in the Rainbow Trout Testis Suggests a Role for Complex Intercellular Communication.

Benjamin de Montgolfier¹, Julie Dufresne¹, Myriam Letourneau¹, James J. Nagler², Alain Fournier¹, Céline Audet³, and Daniel G. Cyr^{1,4}

¹ INRS-Institut Armand Frappier, Université du Québec, 245 Hymus boul., Pointe Claire, QC, H9R 1G6. ² Department of Biological Sciences, University of Idaho, Moscow, ID 83844-3051. ³ ISMER, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, QC, G5L 3A1.

Running Title : Connexins in rainbow trout testis.

Keywords : Cellular communication, connexin, Leydig cells, rainbow trout, Sertoli cells, Spermatogenesis, testis.

Summary statement: The expression of rainbow trout connexins during spermatogenesis is stage-specific and cell dependent, suggesting a complex variety of intercellular junctions.

Grant support: Supported by the AQUANET Network of Excellence, the SORDAC, and the VRQ-Network for Quebec Aquaculture (RAQ). B.d.M. was the recipient of a studentship from the Armand-Frappier Foundation.

⁴ Address for correspondence:

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

ABSTRACT

Certain fish, such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), are seasonal breeders. Spermatogenesis in rainbow trout is synchronous; therefore at any time point during this process, germ cells are predominantly at the same stage of development. As such, rainbow trout represent an excellent model in which to study spermatogenesis. Gap junctions are composed of connexons which are themselves formed by six transmembrane proteins termed connexins (Cx_s). The objectives of this study were to assess which Cx_s are expressed in the rainbow trout testis, and if their expression was stage specific during gonadal maturation. Rainbow trout were killed at various stages of maturation, and total cellular RNA was isolated from the testes. RT-PCR using degenerate primers recognizing all vertebrate Cx_s indicates that there are several different Cx_s in trout testes. Amplicons were cloned and sequenced. Similarity comparisons indicate that these were *cx43*, *cx43.4*, *cx31* and *cx30*. Immunolocalization of these Cx_s indicate that Cx43 was localized primarily to Sertoli cells, while Cx43.4 was localized along the lateral plasma membranes between adjacent spermatocytes. Cx30 was localized to the interstitial Leydig cells and Cx31 was localized primarily to the endothelium of interstitial blood vessels. The expression of each Cx varied as a function of the stage of spermatogenesis, suggesting that the expression of these proteins is highly regulated. Together, these results indicate that intercellular communication in the testis is complex, involves several different Cx_s, and is a highly regulated process.

INTRODUCTION

Spermatogenesis requires highly coordinated cellular interactions and communication between differentiating germ cells and Sertoli cells. Gap junctions are responsible for mediating direct intercellular communication between neighboring cells [1]. These junctions are comprised of integral transmembrane proteins termed connexins (CxS) which form a connexon. Connexons from adjacent cells align with each other to form intercellular pores that will permit the exchange of small molecules, including secondary messengers, between cells [1-3]. Gap junctions were first described in the mammalian testis by Dym and Fawcett [4], who showed by electron microscopy that gap junctions were present between adjacent Sertoli cells. Risley et al. [5] first reported the presence of *Cx43* (also known as *Gja1*) in gap junctions between Sertoli cells of the seminiferous tubules, as well as between the Leydig cells of the interstitium. It has been reported that there are at least 12 different CxS expressed in the mammalian testis, suggesting the presence of selective communication between the different cell types of the testis [6]. Gap junctional communication is essential for spermatogenesis, as testes from *Cx43* knockout mice display arrested spermatogenesis [7].

The expression and cellular localization of CxS has been shown to be regulated by several hormones including testosterone [8], thyroid hormones [9], and retinoids [10]. These hormones have also been shown to influence testicular functions and maturation in mammals [11-13]. While we are only now beginning to understand the role and regulation of CxS in the mammalian testis, there is little information on the comparative aspect of gap junctional communication in other vertebrate groups, and whether or not these may represent useful animal models to assess the role of gap junctions in male fertility.

In salmonid fish, spermatogenesis occurs in testicular cysts referred to as spermatocysts. Spermatocysts contain both a Sertoli cell and spermatogonia, which are themselves derived by

mitotic division of a single spermatogonium [14]. Salmonids are seasonal breeders and gonadal maturation involves differentiation and maturation of a pool of germ cells every year [15]. Spermatogenesis occurs in a synchronous pattern, and thus, the germ cells of the testis are all at the same stage of development. As such, this represents an ideal model in which to study the regulation of stage-dependent processes, such as intercellular communication, which occur during spermatogenesis.

Ultrastructural studies have demonstrated the presence of gap junctions between adjacent Sertoli cells and between germ cells and Sertoli cells of teleost fish [16-18]. Batlouni et al. [16] first reported the presence of Cx32 in the catfish (*Pseudoplatystoma fasciatum*) testis. Using immunogold labeling they were able to demonstrate that Cx32 was present in both germ cells and Sertoli cells, suggesting a role for this Cx in testicular gap junctions. Given the complexity of intercellular communication in the mammalian testis, and the large number of Cxs that are implicated in modulating this communication, it appears likely that there are several other Cxs expressed in the fish testis which may modulate various testicular functions.

The objectives of this study were to assess, by RT-PCR and Western blots, which Cxs are expressed in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) testis, to determine, using immunocytochemistry whether the expression of these Cxs varies as a function of spermatogenesis, and to identify which cell types of the testis expressed which Cx.

MATERIAL AND METHODS

Rainbow trout

Male rainbow trout (*O. mykiss*, House Creek strain) were sampled from a population maintained at the University of Idaho's Aquaculture Experiment Station in Hagerman, Idaho. The fish were held in an outdoor raceway under ambient conditions of light and temperature. Ten males at each stage of spermatogenesis (total of 60 fish) were anesthetized (Finquel; Argent, Redmond, WA) and humanely killed, according to a protocol approved by the University of Idaho Animal Care and Use Committee, on five separate occasions between August 1999 and May 2000. The testes were removed from these fish and samples either frozen in liquid and stored at -80°C, or immersion-fixed in Histochoice (Amresco, Solon, OH). These samples were used to provide the six different stages of spermatogenesis found in the rainbow trout [19]. Stages of maturation were defined as follows: Stage 1, testes contained numerous spermatogonia. Stage 2, the testicular cysts are increased in size, spermatogonia and spermatocytes are present; Stage 3, the testis contains spermatogonia, spermatocytes and spermatids; Stage 4, presence of spermatozoa. Stage 5, start of spermiation, tubules are filled with spermatozoa; Stage 6, the testis is in regression, the structure of testicular cysts is disorganized, and vacuoles are present.

Identification of testicular Cxs

To identify testicular Cxs, a RT-PCR strategy was employed using two pairs of degenerate oligonucleotide primers (F1R1 and F2R2; Table 1). The primers were designed according to highly conserved regions of the amino-terminal cytoplasmic domain and the two extracellular loops of the mammalian Cx multigene family [20]. We have previously used this approach to identify epididymal Cxs [21].

Table 1: DNA sequence of RT-PCR primers used to identify different Cxs present in the rainbow trout testis^a.

PRIMERS	SEQUENCES
F1	ATGGGTGACTGGAGYKYCYTRG
R1	ACCACCARCATRAAGAYRATGAAG
F2	GGCTGYRASAAYGTCTGCTAYG
R2	GCCKGGARAYRAARCAGTCCAC

^aRT-PCR conditions are described in the Materials and Methods.

Testes were staged histologically and total RNA was isolated from rainbow trout testes at six different stages of spermatogenesis using Absolutely RNA® Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The isolated RNA was treated with DNase (1 U/ μ g of RNA; deoxyribonuclease I, amplification grade; Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Canada) to remove any contaminating genomic DNA. The resulting RNA was reverse transcribed using oligo d(T) 16-18 primers (Amersham Pharmacia Biotech, Baie D'Urfe, QC, Canada) and M-MLV reverse transcriptase (Canadian Life Technologies) according to the suppliers' instructions. The resulting cDNA templates (250 ng) were amplified using two different primer combinations F1R1 and F2R2 (Table 1). Amplification by PCR was done using 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 60°C for 60 sec, and elongating at 72°C for 90 sec. A final extension at 72°C for 15 min was done to create 3'A-overhangs. The F1R1 and F2R2 RT-PCR products were separated on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The RT-PCR products were extracted from the gel (QIAEX II Gel Extraction Kit; Qiagen, Mississauga, ON, Canada), cloned, and sequenced using an automated sequencer (Sheldon Biotechnology Center, Montreal, QC, Canada). The sequence of the resulting RT-PCR products were compared to other known Cxs using BLAST similarity comparisons (GenBank, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD). Experiments were repeated once on rainbow trout as well as in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) testes (data not shown).

Cx Antisera

Based on the nucleotide sequences of trout testicular Cxs, we assessed the similarity of these sequences with other vertebrates using the JellyFish software (LabVelocity Inc., Los Angeles, CA; Table 2). The nucleotide sequences of the Cxs were converted to their amino acid

Table 2: Similarity of rainbow trout Cx sequences with other vertebrate species.

Trout Cxs	Homology %	Cxs and Species similarity
Cx30	19.40	GJB6 Mouse
	15.9	Cx30 Takifugu
Cx31	25.0	GJB3 Mouse
	20.4	Cx43 Zebrafish
Cx43	33.2	GJA1 Rat
	35.7	Cx43 Carp
Cx43.4	98.6	Cx43.4 Zebrafish

sequences. Based on these sequences, we compared peptide sequences used by commercial companies to generate antisera against mammalian Cxs, and identified those antisera developed against peptides whose sequence was also found in the trout Cx. Using this approach, two antisera were identified as being likely to recognize trout Cxs: Cx43 and Cx43.4. For trout Cx43, an anti-Cx43 (Cx43 H-150, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) was used. Trout Cx43.4 has a high degree of similarity with zebra fish Cx43.4. It had been reported that anti-human CX45 antisera (also known as GJA7) generated against a conserved region of the N-terminal of the protein could recognize zebra fish Cx43.4 (Cx45 N-19, Santa Cruz Biotechnology). Because there were no existing antisera against peptides or proteins whose sequences shared similarity with trout Cx30 and Cx31, we generated custom-made peptides and antisera against these Cxs.

Synthesis of Cx30 and Cx31 Antisera

For both Cx30 and Cx31, the hydrophobicity of the predicted amino acid sequences was assessed using the method of Kyte and Doolittle [22], to identify extracellular and intracellular regions of each Cx. Two peptides were synthesized corresponding to different extracellular regions of Cx30 (amino acids from 62 to 76) and Cx31 (amino acids from 62 to 85) (Table 3). Peptides Cx30 (62-76) and Cx31 (62-85) were synthesized using a solid-phase procedure based on fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) chemistry, with a Rink-AM-amide resin (Chem-Impex International, Wood Dale, IL) as the solid support. N- α -Fmoc protected amino acids (Matrix Innovation Inc., QC, Canada) were introduced into the peptide chain following a benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate coupling strategy, and each coupling reaction was monitored through a ninhydrin test. Most coupling reactions were completed within 1h but, when required, the coupling step was repeated.

Table 3: Peptide sequences used for the synthesis of antibodies against Cx30 and Cx31.

CONNEXIN FRAGMENT	SEQUENCES
Cx30	Val-Cys-Tyr-Asp-His-Phe-Phe-Pro-Val-Ser-His-Thr-Arg-Leu-Trp Cys
Cx31	Val-Cys-Tyr-Asp-Ser-Ile-Phe-Pro-Ile-Ser-His-Ile-Arg-Leu-Trp- Ala-Leu-Gln-Leu-Ile-Phe-Val-Thr-Cys

Cleavage from the resin to obtain crude peptides was achieved with a mixture of trifluoroacetic acid (TFA)/ ethanedithiol/ triisopropylsilane/ water (92.5:2.5:2.5:2.5; 20 ml/g). After TFA evaporation, peptides were precipitated using diethylether.

Disulfide bond formation for the Cx peptides was performed with air oxidation, by leaving the crude peptide solutions at 4°C overnight. Cyclic crude peptides were then purified by RP-HPLC following two different methods, since Cx30 (62-76) and Cx31 (62-85) had distinct solubility properties. Cx30 (62-76) was dissolved in 15% acetonitrile (ACN)/H₂O and 0.06%TFA before being injected onto a Flanged MODCOL column (25 X 3.5 cm) packed with Jupiter C₁₈ resin (15 µm, 300 Å; Phenomenex, Torrance, CA). The purification step was carried out using a Waters Prep 590 pump system connected to a Waters model 441 absorbance detector. The flow rate was maintained at 20 ml/min and the detection at 229 nm. The peptide was eluted from the column with a solvent gradient from 15% to 55% ACN/ H₂O and 0.06%TFA in 2h.

Cx31 (62-85) was dissolved in 20% isopropanol/H₂O containing 1M urea before being injected onto the same column and system used for Cx30 (62-76). The flow rate was maintained at 8 ml/min for this purification. A gradient from 20 to 80% isopropanol/H₂O over 2h was used to obtain a purified Cx31 (62-85) peptide. The purity of the collected fractions was evaluated using analytical RP-HPLC, and the product was characterized by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (Voyager DE; Applied Biosystems, Foster City, CA).

Homogeneous fractions corresponding to the desired peptides were pooled and lyophilized. The purified peptides were linked to the keyhole limpet hemocyanin protein and used to generate rabbit polyclonal antisera (PolyQuik method; Zymed Laboratories, San Francisco, CA). Two antisera were produced against each Cx-specific peptide.

Western Blotting

The specificity of both the commercial antisera as well as the trout-specific antisera was assessed by Western blot analyses. A membrane-enriched protein fraction was extracted from mature rainbow trout testis. Tissues were ground with a mortar and pestle in liquid nitrogen and homogenized in buffer (7 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.04 mM CaCl₂, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotonin, 100 µg/ml PMSF, 1 µg/ml pepstatin, 2 µg/ml antipain) using a motor-driven pestle. Samples were centrifuged at 2 200 x g for 30 min at 4°C, and the supernatant was then removed and centrifuged at 30 000 x g for 30 min at 4°C. The resulting protein pellet was resuspended in homogenization buffer and the protein concentration determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories). Samples were stored at -86°C until electrophoresis. Samples were heated at 95°C for 2 min and resolved in Laemmli buffer on a 12.5% SDS polyacrylamide gel. Separated proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories) at 100 V for 90 min at 4°C. The resulting blots containing the proteins were stained with Ponceau red S to evaluate the transfer efficiency. The blots were then rinsed and blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline-Tween (TBST) buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, and 0.05% Tween 20, pH 7.5) containing 5% non-fat powdered milk. Membranes were incubated with the corresponding anti-Cx antisera (anti-Cx43 [800 ng/ml], anti-Cx43.4 [800 ng/ml], anti-Cx30 [1 µl/ml], and anti-Cx31 [1.33 µl/ml]) in TBST buffer for 75 min at room temperature. The blots were washed four times for 15 min in TBST at room temperature and subsequently incubated for 60 min with an appropriate alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit (Cx30, Cx31, Cx43) or anti-goat (Cx43.4) secondary antibody (400 ng/ml; Santa Cruz Biotechnology) in TBST containing 5% non-fat milk, and subsequently washed as described above. Complexed antibodies were revealed using the Bio-Rad blotting detection kit (Bio-Rad Laboratories). Western blots were repeated twice (n = 3) on separate individuals.

Immunolocalization of the Different Cxs

Small pieces (0.5 cm^2) of the middle portion of one testis were fixed in Histochoice MB (Amresco, Solon, OH). After 2 weeks of fixation at 4°C , the tissues were stored in 70% ethanol at room temperature. Tissues were subsequently dehydrated with graded ethanols and embedded in paraffin. Tissues sections ($4\text{ }\mu\text{m}$) were mounted onto glass slides coated with poly-L-lysine for immunohistochemistry. Testes from four different fish ($n = 4$) at each stage of spermatogenesis were used for immunolocalization of each Cx. Tissue sections were deparaffinized in HistoClear (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and rehydrated by immersion in a series of graded ethanols. Immunocytochemistry was done using the DAKO Catalyzed Signal Amplification System (DAKO, Carpenteria, CA) according to the manufacturer's instructions. Tissue sections were incubated at 37°C with each of the anti-Cx antisera: anti-Cx43 (800 ng/ml for 60 min), anti-Cx43.4 (800 ng/ml for 90 min), anti-Cx30 (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ for 90 min), and anti-Cx31 (1.33 $\mu\text{l}/\text{ml}$ for 60 min). Antibody binding to each Cx was detected using either anti-rabbit or anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antiserum according to the manufacturer's instructions. Sections were counter stained with methylene blue. Tissue sections incubated with normal rabbit serum were used as a negative control.

RESULTS

Identification of Testicular Cxs

Amplification of testicular mRNA by RT-PCR with the F1R1 primers yielded a single amplicon of 649 bp (Fig. 1a). Sequencing of this cDNA, followed by BLAST search in Genbank, confirmed that the amplified product was *cx43*. *cx43* mRNA was expressed at all stages of spermatogenesis (Fig. 1a).

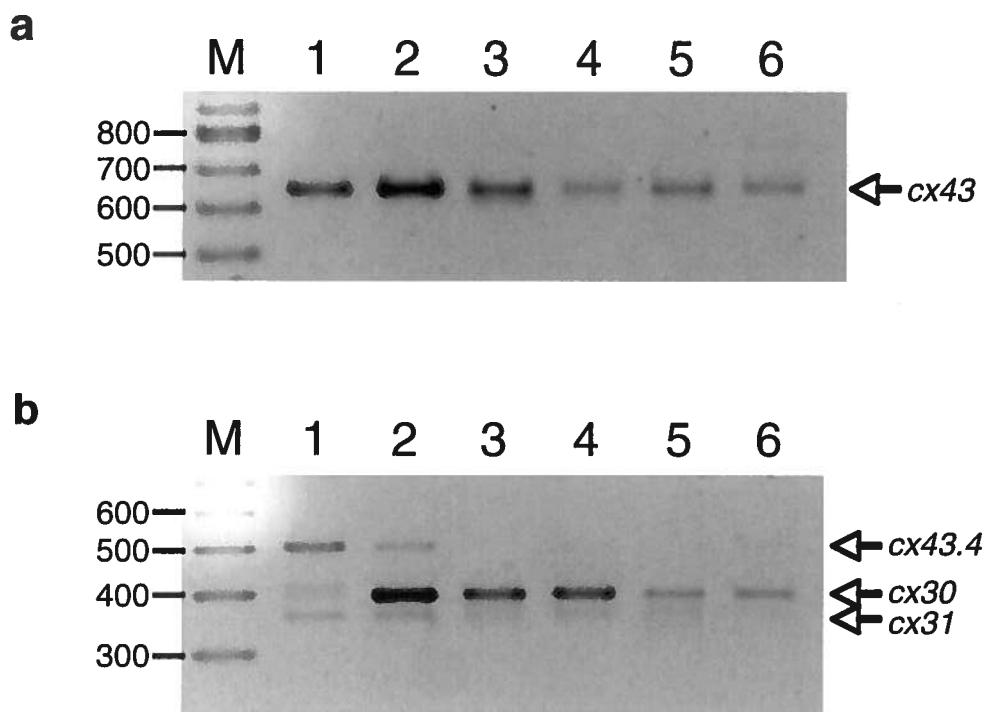


Figure 1: RT-PCR amplification of cx mRNAs from rainbow trout testes at different stages of spermatogenesis (stages 1 to 6). Degenerate primers were used to amplify trout Cxs. The F1R1 primer set amplified a single product of 649 bp (a) which was sequenced and identified as *cx43*. The F2R2 primers amplified three products of 506, 398, and 357 bp (b) which were identified as *cx43.4*, *cx30* and *cx31*. M, DNA ladder.

In contrast, amplification with the F2R2 primers resulted in the amplification of three different amplicons of 506, 398, and 357 bp (Fig. 1b). Sequencing results indicated that these cDNAs were *cx43.4*, *cx30*, and *cx31*. Unlike *cx43*, not all of these amplified Cxs were expressed throughout spermatogenesis. *cx43.4* was expressed only in stages 1 and 2 of spermatogenesis while *cx30* was present at all stages of spermatogenesis. Finally, *cx31* was present in stages 1-5, and was undetectable at stage 6. Data was reproducible and similar to results observed in brook trout testis (data not shown) suggesting that this may be consistent between salmonids.

Cx Antisera

Western blot analyses were done to assess the specificity of the antisera for rainbow trout Cxs. Anti-Cx43 antisera recognized a single protein band of 43 kDa from the rainbow trout testis (Fig. 2). Rat epididymis was used as a positive control for Cx43 and negative controls in which there was no primary antiserum, did not show any specific protein bands of this molecular weight. The Cx43.4 antisera recognized a single 44 kDa protein (Fig. 2). Rat brain was used as positive control for Cx43.4. Antisera generated from synthesized peptides for Cx30 and Cx31 also recognized a single protein of the appropriate molecular weight (30 and 31 kDa respectively; Fig. 2). Incubation of protein blots with preimmune serum did not reveal any bands corresponding to these molecular weights.

Immunolocalization of Testicular Cxs

We observed a unique immunostaining pattern for each Cx through immunolocalization of rainbow trout Cxs, suggesting that each Cx is involved in cell-specific intercellular communication. Cx43 was localized in linear arrays at the periphery of the Sertoli cell plasma membranes (Fig. 3A) in rainbow trout testis. No immunostaining was observed in either Leydig

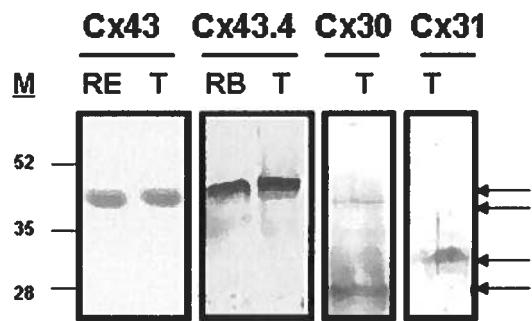


Figure 2: Western blot analysis of Cx43, Cx43.4, Cx31, and Cx30 in the trout testis. Cx43 was identified using a commercial antisera against a peptide synthesized according to the sequence of the murine Cx43. Rat epididymis (RE) was used as positive control. Cx43.4 was identified using a commercial antisera against a peptide synthesized according to the sequence of the human CX45 and which is present in trout Cx43.4. Rat brain (RB) was used as positive control. Both Cx30 and Cx31 antisera were raised against specific trout Cx peptides.

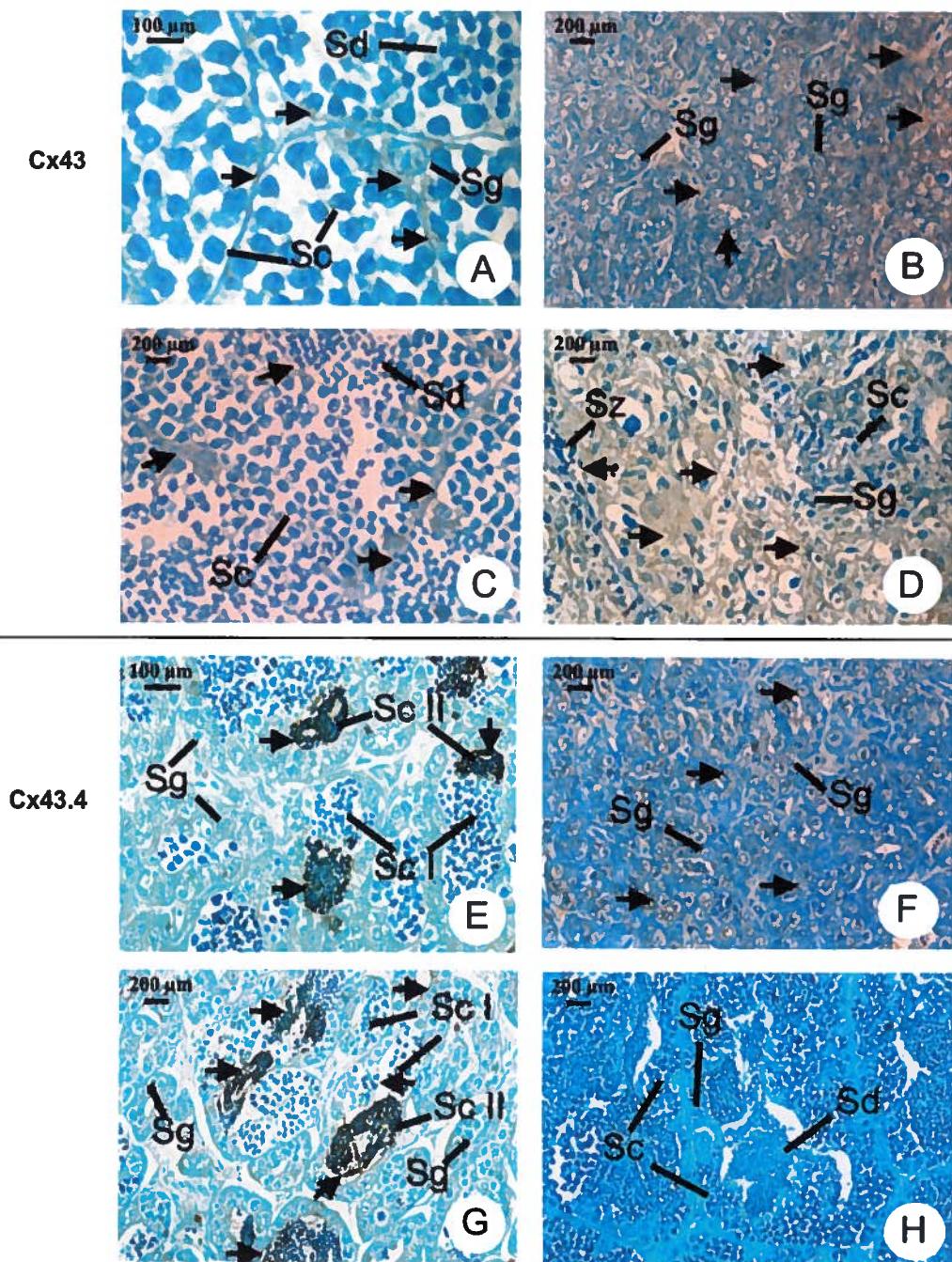


Figure 3: Immunolocalization of Cx43 and Cx43.4 in rainbow trout testes. Cx43 was localized between Sertoli cells at every stage of spermatogenesis (stage 3 testis [A]; stage 1 testis [B]; and stage 3 [C]), and also between spermatocytes in stage 6 (D). Cx43.4 is expressed between spermatogonia and between pachytene spermatocytes (Type II) (stage 2 [E]). Cx43.4 is expressed only in stage 1 (F) and 2 (G); it is not detected in testes of stages 3(H) to 6 (not shown). Arrows indicate specific immunostaining; Sg= Spermatogonia; Sc I= Preleptotene Spermatocytes (type I); Sc II= Pachytene Spermatocyte (type II); Sd= Spermatid; Sz= Spermatozoa. Original magnification x400 (B-D, F, G) and x1000 (A, E).

cells or other cells of the interstitium (Fig 3 A-C). A weak immunoreaction was also observed between developing spermatocytes at stages 1 and 2 of spermatogenesis (Fig 3B). The immunolocalization of Cx43 was not altered as a function of the stage of spermatogenesis between stages 1 and 5, although the immunoreaction appeared to be less intense in testes of stage 1 (Stages 1 and 3 are shown in Fig. 3 B and C). The localization of Cx43 appeared to change somewhat at stage 6 of spermatogenesis, where a more cytoplasmic reaction was observed (Fig. 3D). This suggests that there may be a loss of Cx43 gap junctional coupling at this stage of spermatogenesis.

Cx43.4 was localized between spermatogonia, type I spermatocytes, and type II spermatocytes at stages 1 and 2 of spermatogenesis (Fig. 3 E-G). The immunoreaction was particularly intense along the plasma membrane of type II spermatocytes in stage 2 testes. Cx43.4 was not detectable by immunocytochemistry at any other stage of spermatogenesis (Fig. 3H).

Cx30 was localized between interstitial Leydig cells of the testis. Cx30 immunoreaction appeared as an intense reaction between Leydig cells (Fig. 4A, 1000x). There was no immunostaining within the spermatocysts. While Cx30 immunostaining did not vary dramatically between stages 1 and 5, the immunoreaction appeared to be more intense at stages 1 and 3 of spermatogenesis (Fig. 4 B and C). In stage 6 testes, the localization of Cx30 varied, and appeared to be localized along the base of the spermatocysts (Fig. 4D, 400x).

Cx31 was localized to the spermatocytes, as well as to the endothelium of interstitial blood vessels (Fig. 4E). Cx31 immunoreaction appeared more intense at stage 1 as compared to stages 2-5 of spermatogenesis (Fig. 4 F and G). At stage 6 of spermatogenesis, Cx31 was localized to the base of the spermatocysts (Fig. 4H), as well as between spermatogonia and spermatocytes.

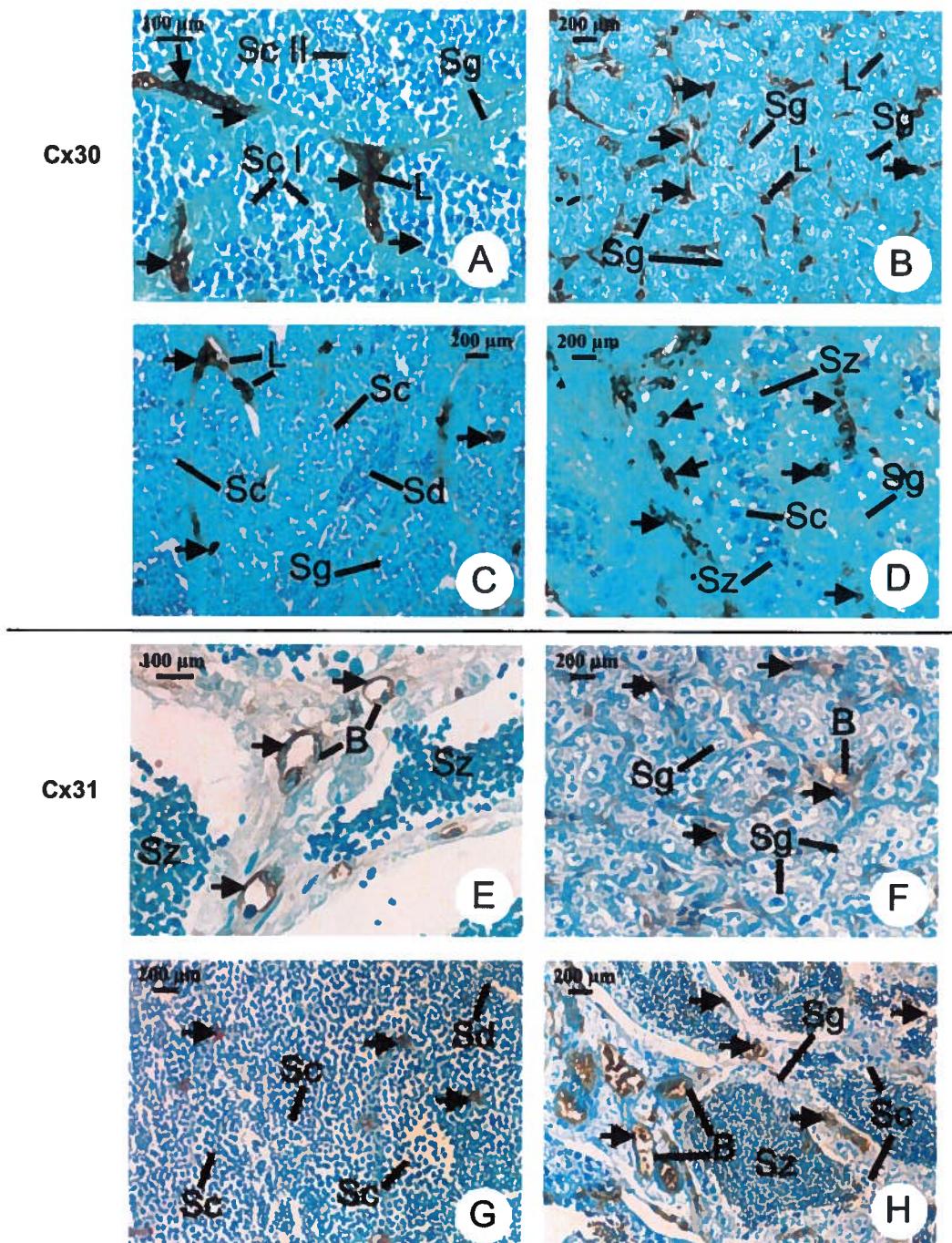


Figure 4: Immunolocalization of Cx30 and Cx31 in rainbow trout testes. Cx30 was localized between Leydig cells (stage 3 [A]). Cx30 is expressed at every stage of spermatogenesis between Leydig cells (stage 1 [B] and stage 3 [C]), and also between spermatocytes and Sertoli cells in testes at stage 6 of spermatogenesis (D). Cx31 is expressed between endothelium of blood vessels (stage 5 [E]). The localization of Cx31 does not change during spermatogenesis. Testes of stages 1 (F), 3 (G), and 6 (H) are shown. Sg= Spermatogonia; Sc I= Preleptotene Spermatocytes ; Sc II= Pachytene Spermatocytes II; Sd= Spermatid; Sz= Spermatozoa; B= blood vessel; L= Leydig cell. Original magnification x400 (B-D and F-H) and x1000 (A, E).

DISCUSSION

Gap junctional intercellular communication in the testis has been shown to be essential for testicular development and spermatogenesis in mammals [7, 23-25]. In mammals, there are at least 12 different Cxs that are expressed in the testis and that appear to mediate complex intercellular communications implicated in testicular functions [26]. There is little information on the presence of Cxs in the testis of other vertebrates. In the present study, we have shown that there are at least four different Cxs that are expressed in the salmonid testis: *cx43*, *cx43.4*, *cx30*, and *cx31*. Other studies have reported that *cx48.5* transcripts are expressed in the testis of adult zebra fish [27]. Thus, these results indicate that, as in mammals, adult fish testis express a variety of Cxs. This suggests that there may be different signals that are exchanged between different cell types of the salmonid testis.

Our observations indicate that *Cx43* expressed throughout spermatogenesis and was localized in Sertoli cells. Marina et al. [18] reported that the Sertoli cells of the spotted ray are coupled by gap junctions. Our results suggest that these gap junctions are likely composed of *Cx43*. Previously, *cx43* has been identified in the rodent testis, and its absence results in arrested spermatogenesis in the mouse; it has also been linked to infertility in humans [10, 28, 29]. Decrouy et al. [30], using *in situ* hybridization, reported that, in the rat, *cx43* participates in the coupling of neighboring Sertoli cells. Plum et al. [31] have demonstrated that substitution of *cx43* by *cx32* (also known as *Gjb1*) or *cx40* (also known as *Gja5*) induces altered spermatogenesis, suggesting not only that *cx43* is essential for the control of spermatogenesis, but that there are gap junctions composed of different Cxs that allow different messages to be exchanged between cells. It has been suggested that homologous communication between adjacent Sertoli cells provides a mechanism whereby these cells could synchronize gonadal maturation [30, 32]. Based on the

cellular distribution of Cx43 within the testis, it would appear that the role of *cx43* in the testis is highly conserved in evolution, and likely plays a similar role in fish as it does in mammals.

Recent studies have indicated that the expression of Cxs varies with different stages of spermatogenesis in the mouse [33]. Using cDNA arrays, it was observed that mRNA levels for *cx26* (also known as *Gjb2*) and *cx40* (also known as *Gja5*) increase as spermatogonia pass from type A to type B, and that *cx26* mRNA decreases when type B spermatogonia develop into preleptotene spermatocytes. We have also observed that the expression of Cx transcripts varies as a function of spermatogenesis. In this case, *cx43.4* was expressed only in stages 1 and 2 of spermatogenesis. Immunolocalization of Cx43.4 indicates the presence of a weak immunoreaction in spermatogonia and a more pronounced immunostaining reaction in spermatocytes. Based on the histology of the cells, we could identify two main populations of spermatocytes in stage 1 and 2 testes of the trout: preleptotene (type I) and pachytene (type II) spermatocytes. Our results indicate that Cx43.4 is expressed exclusively in type II spermatocytes. Cx43.4 was not observed at other stages of spermatogenesis. This is consistent with RT-PCR data that indicate that *cx43.4* is expressed only in stages 1 and 2 of spermatogenesis. *cx43.4* is an ortholog of the human and avian *Cx45*, and has also been identified in the zebra fish [34]. In zebra fish, *cx43.4* is expressed during gastrulation with the first definitive assignments of axial cell fate, and during tail formation. *cx43.4* was not expressed in the most posterior region of the embryonic shield or in the overlying primary ectoderm during the late stages of gastrulation [34]. In the mouse, *Cx45* has also been identified in the testis [23, 35]. Mok et al. [36] have also reported that *Cx31* (also known as *Gjb3*) is expressed in spermatogonia and primary spermatocytes of the rat testes, using both *in situ* hybridization and immunohistochemistry. These results suggest that, in rainbow trout, Cx43.4 may play a similar role to that of Cx31 in the mammalian testis. The specific spatial and temporal expression of Cx43.4 in germ cells suggest

that Cx43.4 function is tightly regulated and required during a restricted window of cellular differentiation at early stages of spermatogenesis.

In our experiments, we observed that Cx30 was localized between Leydig cells of the testis. *Cx30* expression appeared to increase between stages 1 and 2 of spermatogenesis, which is consistent with the notion that gap junctional communication is involved in the control of androgen secretion [18, 37, 38]. This observation is consistent with RT-PCR data, which suggest an increase in *cx30* mRNA levels between stages 1 and 2. Whether or not *cx30* is androgen-dependant, or if it is regulated by hypophyseal factors implicated in steroidogenesis, remains to be determined. In rodents, it has been shown that *Cx43* is present between Leydig cells of the testis [5, 8, 39]. Whether or not *cx30* in rainbow trout has a homologous function also remains to be established. Mammalian studies have shown that *Cx30* (also known as *Gjb6*) is distributed in different tissues such as the brain, uterus, testis, and kidney [40, 41]. While Dahl et al. [40] have detected *Cx30* in the mouse testis by Northern blot analyses, they did not localize it to a particular cell type. It is, therefore, not possible at the moment to establish whether or not *cx30* has a cellular distribution in the mammalian testis similar to that in the trout.

Cx31 was expressed at low levels throughout spermatogenesis at the mRNA level and protein level where it was localized to the endothelial cells of the capillary in the interstitium of the testis, as well as between spermatogonia and spermatocytes. While *Cx31* has never been identified in teleosts, its localization in the testis appears to resemble that of *Cx37* (also known as GJA4), which is localized primarily to endothelial cells [36, 42]. It has been reported in the literature that *Cx31* is one of the earliest Cxs to be expressed in murine development, and is present as early as the morula stage and throughout the blastocyst [40]. The presence of *Cx31* mRNA transcripts in the testis were first reported by Hennemann et al. [35]. As stated above, Mok et al. [36] identified *Cx31* in the spermatogonia and early spermatocytes. Clearly, however,

rainbow trout Cx31 has a different cellular distribution pattern in the testis than mammalian Cx31, indicating different functions for Cx31 gap junctions in rainbow trout.

The expression and localization of Cxs at stage 6 of spermatogenesis is complex. At the end of the reproductive cycle, it has been demonstrated that testis which have just finished spermatogenesis show the presence of certain cells that have already begun a new cycle of spermatogenesis [15]. At this stage, the lobules shrink and the Sertoli cells retract their processes, resulting in a more pronounced lobular membrane. Dziewulska and Domagala [15] have also observed the presence of large vacuoles in different species of salmonids at this stage. The vacuoles can remain in the Sertoli cells for a long time after the end of the reproduction cycle. The appearance of these vacuoles and Sertoli cells' retraction may explain the diffuse localization of Cx43 at stage 6. Certainly, it would appear that these cells are not forming specific gap junctions between Sertoli cells at this stage, since the Cx43 localization is cytoplasmic, as opposed to being localized on the plasma membranes where gap junctions are normally observed. Similarly, Leydig cells are also altered at the end of spermatogenesis, as determined by both the cytoplasmic and mitochondrial structures of the cells [43]. These changes are associated with a decrease in circulating sex steroids [44]. Furthermore, as steroid levels decrease at the end of the cycle, Leydig cells degenerate [43]. This phenomenon could explain the altered Cx30 localization in stage 6, where we observed the presence of Cx43 around Sertoli cells, spermatogonia, and some spermatocytes.

Together, the data from this study indicate that intercellular communication in the rainbow trout testis is complex and involves gap junctions comprised of different Cxs. Interestingly, each Cx is localized to different cell types of the testis, suggesting that different types of messages are likely exchanged between different cell types of the testis, and that these change as a function of the stage of spermatogenesis. While we have identified four testicular

Cxs, it is likely that there are other Cxs in the rainbow trout testis that may be implicated in communication between more mature spermatogenic cells. Nevertheless, this study shows that the localization of testicular Cxs in rainbow trout share many similarities with those of mammalian testis, thereby confirming the importance of this intercellular communication in the progression of spermatogenesis. Further studies on the endocrine regulation of these Cxs will allow a better understanding of the physiological role of these proteins in spermatogenesis and testicular development in fish.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank J. Barthelemy for her assistance and M. Gregory for her helpful suggestions.

REFERENCES

1. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* 1996; 65: 475-502.
2. Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research.* 2004; 62: 228-232.
3. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996; 84: 381-388.
4. Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 1970; 3: 308-326.
5. Risley MS, Tan IP, Roy C, Saez JC. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci.* 1992; 103: 81-96.
6. Pointis G, Fiorini C, Defamie N, Segretain D. Gap junctional communication in the male reproductive system. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1719: 102-116.
7. Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK, Kidder GM. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 2001; 65: 829-838.
8. Cyr DG, Hermo L, Laird DW. Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. *Endocrinology.* 1996; 137: 1474-1484.
9. St-Pierre N, Dufresne J, Rooney AA, Cyr DG. Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. *Biol Reprod.* 2003; 68: 1232-1240.
10. Batias C, Siffroi JP, Fenichel P, Pointis G, Segretain D. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 793-805.

11. Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 2001; 65: 660-671.
12. Maran RR. Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Arch Androl* 2003; 49: 375-388.
13. Umez M, Kagabu S, Jiang JY, Niimura S, Sato E. Developmental hormonal profiles in rdw rats with congenital hypothyroidism accompanying increased testicular size and infertility in adulthood. *J Reprod Dev* 2004; 50: 675-684.
14. Grier HJ, Linton JR, Leatherland JF, De Vlaming VL. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am J Anat* 1980; 159: 331-345.
15. Dziewulska K, Domagala J. Histology of salmonid testes during maturation. *Reprod Biol* 2003; 3: 47-61.
16. Batlouni SR, Carreno FR, Romagosa E, Borella MI. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatum* (Pisces, Siluriformes). *J Mol Histol* 2005; 36: 97-110.
17. Loir M, Sourdaine P, Mendis-Handagama SM, Jegou B. Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc Res Tech* 1995; 32: 533-552.
18. Marina P, Annamaria L, Barbara D, Loredana R, Piero A, Francesco A. Fine structure of leydig and sertoli cells in the testis of immature and mature spotted ray *Torpedo marmorata*. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 192-201.
19. Schulz R. Serum levels of 11-oxotestosterone in male and 17 β -estradiol in female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 1984; 56: 111-120.

20. Itahana K, Morikazu Y, Takeya T. Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-30.3, Cx-32, and Cx-43, in the porcine ovarian follicle. *Endocrinology*. 1996; 137: 5036-5044.
21. Dufresne J, Finnson KW, Gregory M, Cyr DG. Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003; 284: 33-43.
22. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982; 157: 105-132.
23. Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 1999; 60: 1263-1270.
24. Risley MS. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod*. 2000; 62: 748-54.
25. Risley MS, Tan IP, Farrell J. Gap junctions with varied permeability properties establish cell-type specific communication pathways in the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 2002; 67: 945-952.
26. De Sousa PA, Valdimarsson G, Nicholson BJ, Kidder GM. Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development* 1993; 117: 1355-1367.
27. Cheng S, Shakespeare T, Mui R, White TW, Valdimarsson G. Connexin 48.5 is required for normal cardiovascular function and lens development in zebrafish embryos. *J Biol Chem* 2004; 279: 36993-37003.
28. Bravo-Moreno JF, Diaz-Sanchez V, Montoya-Flores JG, Lamoyi E, Saez JC, Perez-Armendariz EM. Expression of connexin43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development. *Anat Rec* 2001; 264: 13-24.

29. Steger K, Tetens F, Bergmann M. Expression of connexin 43 in human testis. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 215-220.
30. Decrouy X, Gasc JM, Pointis G, Segretain D. Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. *J Cell Physiol* 2004; 200: 146-154.
31. Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim J, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 2000; 10: 1083-1091.
32. Defamie N, Berthaut I, Mograbi B, Chevallier D, Dadoune JP, Fenichel P, Segretain D, Pointis G. Impaired gap junction connexin43 in Sertoli cells of patients with secretory azoospermia: a marker of undifferentiated Sertoli cells. *Lab Invest* 2003; 83: 449-456.
33. Yu Z, Guo R, Ge Y, Ma J, Guan J, Li S, Sun X, Xue S, Han D. Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis. *Biol Reprod* 2003; 69: 37-47.
34. Essner J, Laing JG, Beyer EC, Johnson RG, Hackett PB Jr. Expression of zebrafish connexin43.4 in the notochord and tail bud of wild-type and mutant no tail embryos. *Dev Biol*. 1996; 177: 449-462.
35. Hennemann H, Schwarz HJ, Willecke K. Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells: molecular cloning of mouse connexin31 and -45 cDNAs. *Eur J Cell Biol* 1992; 57: 51-58.
36. Mok BW, Yeung WS, Luk JM. Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes. *FEBS Lett* 1999; 453: 243-248.
37. Nagahama Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol* 1994; 38: 217-229.

38. Nakaghi LS, Mitsuiki D, Santos HS, Pacheco MR, Ganeco LN. Morphometry and morphology of nucleus of the Sertoli and interstitial cells of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1881) (Pisces: Characidae) during the reproductive cycle. *Braz J Biol* 2003; 63: 97-104.
39. Perez-Armendariz E, Lamoyi E, Mason JI, Cisneros-Armas D, Luu-The V, Bravo Moreno JF. Developmental regulation of connexin 43 expression in fetal mouse testicular cells. *Anat Rec*. 2001; 264: 237-246.
40. Dahl E, Manthey D, Chen Y, Schwarz HJ, Chang YS, Lalley PA, Nicholson BJ, Willecke K. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30,a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J Biol Chem* 1996; 271: 17903-17910.
41. Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Sohl G, Jahnke K, Winterhager E, Herberhold C, Hardelin JP, Petit C, Willecke K. Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 13-21.
42. Tan IP, Roy C, Saez JC, Saez CG, Paul DL, Risley MS. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biol Reprod* 1996; 54: 1300-1310.
43. Loir M. Interstitial cells from the testis of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vivo and in primary culture. *Cell Tissue Res* 1990; 261: 133-144.
44. Scott AP, Sumpter JP. Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 73: 46-58.

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 2 : INFLUENCE OF MUNICIPAL EFFLUENTS ON THE EXPRESSION OF CONNEXINS IN THE BROOK TROUT (*Salvelinus fontinalis*) TESTIS.

Benjamin de Montgolfier, Michel Fournier, Céline Audet, David Marcogliese, et Daniel G. Cyr

Publié dans **Aquatic Toxicology** 2008; 86 : 38-48.

2.1 Résumé français de l'article

Les jonctions lacunaires sont composées de connexons, formés de protéines transmembranaires appelées connexines. Chez les mammifères, la communication intercellulaire via les jonctions lacunaires est essentielle au déroulement de la spermatogenèse. Des études précédentes de notre laboratoire ont montré que les effluents municipaux pouvaient modifier la spermatogenèse chez les queues à tâche noire (*Notropis hudsonius*). Le but de la présente étude était de déterminer si les effluents municipaux altéraient l'expression des connexines dans les testicules de l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*). Les poissons ont été exposés durant quatre et douze semaines à différentes concentrations d'effluents (0, 1, 10, et 20%). Les taux de vitellogénine hépatique n'ont pas montré de variations significatives entre les différents groupes après quatre semaines d'exposition. En revanche, les taux d'ARNm de *cx43* (connue aussi sous le nom de *Gja1*) et de *cx31* étaient significativement augmentés dans le groupe exposé à 1%. Les taux de *cx43.4* et de *cx30* ne présentaient pas, quant à eux, de variations significatives quelle que soit la dose d'exposition. Après douze semaines d'exposition, la spermatogenèse des individus

exposés à 1% d'effluents était plus avancée que celle des autres groupes, y compris celle des individus contrôles. Les taux de vitellogénine hépatique étaient augmentés significativement aux doses les plus fortes (10 et 20%) par rapport aux contrôles et au groupe exposé à 1%. L'expression de *cx43* était supérieure chez les individus contrôles par rapport à tous les autres groupes. Les taux de *cx43.4* ont augmenté de façon dose-dépendante, tout en restant plus faible que chez les contrôles. Les taux de *cx31* étaient significativement plus faibles dans les groupes exposés à 1 et 10% par rapport aux contrôles et aux individus exposés à 20%. Les taux d'ARNm de *cx30* n'ont pas montré de variations entre les groupes. Ces résultats indiquent qu'une exposition à des effluents municipaux à long terme stimule les premiers stades de spermatogenèse chez l'omble de fontaine. De plus, les observations suggèrent que les taux d'ARNm de *cx43* pourraient être un bon indicateur du développement testiculaire chez cette espèce.

2.2 Contribution de l'étudiant

Le schéma expérimental de l'expérience et l'entretien des bassins expérimentaux ont été élaborés lors de réunions conjointes entre l'étudiant, son directeur de thèse et le laboratoire du Dr. Fournier. L'ensemble des expériences présentées dans cette étude a été réalisé par l'étudiant. La première version du manuscrit de l'article a été écrite par l'étudiant. De plus, l'étudiant a participé à la version finale du manuscrit en apportant les corrections nécessaires et en participant au choix du journal.

Influence of Municipal Effluents on the Expression of Connexins in the Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) Testis

Benjamin de Montgolfier^a, Michel Fournier^{a,b}, Céline Audet^b, David Marcogliese^c, and Daniel G. Cyr^{a,d}

^a INRS-Institut Armand Frappier, Université du Québec, 245 Hymus boul, Pointe-Claire, QC. ^b H9R 1G6, ISMER, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, QC. G5L 3A1 ^c Fluvial Ecosystem Research Section, Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Water Science and Technology Directorate, Science and Technology Branch, Environment Canada, St. Lawrence Centre, 105 McGill, Montreal, QC, H2Y 2E7, Canada

Running Title: Impact of municipal effluents on the testis.

^d Address for correspondence:

Dr. Daniel Cyr
INRS-Institut Armand Frappier
245 Hymus boul.
Pointe-Claire, Qc, H9R 1G6
Tel. (514) 630-8833
Fax (514) 630-8850
e-mail: Daniel.cyr@iaf.inrs.ca

Abstract

Gap junctions are essential for spermatogenesis. Exposure to municipal wastewater effluent can modify spermatogenesis in fish. The present aim was to determine if municipal wastewater effluent could alter the expression of testicular connexins (Cxs) in brook trout. Trout were exposed for 4 and 12 weeks to various concentrations of municipal effluent (0, 1, 10 and 20%, v/v). Hepatic vitellogenin (*vtg*) mRNA levels were not different between exposure groups after 4 weeks. At this time, testicular *cx43* and *cx31* mRNA levels increased in the 1% group, but *cx30* and *cx43.4* levels were not different at any concentration. Immunolocalization of each Cx did not differ between groups after 4 weeks. After 12 weeks, spermatogenesis in the 1% group was more advanced than in other groups, and hepatic *vtg* mRNA levels were significantly increased at the higher exposure concentrations. Testicular *cx43* mRNA levels were higher than controls at all doses, while *cx43.4* levels increased in a dose-dependent manner but remained lower than controls. *cx31* mRNA levels were significantly lower in the 1 and 10% groups than in control and 20% group, while *cx30* levels did not vary. Immunolocalization of Cxs did not differ between groups except for Cx43.4, which was expressed between spermatocytes in the 1% group. Furthermore, the Cx31 immunoreaction appeared to decrease in testicular blood vessels of fish exposed to the highest dose. Furthermore, *vegf* mRNA levels were unaltered by treatment at both time points. Thus, long-term exposure to environmental concentrations of wastewater effluent can alter the expression of testicular Cxs.

Keywords: gap junctions, wastewater, spermatogenesis, vitellogenin, brook trout, endocrine disruptors.

1. Introduction

Spermatogenesis is a complex process involving highly coordinated intercellular communication between Sertoli cells and developing germ cells. This type of intercellular communication is mediated by gap junctions, which allow direct communication between adjacent cells (Söhl and Willecke, 2004). These junctions play a critical role in the control of cell proliferation and differentiation during spermatogenesis.

Gap junctions are transmembrane channels between adjacent cells, and contain aggregates of oligomeric channels. These channels, or connexons, allow direct passage of regulatory molecules (< 1kDa) such as amino acids, secondary messengers, Ca^{2+} , and cAMP, between adjacent cells (Saez et al., 1989; Vaney et al., 1998). Connexons are formed by the oligomerization of structurally related proteins, connexins (Cx_s; Musil and Goodenough, 1991). Approximately twenty connexins have been identified and sequenced in humans, and many similarities exist with other vertebrate species (Altevogt et al., 2002; Lagree et al., 2003).

It has been shown that in the mammalian testis, Cx43 is localized between adjacent Sertoli cells and between Leydig cells (Pelletier, 1995; Tan et al., 1996; Batias et al., 2000). Cx43 has been shown to be essential for spermatogenesis (Chung et al., 2001; Perez-Armendariz, 2001; Fiorini et al., 2004). Decreased expression of *cx43* in mouse and humans is associated with defects in spermatogenesis (Batias et al., 1999; Roscoe et al., 2001; Defamie et al., 2003; Pointis and Segretain, 2005).

Cx_s in fish testis were first identified in spotted torpedo, *Torpedo marmorata* (Marina et al., 2002). Studies in catfish have suggested that Cx_s may be implicated in spermatogenesis (Batlouni et al., 2005). de Montgolfier et al. (2007) identified and localized four different Cx_s (Cx43, Cx43.4, Cx30, and Cx31) in the testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A specific expression pattern for each Cx was observed during spermatogenesis. These data suggest

that, as in mammals, the expression and regulation of testicular Cxs is necessary for normal testicular functions.

There has been increasing interest in the mechanisms by which endocrine disrupting chemicals can alter reproductive functions. Previous studies from our laboratory reported that immature spottail shiner (*Notropis hudsonius*) from the St. Lawrence River downstream from the City of Montreal's sewage effluent discharge exhibit elevated levels of hepatic *vfg* mRNA, suggesting that these fish are exposed to environmental estrogens (Aravindakshan et al., 2004b). Furthermore, these fish exhibit delayed spermatogenesis, decreased sperm counts, altered sperm motility and a higher incidence of intersex. In subsequent experiments, fish from this exposure site or from a non-contaminated reference site were fed to lactating rat dams. When the male pups reached adulthood, those fed with fish from the effluent exposure site exhibited altered sperm counts and motility, and decreased Cx43 immunostaining in the testes (Aravindakshan et al., 2004a). Studies using cultured Sertoli cells indicated that Cx43-mediated intercellular communication could be inhibited by nonylphenol, an environmental toxicant found in wastewater effluent, and which was present at elevated levels at those sites where fish had been sampled (Aravindakshan and Cyr, 2005). These studies also demonstrated that nonylphenol inhibited Cx43 intercellular communication by decreasing Cx43 phosphorylation via the inhibition of a p38-MAP kinase pathway (Aravindakshan and Cyr, 2005).

Given the role of Cxs in both spermatogenesis and other testicular functions we wanted to determine whether or not fish exposed to sewage effluent showed altered expression of testicular Cxs, and if there was a relationship between the expression and localization of testicular Cxs and the initiation of spermatogenesis in brook trout (*Salvelinus fontinalis*).

2. Materials and methods

2.1. Protocol experiment

One-year-old juvenile brook trout, in their first reproductive cycle, were purchased from a local fish farm (Quebec, Canada) in February 2005, and transported to the Montreal Wastewater Treatment Plant. Fish were maintained in 1700 L fibreglass tanks with flowing water at constant temperature (15°C) under natural photoperiod. Trout (n=300) were acclimated to these conditions for 2 weeks, prior to the experiment, and fed trout pellets (Corey, St-Clet, Canada) at a ration of 1% body weight per day.

To assess the effects of treated wastewater effluent on testicular function, a flow-through system was used in which dechlorinated Montreal City water flowed at a rate of 50 L/h. Male and female fish (n=30) were placed in 60 L fibreglass tanks, with two replicate tanks per treatment. Photoperiod and water temperature were the same as those used during the acclimation period.

Four different exposure concentrations of treated wastewater effluent ratios (v/v) were used: 0% (control group), 1, 10, and 20%. The effluent concentrations corresponded to levels observed at 10, 1, and 0.3 km, respectively, downstream from the discharge site in St. Lawrence River according to coliform count assays (data not shown). Fish were sampled after 4 and 12 weeks of exposure. At the time of sampling, fish were placed in a 10 L tank containing 3-aminobenzoic-ethyl-ester-acid (MS 222; 0.05 g/L) as an anaesthetic, with a constant aeration. Fish were killed by decapitation and sexed by dissection using a dissection microscope. Left testis was fixed in Bouin's solution for histology, while the right testis was frozen at -80°C. The sex of each fish was later confirmed by histological examination. All animal procedures were approved by the university Animal Care Committee.

2.2. Montreal wastewater effluent

The treatment of municipal effluents by the Montreal city wastewater treatment plant consists of mechanical screening, grit removal, physical-chemical primary treatment and removal of sludge and scum. Ferric chloride is used as a chemical precipitant during the treatment process which increases the levels of iron in the wastewater (Chambers et al., 1997). Characteristics of the effluent (conductivity, salinity, oxygen dissolved, pH, ammonium, chlorophyll) were sampled every 4 days during the experiment.

2.3. Expression of testicular Cxs and vegf

Testicular *cxs* and *vegf* mRNA levels were measured by semi-quantitative RT-PCR. Two pairs of degenerate oligonucleotide primers (F1R1 and F2R2; Table 1) were designed according to highly conserved regions of the amino-terminal cytoplasmic domain and the two extracellular loops of the mammalian Cx multigene family (Itahana, 1996). We have previously used this approach to identify Cxs in rainbow trout testes (de Montgolfier et al., 2007). Since the rainbow trout testes expressed *cx43*, *cx43.4*, *cx30*, and *cx31*, specific primer pairs were also designed for each Cx and vascular endothelial growth factor (*vegf*) (Table 1).

Total RNA was isolated from the right testis of brook trout using the Absolutely RNA Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA). The isolated RNA was treated with DNase (1 U/ μ g of RNA; Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Canada) to remove any contaminating genomic DNA. The resulting RNA was reverse transcribed using oligo d(T) 16-18 primers (Amersham Pharmacia Biotech, Baie D'Urfe, QC, Canada) and M-MLV reverse transcriptase (Canadian Life Technologies) according to the suppliers' instructions. The resulting cDNA templates (250 ng) were amplified using two different primer combinations F1R1 and F2R2

Table 1: Sequence of oligonucleotide primers used to amplify the different *cxs*, *vtg*, *vegf*, and *gapdh* used in this study.

Primer name	Primer Sequence (5' to 3')
CxF1	ATGGGTGACTGGAGYKYCYTRG
CxR1	ACCACCARCATRAAGAYRATGAAG
CxF2	GGCTGYRASAAYGTCTGCTAYG
CxR2	GCCKGGARAYRAARCAGTCCAC
VTG F	GATTGCACCACAGAGCTAAA
VTG R	AGCATCCAGGCAGACAACG
GAPDH F	GGGTGAGGTGAGCATGGAGGACG
GAPDH R	GCCCCGACAGGCCGGCAGGTTAG
VEGF F	CACATACCAAGGACGG
VEGF R	GTTGCGATACTCTCTGTTCA

(Table 1). Amplification for each set of primers, in addition to *vegf*, were done using multiple cycles to establish the linear amplification range of each transcript. Amplification by PCR was done using 30 cycles of denaturing at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 60 s, and elongation at 72°C for 90 s. *vegf* amplifications were done using 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55.3°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30 s.

gapdh mRNA levels were measured by RT-PCR using gene specific primers (Table 1) in each sample in order to standardize for loading. PCR amplification (linear) was done using 28 cycles of denaturing at 94°C for 30s, annealing at 55°C for 30s, and elongation at 72°C for 30s. PCR products were separated on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. *gadph* mRNA levels did not vary between experimental groups (data not shown) and was used to normalize expression data.

2.4. Hepatic Vitellogenin

In order to determine the presence of estrogenic compounds in the effluent, hepatic vitellogenin (*vtg*) mRNA levels were measured. Total cellular RNA was isolated from liver as described above. Hepatic *vtg* mRNA levels were determined by semi-quantitative RT-PCR. RNA was reverse transcribed using the anti-sense primer: 5'-AGC ATC CAG GCA GAC AAC G-3' and amplified using specific *vtg* primers (Table 1). PCR amplification was done using 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 54°C for 60 s, and elongating at 72°C for 60 s.

2.5. Immunolocalization of the different Cxs

Left testes were immerse-fixed in Bouin's solution for 24 hrs, and subsequently stored in 70% ethanol at room temperature. Tissues were then dehydrated with graded ethanols and embedded in paraffin. Tissue sections (5 μ m) were mounted on Snowcoat X-tra micro slides

(Tenenhouse et al., 2004; Xu et al., 2005). Sections were deparaffinized in HistoClear (Fisher Scientific, Ottawa, ON) and rehydrated through a series of graded ethanols. Immunocytochemistry was done using the DAKO Catalyzed Signal Amplification System (DAKO, Carpenteria, CA). The antibodies used in this study are the same as those described by de Montgolfier et al. (2007) for the localization of Cxs in rainbow trout testes. Tissue sections were incubated at 37°C with each of the anti-Cx antisera: anti-Cx43 (800 ng/ml for 60 min), anti-Cx43.4 (800 ng/ml for 90 min), anti-Cx30 (1 µl/ml for 90 min), and anti-Cx31 (1.33 µl/ml for 60 min). Antibody binding to each Cx was detected using either anti-rabbit or anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antiserum, according to the manufacturer's instructions. Tissue sections incubated with normal rabbit pre-immune serum was used as a negative control.

2.6. Statistical analyses

Statistical differences in mRNA levels were determined by one-way ANOVA, followed by the Holm-Sidak multiple comparisons method. When data failed the Kolmogorov-Smirnov normality test, a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks was performed instead, followed by a Dunn's test. Statistical analyses were performed on SigmaStat software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and considered significant when $p < 0.05$. Data are expressed as the mean \pm SEM.

3. Results

3.1. Effects on body weight and length

There were no significant differences in the body weight or fork length of fish between control and fish treated with municipal wastewater effluent (Table 2). Furthermore, we did not

Table 2: Sample size, somatic weight, length of male fish exposed to wastewater effluent for 4 and 12 weeks.

Treatment	n	Fish weight (g)	Fish lenght (cm)
4 weeks			
0% (control)	9	33.55 ± 14.45	13.73 ± 1.92
1%	11	31.07 ± 10.04	13.54 ± 1.44
10%	11	30.58 ± 10.91	13.14 ± 1.62
20%	13	39.53 ± 19.05	14.09 ± 2.39
12 weeks			
0% (control)	6	60.12 ± 23.73	16.73 ± 2.25
1%	8	49.10 ± 19.72	15.38 ± 2.46
10%	9	58.85 ± 27.04	16.17 ± 2.74
20%	10	57.93 ± 20.37	15.81 ± 2.15

There were no significant differences between groups.

observed any gross morphological alterations in the appearance of the fish, or in the fish mortality after 4 or 12 weeks of treatment, irrespective of the exposure concentrations.

3.2. Vitellogenin mRNA levels

Male trout exposed to different concentrations of municipal wastewater effluent did not show any significant differences in hepatic *vtg* mRNA levels after four weeks of exposure (Fig. 1A). However, after 12 weeks of exposure, there was a significant increase in hepatic *vtg* mRNA levels in trout exposed to 10 and 20% effluent. Trout exposed to 1% effluent had low *vtg* mRNA levels that were not statistically different from those of controls (Fig. 1B).

3.3. Spermatogenesis

Using the description of the stages of rainbow trout spermatogenesis by Bouma and Nagler (2001), histological analyses of testis indicated that at after 4 weeks of treatment there were no effects on the stages of spermatogenesis between treatment groups, with all fish in stage 1 of development. However, after 12 weeks of treatment, spermatogenesis in fish exposed to 1% effluent was stimulated as indicated by the presence of stage 2 testes (data not shown). Fish in other treatment groups were all at stage 1 of development.

3.4. Expression of Cx43, Cx43.4, Cx30, and Cx31

3.4.1. Four weeks of exposure

After 4 weeks of exposure, we observed significant variations in testicular *cx43* mRNA levels (Fig. 2A). The highest levels were observed in testes of trout exposed to 1% effluent, and a subsequent dose-dependant decrease in *cx43* mRNA levels was observed. Levels of *cx43.4* mRNA did not vary significantly between experimental groups (Fig. 2B), although levels

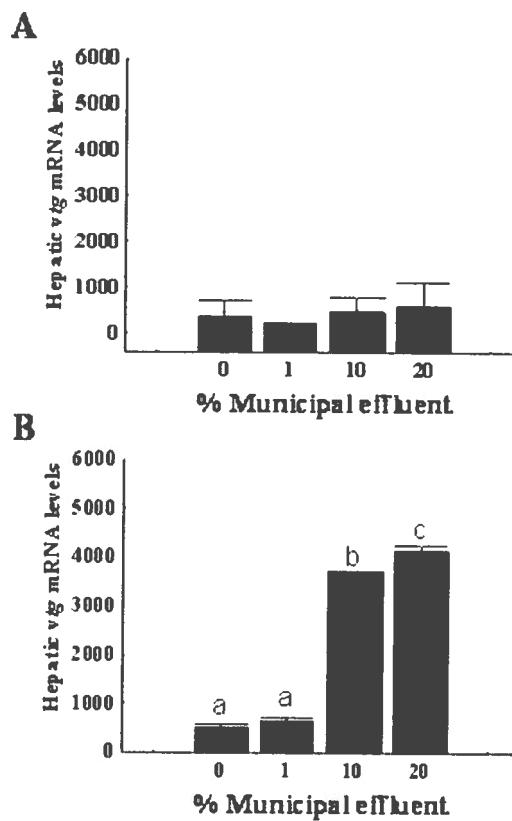


Figure 1: Hepatic vtg mRNA levels in male brook trout exposed to different concentrations of municipal effluent for 4 (A), and 12 weeks (B). vtg mRNA levels were measure by semi-quantitative RT-PCR. gadph mRNA levels were used to standardized VTG levels. Letter indicate a significant difference ($P < 0.05$ ANOVA).

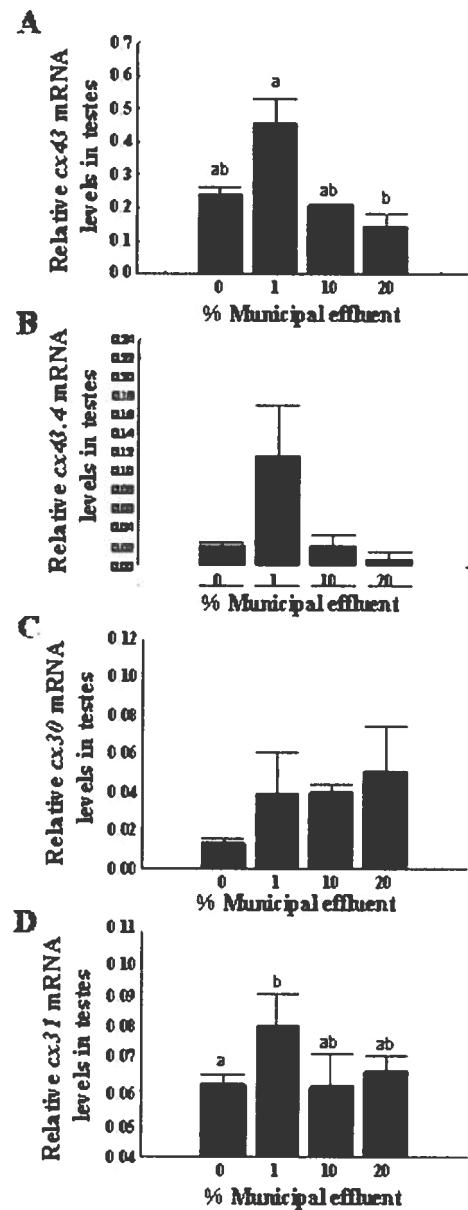


Figure 2: Expression of testicular *cx43* (A), *cx43.4* (B), *cx30* (C), and *cx31* (D) mRNA levels in brook trout exposed to different concentrations of municipal effluent for 4 weeks. *cx* mRNA levels were measured by semi-quantitative RT-PCR. *gadph* mRNA levels were used to standardize *cx* mRNA levels. Letters indicate a significant difference ($P < 0.05$ ANOVA).

appeared to follow a trend similar to *cx43* levels.

Testicular *cx30* mRNA levels were not significantly altered by exposure to any effluent concentration (Fig. 2C). However, we did observe a small increase in *cx30* expression in each of the treated groups relative to unexposed controls. The expression of *cx31* was significantly higher in brook trout testes exposed to 1% effluent as compared to controls (Fig. 2D).

3.4.2. Twelve weeks of exposure

Following 12 weeks of exposure to the different effluent concentrations, *cx43* and *cx43.4* mRNA levels varied significantly between groups. *cx43* mRNA levels were higher in testes of fish exposed to effluent (Fig. 3A).

cx43.4 mRNA levels were highest in the non-exposed controls and were significantly lower in trout exposed to any of the effluent concentrations. Interestingly, the most pronounced effects were observed in the 1 and 10% groups (Fig. 3B).

Levels of *cx30* in effluent-exposed fish were not significantly different from those of controls (Fig. 3C). However, *cx31* mRNA levels in the 1 and 10% groups were significantly lower than controls (Fig. 3D).

3.5. Immunolocalization of testicular Cxs

Cx43 was localized along the plasma membrane of Sertoli cell membranes after 4 weeks of exposure. In controls and all treatment groups, Cx43 was only detected between Sertoli cells (Fig. 4A and B). No immunostaining was observed in either Leydig cells or other cells of the interstitium. There were no differences in the immunolocalization of Cx43 in the testes of control and effluent-exposed fish (Fig. 4C and D).

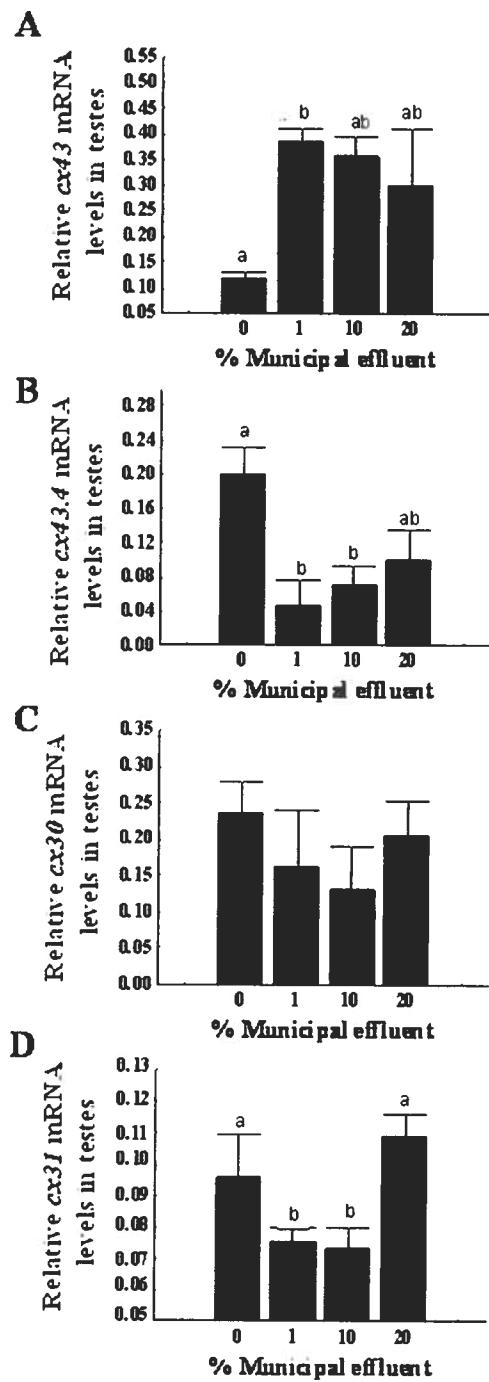


Figure 3: Expression of testicular *cx43* (A), *cx43.4* (B), *cx30* (C), and *cx31* (D) mRNA levels in brook trout exposed to different concentrations of municipal effluent for 12 weeks. *cx* mRNA levels were measured by semi-quantitative RT-PCR. *gadph* mRNA levels were used to standardize *cx* mRNA levels. Letters indicate a significant difference ($P < 0.05$ ANOVA).

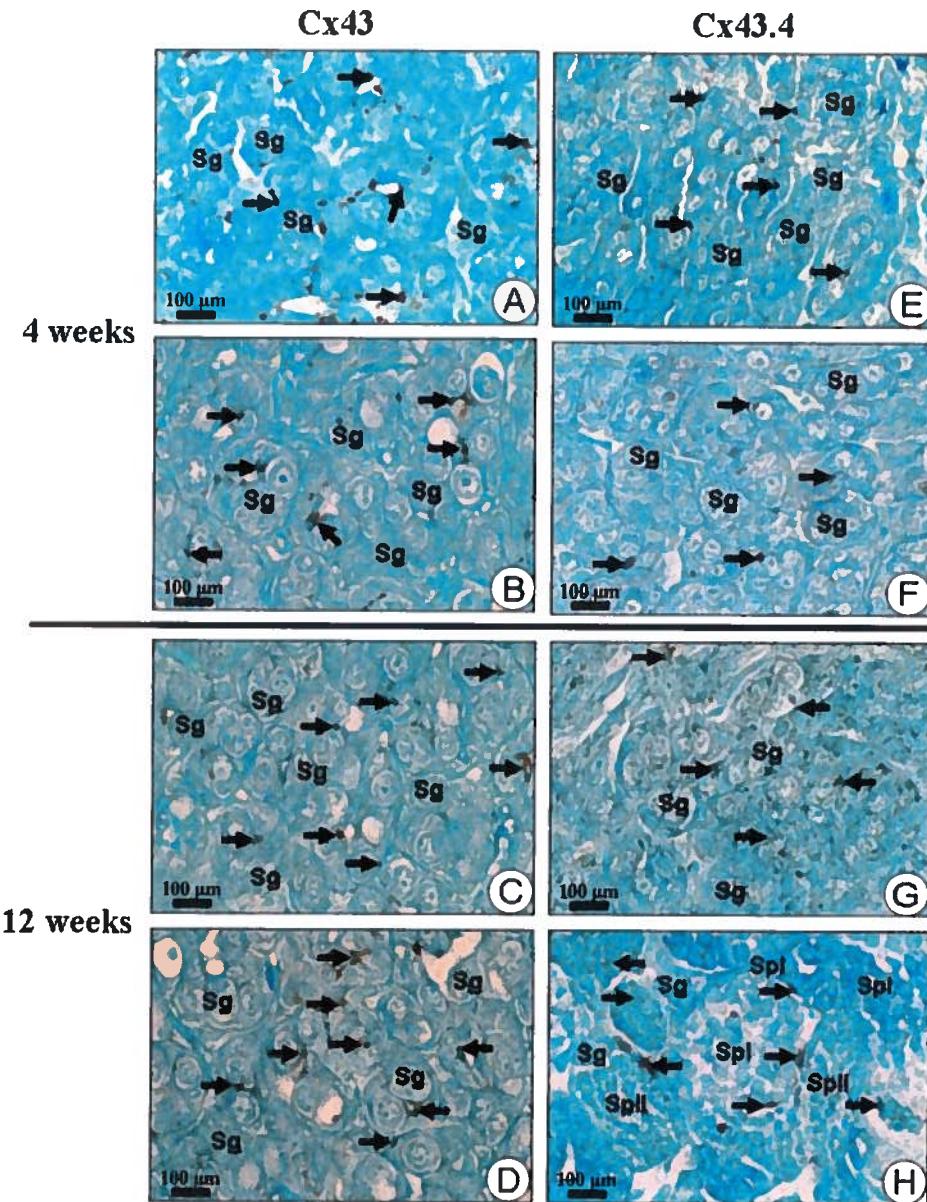


Figure 4: Immunolocalization of Cx43 and Cx43.4 in brook trout testes. After 4 weeks of exposure, Cx43 was localized between plasma membranes Sertoli cells for every treatments (A= control group; x1000; B= 20% effluent group, x1000). After 12 weeks of exposure, Cx43 was localized between plasma membranes Sertoli cells for every treatments (A= control group; x1000; B= 20% effluent group, x1000). Cx43.4 is localized between spermatogonia, after 4 weeks of exposure (C= control group, x1000; D= 20% effluent group, x1000). Cx43.4 is observed between spermatogonia in controls, 10%, and 20% effluent groups (G= control group, x1000), and between spermatogonia, and type I and II spermatocytes (H= 1% effluent group, x1000). Arrows indicate specific immunostaining; Sg= Spermatogonia; Spi= Preleptotene Spermatocytes (type I); SpII= Pachytene Spermatocyte (type II).

After 4 weeks of exposure, Cx43.4 was localized between spermatogonia and there were no differences in immunostaining between controls and exposed-groups (Fig 4E and F). After 12 weeks of exposure, the Cx43.4 immunoreaction in controls was more intense than after 4 weeks of exposure, but remained localized between spermatogonia in controls, 10% and 20% groups, there were no spermatocytes in those treatment groups (Fig. 4G). In fish exposed to 1% effluent, we observed Cx43.4 between spermatogonia, and type I and type II spermatocytes (Fig. 4H).

Cx30 was localized exclusively between Leydig cells and there were no differences in immunostaining between groups (Fig. 5A-D) after 4 and 12 weeks of exposure.

After 4 weeks of exposure, we observed weaker Cx31 immunostaining, which was localized in the endothelium of interstitial blood vessels of the testes in controls (Fig. 5E), 10%, and 20% groups; whereas we noted a strong immunoreaction in fish exposed to 1% municipal effluent. At higher doses, the immunoreaction was similar to controls (Fig. 5F). After 12 weeks of exposure, Cx31 was specifically localized in the endothelium of interstitial blood vessels, and there were no differences between fish from the different treatment groups (Fig. 5G and H).

3.6. Testicular vegf mRNA levels

After 4 weeks of exposure, testicular *vegf* mRNA levels were significantly higher in trout exposed to 1% municipal effluent as compared to controls (Fig. 6A). Testicular *vegf* mRNA levels fish exposed to 10 and 20% municipal effluent were similar to controls. Following 12 weeks of exposure to different effluent concentrations, *vegf* mRNA levels were not significantly altered by exposure to any effluent concentration (Fig. 6B). These data suggest that the development of the testicular vasculature did not appear to be altered by the treatment.

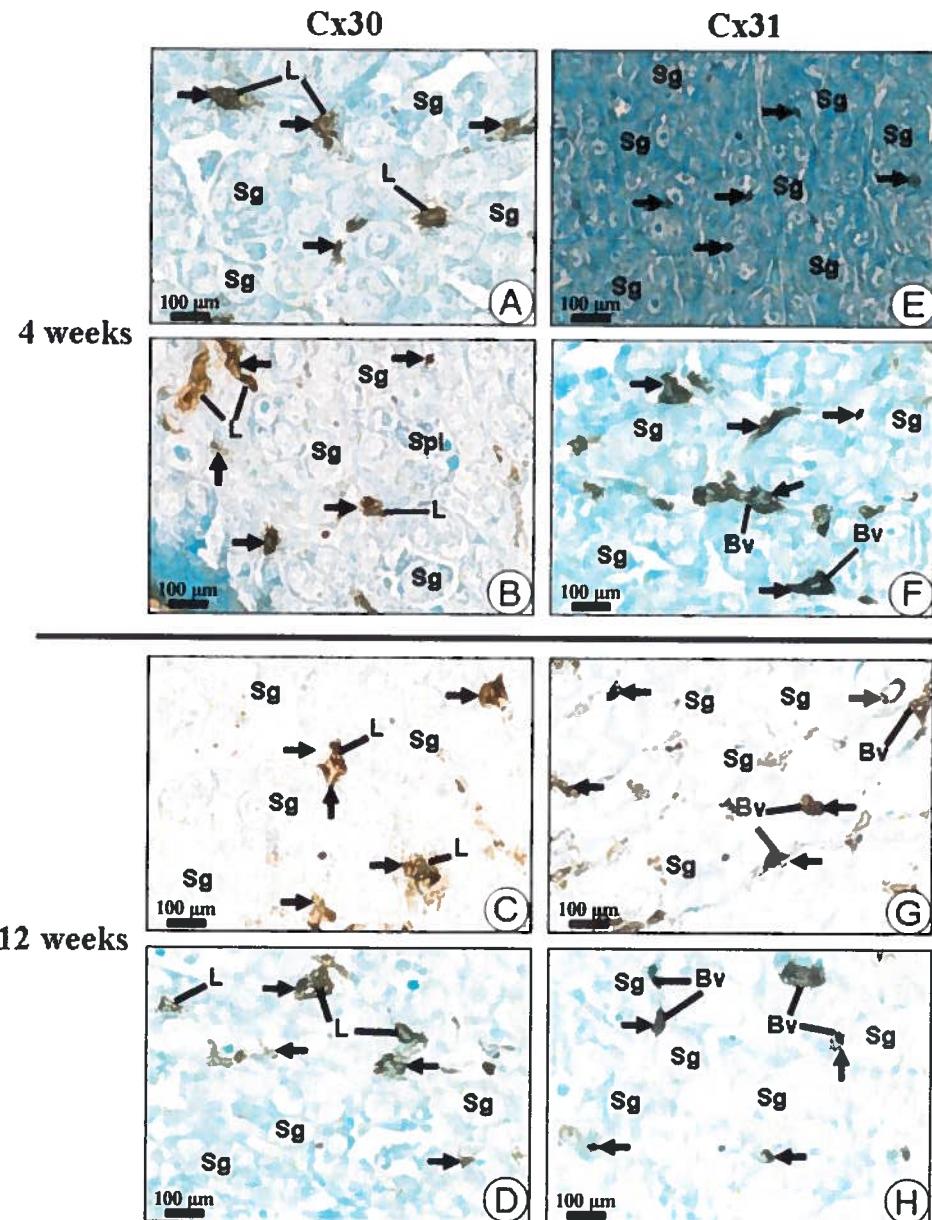


Figure 5: Immunolocalization of Cx30 and Cx31 in brook trout testes. Cx30 was localized between Leydig cells for each treatment, after 4 weeks of exposure (A= control group, $\times 1000$, B= 20% effluent group, $\times 1000$) and 12 weeks (C= control group, $\times 1000$; D= 20% effluent group, $\times 1000$). After 4 weeks, Cx31 was expressed in the endothelium of blood vessels (E= control group; $\times 1000$; F= 1% effluent group, $\times 1000$). After 12 weeks of exposure, Cx31 was localized in the endothelium of blood vessels, for every fish treatments (G= control group, $\times 1000$; H= 20% effluent group, $\times 1000$). Sg= Spermatogonia; Spl= Preleptotene Spermatocytes; Bv= blood vessel; L= Leydig cell.

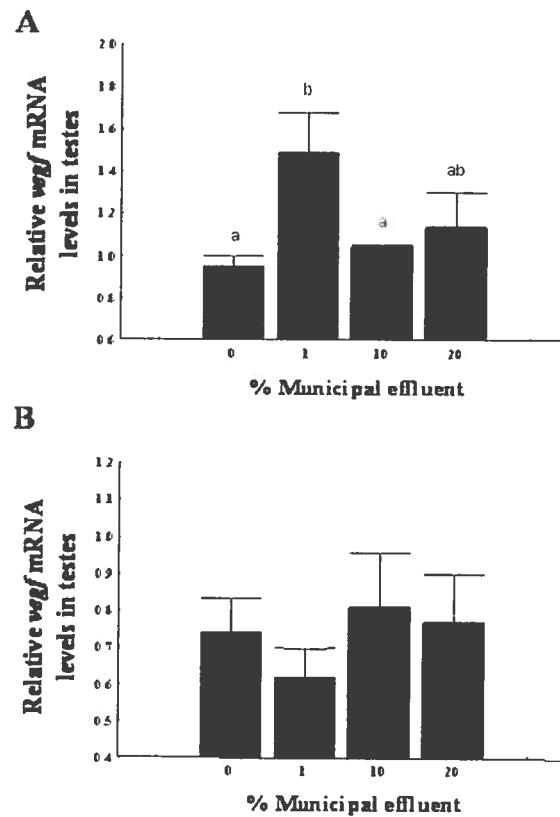


Figure 6: Expression of vegf mRNA in brook trout testis exposed to municipal effluent for four (A) and twelve weeks (B). vegf mRNA was significantly increase in the 1% group after 4 weeks of exposure compared to other groups. No significant variations were observed in all groups after 12 weeks of treatment. Letter indicate a significant difference ($P < 0.05$ ANOVA).

4. Discussion

The role of steroid hormones in the regulation of vertebrate spermatogenesis is well established (Nagahama, 1994, Nagahama et al., 1994; Amer et al., 2001; Schulz et al., 2001). While elevated levels of androgens (testosterone and ketotestosterone) are necessary for spermatogenesis (Miura et al., 1991, 2002; Cavaco et al., 1998), other hormones such as estradiol also appear to be implicated in various processes related to spermatogenesis, although the exact nature of these remain to be completely elucidated. Both oestrogen and androgen receptors have been identified in developing fish testes (Fitzpatrick et al., 1994), thus supporting the notion for a physiological role of both hormones in fish spermatogenesis and testicular function. Studies have shown that exposure to chemical mixtures containing estrogenic compounds can alter spermatogenesis in fish (Gregory et al., in press). Studies from both our laboratory (Aravindakshan et al., 2004b) and others (Jobling et al., 2002) have shown that under field conditions, exposure to municipal effluents containing estrogenic compounds can alter spermatogenesis.

Our previous studies have shown that spottail shiners from the St. Lawrence River exposed under field conditions to municipal sewage effluent from the City of Montreal have elevated levels of hepatic *vtg* mRNA (Aravindakshan et al., 2004a; Aravindakshan et al., 2004b), indicating that these effluents contain estrogenic compounds. In the present study, we observed that immature brook trout exposed for four weeks to varying concentrations of Montreal treated wastewater effluent did not exhibit induced levels of hepatic *vtg*. However in fish exposed for 12 weeks to 10% or 20% effluent, we noted a significant increase in hepatic *vtg* mRNA. Since the induction of VTG synthesis by estradiol in salmonids is relatively rapid, our data suggest that the chemicals responsible for inducing hepatic *vtg* are likely present at low concentrations and must

accumulate in the fish for some time in order to reach concentrations necessary to induce VTG in immature fish. Likewise the sensitivity of the fish to estrogenic compounds may have increased. Studies have reported that there are threshold concentrations of estrogens for the induction of VTG and that these vary between species (Hiramatsu et al., 2006). At the moment we have no information as to whether or not brook trout are more or less sensitive to estrogens than spottail shiners, the species we used previously for environmental monitoring of estrogenic compounds in the St. Lawrence River. Another possibility may be related to changes in effluent composition during the exposure period. Given the complexity of this effluent, it is not possible to discount this possibility.

Examination of the stages of spermatogenesis in brook trout showed that following 4 weeks of exposure, there were no differences in testicular maturation between experimental groups. However, after 12 weeks of exposure, we noted an important stimulation in testicular maturation in fish exposed to the lowest concentration of municipal effluent. Fish exposed to 1% municipal effluent showed typical structures of an advanced stage 2 of maturation, as their testes contained few spermatogonia, type I and type II spermatocytes, as well as some spermatids (Bouma and Nagler, 2001). It is interesting to note that while spermatogenesis was stimulated at this dose, there was no increase in hepatic *vtg* mRNA, suggesting that the effluent contains factors other than estrogens which can stimulate spermatogenesis. However, the fact that these effects are only noted at the lowest exposure concentration, suggests that other factors may modulate testicular development at higher doses. It is also possible that the testis may be more sensitive to estrogenic effects than the liver where *vtg* is induced. The role of low doses of estrogenic compounds in mammalian reproduction has been previously reported. Studies by Timms et al. (2005) reported that neonatal exposure to low doses of bisphenol A stimulated prostatic development, while elevated doses of diethylstilbestrol, a potent oestrogen, inhibited

prostatic development. Likewise, studies have reported that certain endocrine disrupting chemicals, particularly at low doses, may stimulate male reproductive functions by hormesis (Calabrese and Blain, 2005; Weltje et al., 2005). Whether or not this is the case, in the present study, is not known. While previous studies from our lab have demonstrated that late stages of spermatogenesis were altered by exposure to estrogenic substances in the St. Lawrence River (Aravindakshan et al., 2004b), the current studies have focused on the initiation and early stages of spermatogenesis. The effects observed with 1% effluent exposure for 12 weeks are difficult to compare with our field studies on spottail shiners. However, the fact that spermatogenesis can be altered supports the notion that Montreal municipal effluents can alter spermatogenesis in fish.

In the mammalian testis, gap junctions are essential for normal development and spermatogenesis (Juneja et al., 1999; Risley, 2000; Roscoe et al., 2001; Risley et al., 2002). De Sousa et al. (1993) reported the expression of at least 12 different Cxs in the mammalian testis, which mediate complex intercellular communication implicated in testicular functions. In fish, de Montgolfier et al. (2007) have reported the presence of 4 Cxs in the rainbow trout testis (Cx43, Cx43.4, Cx30, and Cx31). Each of the four Cxs appeared to be associated with a different testicular cell type, and was differentially expressed during spermatogenesis. Several studies have shown that the expression of Cxs represents a sensitive endpoint in response to cellular stress induced by environmental contaminants in the testis (Fiorini et al., 2004) as well as in other tissues (Trosko et al., 1998; Krutovskikh et al., 2002; Plante et al., 2002). Given the sensitivity of Cxs to environmental toxicants, and because these proteins are essential for spermatogenesis, we wanted to evaluate whether or not these represent a target for contaminants in municipal sewage effluent.

Exposure of brook trout for 4 weeks to municipal effluent altered that the expression levels of certain *cx* mRNA levels in the testis. Interestingly, the levels of *cx43* and *cx31* mRNA

were significantly elevated in the 1% exposure group. The increase in the expression of these Cxs appears to precede changes in spermatogenesis and may reflect cellular changes associated with the onset of testicular maturation and spermatogenesis.

Significant changes in *cx43.4* mRNA levels in trout testes were observed between 4 and 12 weeks of exposure. We noted that the 1% group seemed to express more *cx43.4* mRNA than all groups after 4 weeks but it expressed the lowest level after 12 weeks; while we observed the opposite in the other groups. Cx43.4 is expressed in spermatogonia and in type I and II spermatocytes in rainbow trout (de Montgolfier et al., 2007), and is present only during the first two stages of the spermatogenesis. Testes of fish from the 1% group presented an advanced stage 2 after 12 weeks of exposure. The decrease in *cx43.4* expression between 4 and 12 weeks may be linked to the advancement of spermatogenesis in the 1% group.

In male fish exposed to effluent for 12 weeks, the expression of testicular Cxs showed a different pattern of mRNA levels. In these fish, *cx43* mRNA levels were increased at all exposure doses, irrespective of the induction of hepatic *vtg* mRNA that was observed only in fish at the two highest exposure concentrations. *cx43.4* mRNA, which is expressed in spermatogonia was decreased at all doses while levels of *cx30* mRNA were not significantly decreased, although they also appeared to show a general tendency to be expressed at somewhat lower levels than controls. Higher expression levels of *cx31* mRNA were observed in the 1% group, and a significant decrease in the 20% group. With the exception of fish exposed to the 1% concentration, there were no changes in the stages of spermatogenesis in fish exposed to the effluent for 12 weeks, suggesting that the effects on testicular *cx* mRNA levels are not related to changes in testicular maturation. Deregulation of testicular Cxs has been reported in mammals to be associated with disease and infertility. Overexpression of Cx43 has been shown to be associated with increased cellular proliferation of Sertoli cells in human seminoma cells (Roger et al., 2004). In many

studies, increased testicular expression of Cx43 is associated with altered localization of Cx43 (Defamie et al., 2001; Fiorini et al., 2004). In the present study, this does not appear to be the case, as the localization of Cx43 in the testis of effluent exposed fish is similar to controls. Unlike Cx43, which is expressed in Sertoli and Leydig cells, Cx43.4 is expressed in developing spermatogonia. In a previous study we suggested that the role of Cx43.4 in the salmonid testis may be similar to that of CX31 (also known as GJB3) in mammals. In *Cx31* knockout mice, testicular development was unaltered and the authors suggested that other Cxs may compensate for *Cx31* in the testis and other tissues which express *Cx31* but which were unaffected by the gene deletion. Interestingly, in the placenta of *Cx31* null mice, there was an increase in the expression of *Cx43* mRNA, suggesting that this Cx may compensate for the lack of Cx31 (Plum et al., 2001).

Immunohistochemistry revealed that exposure to municipal effluent did not affect the specific localization of the four connexins (Cx43, Cx43.4, Cx30, and Cx31) in brook trout testes. Localization was the same as that observed in rainbow trout testes by de Montgolfier et al. (2007). Interestingly, we observed an important increase in Cx31 immunostaining after 4 weeks of exposure in the 1% group in comparison to the other treatment groups and controls. This more intense Cx31 staining corroborated the increased *cx31* mRNA levels measured in the testes of fish from the same group. Cx31 is specifically localized in the endothelium of blood vessels. In mammals, four Cxs have already been identified in the vascular wall (Cx37, Cx40, Cx43, and Cx45) (Hill et al., 2001; Rummery and Hill, 2004), and each Cx is specifically distributed. In fact, Cx37 and Cx40 are commonly found in the endothelium of blood vessels like Cx31 in rainbow trout and brook trout, whereas Cx43 and Cx45 are mostly observed in smooth muscle cells (Simon and McWhorter, 2002). Studies have observed periodic variations in diameter of blood vessel which regulate the blood flow in the testis (Collin et al., 2000). Vasomotion could

play an important role in the regulation of the fluid transfer in the vascularization of the organ (Collin et al., 2000). A reduction in blood flow may be an important cause of male infertility (Bergh et al., 2001). We suggest that Cx31 staining may be a good indicator of the extent of developing testicular vascularization. Whether or not alterations in the immunostaining of Cx31 is due to changes in vascularisation or specific effects on Cx31 remains to be determined.

To assess if changes in the expression of *cx31* was related to alteration in testicular vasculature, we measured *vegf* mRNA levels. VEGF promotes angiogenesis and its expression is restricted to endothelial cells (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Sumpio et al., 2002). While there was an increase in testicular *vegf* mRNA levels at 4 weeks in the 1% group, there were no differences in *vegf* mRNA levels after 12 weeks of exposure. Thus the effects observed on testicular Cx31 immunoreaction in the trout exposed to 20% municipal effluent is not likely the result of changes in developing testicular vasculature and most likely represents a direct alteration of Cx31 levels between endothelial cells. This could suggest that the effluents may alter cellular components of the testicular vasculature.

Results from the present study indicate that exposure to municipal effluent for 4 and 12 weeks can alter the expression of testicular Cxs. Since intercellular communication has been shown to represent a critical component of spermatogenesis, alterations in the expression of these Cxs prior to alterations in spermatogenesis may represent one mechanism responsible for the delayed spermatogenesis and altered sperm motility that has been reported in spottail shiners exposed to municipal effluent under field conditions. These results are the first to show that intercellular communication in the fish testis may represent a target for contaminants in the complex composition of municipal effluents. The fact that many effects occur at doses where hepatic *vit*g is not induced suggests that either the effects of endocrine disrupting chemicals on the

testis occur at doses much lower than those needed to induce *vfg* production, or that the effects occur independently of estrogenic chemicals.

Acknowledgements

Dr. H. Salo and A. Nicol are thanked for their assistance. M. Gregory is also thanked for her suggestions. B.d.M. was the recipient of a studentship from the Armand-Frappier Foundation. This study was supported by the AQUANET Network of Excellence, the SORDAC, the VRQ-Network for Quebec Aquaculture (RAQ) and the St. Lawrence Action Plan.

References

- Altevogt, B.M., Kleopa, K.A., Postma, F.R., Scherer, S.S., Paul, D.L., 2002. Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* 22, 6458-6470.
- Amer, M.A., Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol Reprod.* 65, 1057-1066.
- Aravindakshan, J., Cyr, D.G., 2005. Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mitogen-activated protein kinase pathway. *Biol. Reprod.* 72, 1232-1240.

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

Aravindakshan, J., Paquet, V., Gregory, M., Dufresne, J., Fournier, M., Marcogliese, D.J., Cyr, D.G., 2004b. Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicol. Sci.* 78, 156-165.

Batias, C., Defamie, N., Lablack, A., Thepot, D., Fenichel, P., Segretain, D., Pointis, G., 1999. Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res.* 298, 113-121.

Batias, C., Siffroi, J.P., Fenichel, P., Pointis, G., Segretain, D., 2000. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 793-805.

Batlouni, S.R., Carreno, F.R., Romagosa, E., Borella, M.I., 2005. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatum* (Pisces, Siluriformes). *J. Mol. Histol.* 36, 97-110.

Bergh, A., Collin, O., Lissbrant, E., 2001. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biol. Reprod.* 64, 13-20.

Bouma, J., Nagler, J.J., 2001. Estrogen receptor-alpha protein localization in the testis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during different stages of the reproductive cycle. Biol. Reprod. 65, 60-65.

Calabrese, E.J., Blain, R., 2005. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. Toxicol. Appl. Pharmacol. 202, 289-301.

Cavaco, J.E., Vilrokx, C., Trudeau, V.L., Schulz, R.W., Goos, H.J., 1998. Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). Am. J. Physiol. 275, 1793-1802.

Chambers, P.A., Allard, M., Walker, S.L., Marsalek, J., Lawrence, J., Servos, M., Busnarda, J., Munger, K.S., Adare, K., Jefferson, C., Kent, R.A., Wong, M.P., 1997. Impacts of municipal wastewater effluents on canadian waters: a review. Water Qual. Res. J. Can. 32, 659-713.

Chung, N.P., Mruk, D., Mo, M.Y., Lee, W.M., Cheng, C.Y., 2001. A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo. Biol. Reprod. 65, 1340-1351.

Collin, O., Zupp, J.L., Setchell, B.P., 2000. Testicular vasomotion in different mammals. Asian J. Androl. 2, 297-300.

de Montgolfier, B., Dufresne, J., Letourneau, M., Nagler, J., Fournier, A., Audet, C., Cyr, D.G., 2007. The expression of multiple connexins throughout spermatogenesis in the rainbow trout testis suggests a role for complex intercellular communication. *Biol. Reprod.* 76, 2-8.

De Sousa, P.A., Valdimarsson, G., Nicholson, B.J., Kidder, G.M., 1993. Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development*. 117, 1355-1367.

Defamie, N., Berthaut, I., Mograbi, B., Chevallier, D., Dadoune, J.P., Fenichel, P., Segretain, D., Pointis, G., 2003. Impaired gap junction connexin43 in Sertoli cells of patients with secretory azoospermia: a marker of undifferentiated Sertoli cells. *Lab. Invest.* 83, 449-456.

Defamie, N., Mograbi, B., Roger, C., Cronier, L., Malassine, A., Brucker-Davis, F., Fenichel, P., Segretain, D., Pointis, G., 2001. Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells. *Carcinogenesis*. 22, 1537-1542.

Ferrara, N., Davis-Smyth, T., 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4-25.

Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., Chevalier, S., Charuel, C., Pointis, G., 2004. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.* 18, 413-421.

Fitzpatrick, M.S., Gale, W.L., Schreck, C.B., 1994. Binding characteristics of an androgen receptor in the ovaries of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Gen. Comp. Endocrinol. 95, 399-408.

Gregory, M., Aravindakshan, J., Nadzialek, S., Cyr, D.G. Effects of endocrine disrupting chemicals on male reproduction. In Fish spermatology, S.M.H. Alavi, R. Raffiee, J. Cosson, and K. Coward, Eds. Alpha Science Intl. Ltd., in press.

Hill, C.E., Phillips, J.K., Sandow, S.L., 2001. Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. Med. Res. Rev. 21, 1-60.

Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C.V., Hara, A., 2006. Multiple piscine vitellogenins: Biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. Marine Biology. 149, 35-47.

Itahana, K., Morikazu Y, Takeya T., 1996. Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-30.3, Cx-32, and Cx-43, in the porcine ovarian follicle. Endocrinology. 137, 5036-5044.

Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpster, J.P., Tyler, C.R., 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. Biol. Reprod. 66, 272-281.

Juneja, S.C., Barr, K.J., Enders, G.C., Kidder, G.M., 1999. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. Biol. Reprod. 60. 1263-1270.

Krutovskikh, V.A., Piccoli, C., Yamasaki, H., 2002. Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. *Oncogene*. 21, 1989-1999.

Lagree, V., Brunschwig, K., Lopez, P., Gilula, N.B., Richard, G., Falk, M.M., 2003. Specific amino-acid residues in the N-terminus and TM3 implicated in channel function and oligomerization compatibility of connexin43. *J. Cell. Sci.* 116, 3189-3201.

Marina, P., Annamaria, L., Barbara, D., Loredana, R., Piero, A., Francesco, A., 2002. Fine structure of leydig and sertoli cells in the testis of immature and mature spotted ray *Torpedo marmorata*. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 192-201.

Miura, T., Ando, N., Miura, C., Yamauchi, K., 2002. Comparative studies between in vivo and in vitro spermatogenesis of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Zoolog. Sci.* 19, 321-329.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 88, 5774-5778.

Musil, L.S., Goodenough, D.A., 1991. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J. Cell. Biol.* 115, 1357-1374.

Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 217-229.

Nagahama, Y., Miura, T., Kobayashi, T., 1994. The onset of spermatogenesis in fish. *Ciba Found Symp.* 182, 255-267.

Pelletier, R.M., 1995. The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *J. Androl.* 16, 400-409.

Perez-Armendariz, E., Lamoyi E., Mason, J.I., Cisneros-Armas, D., Luu-The, V., Bravo Moreno, J.F., 2001. Developmental regulation of connexin 43 expression in fetal mouse testicular cells. *Anat. Rec.* 264, 237-246.

Plante, I., Charbonneau, M., Cyr, D.G., 2002. Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. *Carcinogenesis.* 23, 1243-1249.

Plum, A., Winterhager, E., Pesch, J., Lautermann, J., Hallas, G., Rosentreter, B., Traub, O., Herberhold, C., Willecke, K., 2001. Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Dev. Biol.* 231, 334-347.

Pointis, G., Segretain, D., 2005. Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 300-306.

Risley, M.S., 2000. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol. Reprod.* 62, 748-754.

Risley, M.S., Tan, I.P., Farrell, J., 2002. Gap junctions with varied permeability properties establish cell-type specific communication pathways in the rat seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 67, 945-952.

Roger, C., Mograbi, B., Chevallier, D., Michiels, J.F., Tanaka, H., Segretain, D., Pointis, G., Fenichel, P., 2004. Disrupted traffic of connexin 43 in human testicular seminoma cells: overexpression of Cx43 induces membrane location and cell proliferation decrease. *J. Pathol.* 202, 241-246.

Roscoe, W.A., Barr, K.J., Mhawi, A.A., Pomerantz, D.K., Kidder, G.M., 2001. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol. Reprod.* 65, 829-838.

Rummery, N.M., Hill, C.E., 2004. Vascular gap junctions and implications for hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31, 659-667.

Saez, J.C., Connor, J.A., Spray, D.C., Bennett, M.V., 1989. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86, 2708-2712..

Schulz, R.W., Vischer, H.F., Cavaco, J.E., Santos, E.M., Tyler, C.R., Goos, H.J., Bogerd, J., 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 407-417.

Simon, A.M., McWhorter, A.R., 2002. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Dev. Biol.* 251, 206-220.

Söhl, G., Willecke, K., 2004 . Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* 62, 228-232.

Sumpio, B.E., Riley, J.T., Dardik, A., 2002. Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34, 1508-1512.

Tan, I.P., Roy, C., Saez, J.C., Saez, C.G., Paul, D.L., Risley, M.S., 1996. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biol. Reprod.* 54, 1300-1310.

Tenenhouse, H.S., Gauthier, C., Chau, H., St-Arnaud, R., 2004. 1 α -Hydroxylase gene ablation and Pi supplementation inhibit renal calcification in mice homozygous for the disrupted Npt2a gene. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 286, 675-681.

Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A., vom Saal, F.S., 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 7014-7019.

Trosko, J.E., Chang, C.C., Upham, B., 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.

Vaney, D.I., Nelson, J.C., Pow, D.V., 1998. Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina. *J. Neurosci.* 18, 10594-10602.

Weltje, L., vom Saal, F.S., Oehlmann, J., 2005. Reproductive stimulation by low doses of xenoestrogens contrasts with the view of hormesis as an adaptive response. *Hum. Exp. Toxicol.* 24, 431-437.

Xu, M., Choudhary, S., Goltzman, D., Ledgard, F., Adams, D., Gronowicz, G., Koczon-Jaremko, B., Raisz, L., Pilbeam, C., 2005. Do cyclooxygenase-2 knockout mice have primary hyperparathyroidism? *Endocrinology.* 146, 1843-1853.

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 3 : SEANONAL VARIATIONS ON TESTICULAR CONNEXIN LEVELS AND THEIR REGULATION IN THE BROOK TROUT, *Salvelinus fontinalis*.

Benjamin de Montgolfier, Aliou Faye, Céline Audet, et Daniel G. Cyr

Publié dans General and Comparative Endocrinology 2009 ; 162 : 276-285.

3.1 Résumé français de l'article

La maturation des gonades mâles est un phénomène complexe impliquant des mécanismes de communication intercellulaire. Les jonctions lacunaires ont été identifiées comme étant des structures permettant le passage bidirectionnel entre deux cellules adjacentes de molécules de poids inférieur à 1 KDa. On les considère donc comme jouant un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Les jonctions lacunaires sont composées de deux connexons ; le connexon est une structure cylindrique formée par six protéines membranaires appelées connexines (Cxs). Les Cxs sont assemblées afin de constituer un pore central. Chez les vertébrés, on observe la présence de différentes Cxs qui sont spécifiques pour un tissu donné et leur expression peut varier au cours du développement de l'individu. Afin de mieux comprendre les processus impliqués dans la spermatogenèse de l'omble de fontaine, *Salvelinus fontinalis*, un salmonidé, nous avons échantillonné mensuellement les gonades de dix mâles de mai à novembre. Nous avons effectué des immunobuvardages de type Western, des RT-

PCR, ainsi que des analyses histologiques afin de suivre les variations des Cxs, des récepteurs aux androgènes (RA), des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (RHT), et du récepteur à la gonadotropine I (rGtH I). Les résultats indiquent que chaque Cx possède son propre patron d'expression ; certaines sont présentes durant toute la période de maturation (Cx30 et Cx43), alors que Cx31 et Cx43.4 ne sont présentes qu'uniquement à certains stades. Les concentrations plasmatiques de testostérone (T) et de 11-cétotestostérone (11-CT) ont montré les variations caractéristiques, que l'on retrouve chez les salmonidés, avec une forte augmentation avant la période de reproduction, suivie d'une baisse de la 11-CT avant la T. Les résultats obtenus lors de la culture *in vitro* ont permis d'identifier la régulation directe de Cx43 par T₃ et l'AMPc. Cette étude présente pour la première fois les variations de quatre Cxs durant toute la période de maturation, et démontre la régulation de Cx43 par T₃ et l'AMPc. Cette Cx pourrait jouer un rôle majeur dans la prolifération et la différenciation des cellules de Sertoli. Cx43, Cx43.4, et Cx31 pourraient être utilisées comme des marqueurs de maturation.

3.2 Contribution de l'étudiant

Le suivi quotidien des poissons, l'entretien des bassins d'élevage, ainsi que les suivis de concentrations plasmatiques de T et 11-CT ont été réalisés par Aliou Faye. L'ensemble des autres expériences présentées dans cette étude a été réalisé par l'étudiant, tout comme la rédaction de la première version du manuscrit de l'article. De plus, l'étudiant a participé à la version finale du manuscrit en apportant les corrections nécessaires et en participant au choix du journal.

**Seasonal variations in testicular connexin levels and their regulation in the brook trout,
*Salvelinus fontinalis***

Benjamin de Montgolfier¹, Aliou Faye², Céline Audet², and Daniel G. Cyr¹

¹ INRS-Institut Armand Frappier, Université du Québec, 561 boul. des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7. ² ISMER, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, QC, G5L 3A1.

Running Title: Regulation of Testicular Connexins in the Brook Trout.

Keywords: Gap junctions, Spermatogenesis, Thyroid hormones, Androgens, cAMP, Fish.

This study was supported by NSERC, the AQUANET Network of Excellence, the SORDAC, and the VRQ-Réseau Aquaculture Québec (RAQ).

Disclosure statement: The authors of this manuscript have nothing to declare

Address for Correspondence:

Dr. Daniel Cyr
INRS-Institut Armand-Frappier
Université du Québec
531 boul. des Prairies
Laval, QC, H7V 1B7
Tel. (450) 686-5010 ext. 8833
Fax. (450) 686-5309
E-mail: daniel.cyr@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

Spermatogenesis requires coordinated intercellular communication mediated by gap junctions. Gap junctions are composed of connexons that are themselves composed of connexins (Cxs). The present objective was to determine the regulation of testicular Cxs in a seasonal breeder, the brook trout. To assess seasonal variations in testicular Cxs, trout were sampled monthly throughout spermatogenesis (June-November). Circulating levels of testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT) as well as mRNA levels for testicular androgen receptors (*ar-alpha*, *ar-beta*), thyroid hormone receptors (*tr-alpha*, *tr-beta*) and gonadotropin I receptor (*rgthI*) were measured. Plasma T levels peaked in October, one month prior to spawning, while 11-KT levels peaked at spawning. *ar-alpha* and *ar-beta* mRNA levels increased during spermatogenesis and peaked in November while *tr-alpha*, *tr-beta* mRNA levels stayed constant throughout spermatogenesis and increased dramatically in November. *rgthI* mRNA levels decreased progressively during spermatogenesis. Cx43 and Cx30 levels were constant during spermatogenesis and decreased in November. Cx31 levels were also constant during spermatogenesis but decreased dramatically in October and November. Cx43.4 levels peaked in July then decreased in September and levels were undetectable thereafter. Using in vitro cultures of testicular fragments we demonstrated that *cx43* mRNA levels were regulated in a dose-response manner by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (0-370nM) and cAMP (0-100 ng/ml) but levels were not regulated by 11-KT. These results indicate that testicular Cxs vary as a function of spermatogenesis and that the expression of *cx43* in the trout testis is regulated by both cAMP and TH.

1. Introduction

Spermatogenesis requires highly regulated intercellular communication in order to coordinate germ cell maturation. Intercellular communication between neighboring cells is mediated by gap junctions (Goodenough et al., 1996). Gap junctions are comprised of connexons which align themselves with a connexon from an adjacent cell to form an intercellular pore. Connexons are formed by six integral transmembrane proteins termed connexins (Cx_s) (Goodenough et al., 1996; Kumar and Gilula, 1996). Gap junctions permit direct passage of small molecules (< 1kDa), including secondary messengers, such as cAMP, and small amino acids, between adjacent cells (Cyr et al., 2003; Saez et al., 1989; Vaney et al., 1998). Approximately twenty different Cx_s have been identified and sequenced in humans (Lagree et al., 2003), and 37 different Cx_s have been identified in zebrafish genome (Eastman et al., 2006). In mammals, testicular gap junctions were identified by electron microscopy to be localized between adjacent Sertoli cells (Lagree et al., 2003). Risley et al. (1992) first reported the presence of CX43 between Sertoli cells as well as between the Leydig cells of the interstitium. There are 11 different Cx_s which have been identified in the testis suggesting the presence of selective communication between the different cell types (Pointis et al., 2005). *Cx43* (also known GJA1) has been shown to be correlated with testicular development and function in human and rodents (Batias et al., 1999; Roscoe et al., 2001; Defamie et al., 2003; Pointis and Segretain, 2005). Sertoli-specific *Cx43* deletion has been shown to inhibit spermatogenesis, thereby demonstrating the critical nature of this Cx in spermatogenesis (Sridharan et al., 2007).

In fish, de Montgolfier et al. (2007) identified 4 different Cx_s in the rainbow trout testis (*cx43*, *cx43.4*, *cx30*, and *cx31*). The expression of these Cx_s was both stage- and cell type specific (de Montgolfier et al., 2007). Recent studies on brook trout suggest that the expression of testicular *cx43* and *cx31* increase prior to testicular maturation from stage I to stage II of

spermatogenesis. This suggests that specific exchanges of intercellular signals may change prior to the differentiation of germ cell during spermatogenesis (de Montgolfier et al., 2008).

In salmonids, spermatogenesis is regulated in part by gonadotropins (GtHs) released from the adenohypophysis. Two different GtHs have been identified and appear to be homologous to LH and FSH (Swanson et al., 1991; Van der Kraak et al., 1992). GtH I (FSH-like) is secreted prior to gonadal maturation and regulates steroid synthesis, growth, and differentiation of the testis (Miura et al., 1991; Nagahama, 1994). At the time of spermiation, the pituitary gland secretes less of GtH I and higher levels of GtH II (LH-like). GtH II induces receptor-mediated changes in gonadal enzymes and steroid synthesis resulting in increased levels of $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha,20\beta$ -DP) which is responsible for the final stages of spermiation (Antonopoulou et al., 1999). GtH I and II interact with specific receptors on the testis which modulate gene expression via the production of cAMP (Oba et al., 1999). GtH I receptors (rGtH I) are present in Sertoli cells at each stage of spermatogenesis while GtH II receptors (rGtH II) are only detected in Leydig cells during spermiation (Scott and Sumpter, 1989; Antonopoulou et al., 1999). Testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT) are the major steroid hormones implicated in spermatogenesis. Seasonal variations of plasma T and 11-KT levels are well characterized in salmonids. In general, T increases during the early maturation process while 11-KT increases during spermatogenesis and peaks prior to spawning (Pottinger, 1988). In rainbow trout, two different ARs have been identified, *ar-alpha* and *ar-beta* (Takeo and Yamashita, 1999). These two isoforms are homologous to the mammalian androgen receptor (AR), but have different biological activities (Takeo and Yamashita, 1999).

Thyroid hormones (THs) are also believed to play an important role in spermatogenesis. (Buzzard et al., 2003; Holsberger and Cooke, 2005). Several studies have shown the presence of TH receptors in the fish testis (Kumar et al., 2000; Nelson and Habibi, 2006). Two TH receptor

isoforms, *tr-alpha* and *tr-beta*, have been identified in several fish species (Jones et al., 2002; Raine et al., 2004). There is, however, no information on the expression of these receptor isoforms during spermatogenesis. Studies have reported that treatment with thyroid inhibitors, such as thiourea, can inhibit spermatogenesis. In mammals, THs are important regulators of Sertoli cell differentiation (Buzzard et al., 2003; Holsberger et al., 2003; Holsberger et al., 2005).

There is limited information on the endocrine regulation of testicular Cxs in both fish and mammals. In mammals, 2n-propyl-thiouracil (PTU)-induced hypothyroidism altered the expression of *Cx43* in the testis (St-Pierre et al., 2003). *In vitro* studies have also shown that THs can regulate the expression of *Cx43* in a murine Sertoli cell line (Gilleron et al., 2006).

The objectives of this study were to determine the regulation of testicular Cxs, in particular *cx43*, by studying seasonal variation in testicular Cxs during spermatogenesis in brook trout and examine whether or not testicular *cx43* is regulated *in vitro* by androgens, THs and cAMP.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental protocols

One-year-old male brook trout were sampled at the Station aquicole de Pointe-au-Père (Rimouski, Quebec). Fish were held indoor in 500 L circular tanks under natural photoperiod and water temperature. Fish were sampled each month from June to November 2004 (n=10 fish per month) during spermatogenesis. They were anesthetized in 3-aminobenzoic-ethyl-ester-acid (MS-222; 0.16 g/L), with constant aeration. Fish were weighed, measured, and sexed by dissection under a stereomicroscope. The sex of each fish was later confirmed by histological examination. The gonadosomatic index (GSI) of each fish was determined as follows: GSI = (testis weight x 100) / (body weight – testis weight). Blood samples were removed from caudal blood vessels

using a heparinized syringe and fish were euthanized by decapitation. Blood samples were immediately centrifuged and the resulting plasma was transferred to microfuge tubes and stored at -80°C. For each fish, the left testis was fixed by immersion in Bouin's solution for 24 hrs and subsequently stored in 70% ethanol before being processed for histology. The right testis was rapidly frozen and stored at -80°C.

Comparisons in testicular Cx levels were made between two strains of brook trout which predominantly mature at different ages. The first strain, most of the fish mature in the first year after hatching and are referred to as maturing fish. In the second strain, most of the fish mature at two years of age and are referred as immature fish since all measurements were done in the first year. All fish were maintained under identical holding and feeding conditions. All animal procedures were approved by the University Animal Care Committee.

A total of 30 tubules per slide at a magnification of 630X were used to evaluate the developmental stage of the testis. The stages of spermatogenesis were defined as follows: stage 1, testes contained only spermatogonia; stage 2, the testicular cysts are increased in size, spermatogonia and spermatocytes are both present; stage 3, the testis contains spermatogonia, spermatocytes and spermatids; stage 4, spermatozoa are present in the tubules; stage 5, tubules are filled with spermatozoa; and stage 6, postspawning in which the structure of testicular cysts is disorganized and vacuoles are present (Schulz, 1984).

2.2. In vitro experiment

Four testes from immature brook trout males ($n = 4$) were used for *in vitro* tissue culture. In a first experiment, different concentrations of 11-KT were added to the medium (0, 1, 10, and 100 ng/ml of 11-KT). Spermatogenesis was staged histologically in tubules after 5, 9, 21, and 25

days of culture. The testes were removed from the medium and fixed in Bouin's solution and prepared for histological analyses as described above.

To determine the role of TH and cAMP in the regulation of testicular Cx levels, tissues from four different males ($n = 4$) were cultured for 48 hrs in the presence or absence of either T₃ (194 nM; 3,3',5'-Triiodo-L-thyronine sodium salt, Sigma-Aldrich, Oakville, ON) and/or cAMP (50 ng/ml; N6,2'-o-dibutyryladenosine-3',5'-cyclic monophosphate sodium salt, Sigma-Aldrich) to determine the optimal incubation time for maximal response. Dose-response experiments for cAMP (0, 25, 50, and 100 ng/ml) and T₃ (0, 18, 194, and 370 nM) were also done to determine whether or not testicular *cx43* mRNA levels were TH- or cAMP-dependent. T₃ and cAMP concentration ranges were based on previous studies on the regulation of steroidogenesis in rainbow trout ovarian follicles (Cyr and Eales, 1988; 1989). Incubations were also done in which both cAMP (25 or 50 ng/ml) and T₃ (18 nM) were added together to the culture medium in order to determine if the two could induce synergistic effects.

2.3. Plasma androgens

ImmunoChem™ Double Antibody (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA) radioimmunoassay kits were used to measure total plasma testosterone levels in male brook trout ($n = 10$). The radioactive (I^{125}) hormone was supplied in a phosphate buffered saline solution containing gelatin. A standard curve was constructed using six testosterone concentrations (0, 0.2, 0.6, 2, 6, and 20 ng/ml). Plasma testosterone levels were within the linear range of the assay. All measurements were done in duplicate and replicate measurements varied by less than 5%.

11-KT was measured using an ELISA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). This assay was based on the competition between 11-KT and a 11-KT-acetylcholinesterase (AChE)

conjugate. The inter-assay coefficient of variation was 15.6% and parallelism was tested on pools of plasma and a 0.99 correlation coefficient was obtained.

2.4. mRNA extraction and reverse transcription

Total RNA was isolated from brook trout testes using the Absolutely RNA® Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA). The isolated RNA was treated with DNase (1 U/ μ g of RNA; deoxyribonuclease I, amplification grade; Canadian Life Technologies, Burlington, ON) to remove any contaminating genomic DNA. The resulting RNA was reverse transcribed using oligo d(T) 16-18 primers (GE Health Sciences, Baie D'Urfe, QC, Canada) and M-MLV reverse transcriptase (Canadian Life Technologies) according to the suppliers' instructions.

2.5. RT-PCR

cDNA templates (250 ng) were amplified for ARs using two different primer combinations: Ar-alpha and Ar-beta (Table 1). Amplification by PCR was done using 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 58°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30 s. For testicular *tr-alpha* and *tr-beta*, the cDNA templates (250 ng) were amplified using two different primer combinations as described in Table 1. PCR amplifications were done using 38 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 46°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30s. *rgth I* (Table 1) was measured using specific forward and reverse primers designed against salmonid *rgth I*. Amplification by PCR was done using 35 cycles of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 59.2°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30s. Amplicons for each of the amplified genes were separated on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. *gadph* was amplified by PCR using 28 cycles of denaturation at 94°C for 30s; annealing at 55°C for 30s; and elongation at 72°C for 30s. PCR products were separated on a 1.5% agarose gel, visualized

Table 1: Gene-specific primer sequences used for RT-PCR to identify *ar-alpha*, *ar-beta*, *tr-alpha*, *tr-beta*, *rgthI* and *gadph* in adult brook trout testes.

Primer	Sequence	Product size (bp)
AR α F	GCACATCCATGCACAGATA	225
AR α R	CATGTGCTGGGGT	
AR β F	ACAATATGGACCGAGGCA	451
AR β R	ATGGGCAGTTCTCCTCTC	
TR α F	GCACAACATTCCCCACTTCT	117
TR α R	AGTCGTTGGACACTCCAC	
TR β F	TCACCTGTGAAGGATGCAAG	152
TR β R	GACAGCGATGCACTTCTGA	
rGtH I-F	TGGACGCCATTGGAACATCA	201
rGtH I-R	AGGCCAGACCCAGCATCCTCT	
GAPDH-F	GGGTGAGGTGAGCATGGAGGACG	608
GAPDH-R	GCCC GGACAGGCAGGTTAG	

by ethidium bromide staining, and scanned using a Fluor-STM Multilmager (Biorad, Laboratories, Mississauga, ON). *gadph* mRNA levels did not vary between experimental groups (data not shown) and were used to normalize expression data. For each transcript measured, the densitometric readings used for quantification were within the linear range of the assay.

2.6. Western Blot analyses

Testicular Cxs were measured in membrane enriched protein fractions. Testes (n = 6) were ground with a mortar and pestle in liquid nitrogen and homogenized in buffer (7 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.04 mM CaCl₂, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotonin, 100 µg/ml PMSF, 1 µg/ml pepstatin, and 2 µg/ml antipain) using a motor driven pestle (10 strokes). Samples were centrifuged at 2 200 g for 30 min at 4°C and the resulting supernatant was then centrifuged at 30 000 g for 30 min at 4°C. The resulting protein pellet was resuspended in homogenization buffer and the protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Toronto, ON). Samples were subsequently stored at -86°C until electrophoresis. Proteins were resolved in Laemmli buffer on a 12.5% SDS polyacrylamide gel until the dye reached the bottom of the gel. Separated proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories) at 0.9 A for 60 min at 4°C. The resulting blots containing the separated proteins were stained with Ponceau red S to evaluate transfer efficiency, rinsed, and blocked overnight at 4°C in TBST buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, and 0.05% Tween 20, pH 7.5) containing 5% non fat powdered milk. Membrane blots were incubated with the corresponding anti-Cx antisera: anti-Cx43 (800 ng/ml, Cx43 H-150, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) and anti-Cx43.4 (800 ng/ml, Cx45 N-19, Santa Cruz Biotechnology). Antisera against trout Cx30 (1 µl/ml) and Cx31 (1.33 µl/ml) were those previously described in

de Montgolfier *et al.* (2007). Blots were incubated with specific antisera in TBST buffer for 75 min at room temperature. The blots were washed four times for 15 min in TBST at room temperature and subsequently incubated for 60 min with an alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit (for Cx30, Cx31, Cx43) or anti-goat (for Cx43.4) secondary antibody (400 ng/ml; Santa Cruz Biotechnology) in TBST containing 5% non fat milk and subsequently washed as described above. Complexed antibodies were revealed by using the colorimetric Bio-Rad blotting detection kit (Bio-Rad Laboratories). Membranes were then scanned using a Fluor-STM Multilmager (Biorad, Laboratories, Toronto, ON) to quantify the intensity of the revealed protein bands.

Membranes were subsequently stripped and actin levels were measured by immunoblotting using chemiluminescent detection in order to standardize for protein loading. Blots were incubated with mouse ascites fluid containing anti-actin antibody (29 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 60 min at room temperature. The blots were washed four times for 15 min in TBST at room temperature and incubated for 60 min with a horseradish peroxidase conjugated anti-mouse secondary antibody (1.0 mg/ml; Abcam, Cambridge, MA) in TBST containing 5% non-fat milk, and washed as previously described. Complexed antibodies were revealed using the Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche, Indianapolis, IN). The intensity of the bands was determined by densitometry and the ratios of Cx to actin were determined for each animal. There was no protein bands revealed in blots incubated in the absence of primary antibody (negative control).

2.7. Testicular culture

Testes from immature brook trout ($n = 4$) were cut in 1 mm^3 pieces and placed on nitrocellulose floats in 24-well plastic tissue-culture dishes. Testicular pieces were covered with a drop of culture medium and incubated at 11°C . The culture medium was composed of Leibovitz

L-15 medium without phenol red and supplemented with proline (1.7 mM), aspartic acid (0.1 mM), glutamic acid (0.1 mM), bovine serum albumin fraction V (0.5%; Sigma-Aldrich), retinol (50 µg/l), bovine insulin (1 mg/l), and Hepes (10 mM; Amresco, Ohio, OH), adjusted to pH 7.4. The medium was changed every 2 days. At the end of the incubation, mRNAs were extracted and RTs were done as described above. *cx43* PCR amplifications were done using 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 56.5°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30 s. *cx43* product was 649 pb and was separated on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

2.8. Statistical analyses

Statistical differences in mRNA levels were determined by one-way ANOVA, followed by the Holm-Sidak multiple comparisons method ($\alpha < 0.05$). When data failed the Kolmogorov-Smirnov normality test, a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks was performed instead, followed by a Dunn's test. Statistical analyses were performed using the Statistica software (ver 6.0; StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Gonadosomatic indices

In maturing fish, morphological analyses of the testis indicated that testes were at stage I of spermatogenesis from May until June (Fig. 1A). Testes were at stage 2 of development during the month of July and matured to stage III from the end of July until mid August. Spermiogenesis (stage IV) proceeded until the first half of September and testes matured to stage V, when testes were filled with spermatozoa, until the beginning of October. Final maturation, stage 6, ensued after the spawning (from October to November).

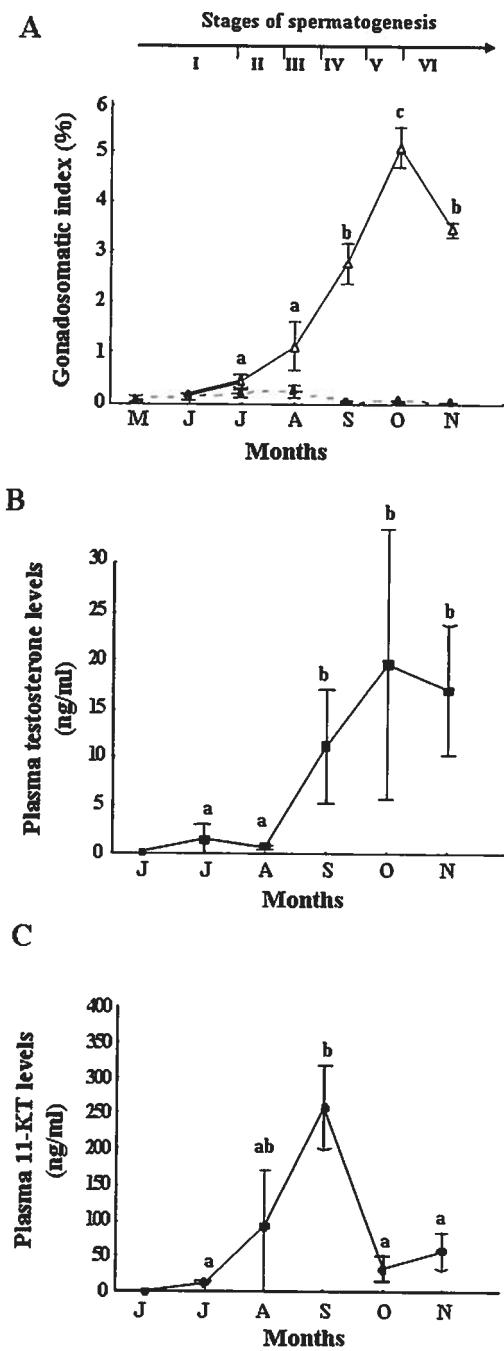


Figure 1: Seasonal variations in the stages of spermatogenesis, gonadosomatic indices (A), plasma testosterone (B), and plasma 11-KT (C) levels. Trout spawned in November. The dotted line represents GSI in immature fish while the solid line represents GSI in maturing fish. Different letters indicate significantly different means ($\alpha < 0.05$; $n=10$ per month).

GSI in immature fish was always below 0.06% and did not vary from May to November (Fig. 1A). In maturing fish, GSI peaked in October ($5.05 \pm 0.81\%$). In November, after spawning, the GSI of mature fish significantly decreased ($3.45 \pm 0.32\%$).

3.2. Circulating levels of 11-ketotestosterone

In order to determine if correlations exist between androgen levels and testicular Cxs we monitored circulating levels of plasma androgen levels during the annual cycle of spermatogenesis. In maturing males, testosterone concentrations were very low and constant from June to August (stages I-III; Fig. 1B). In September (stage IV), testosterone levels reached their maximum levels and remained elevated until November (stage V or VI). Plasma 11-KT concentrations increased from non-detectable levels in June (stage I) to peak concentrations in September (stage IV; 275 ± 50 ng/ml; Fig. 1C). Plasma 11-KT levels subsequently decreased by almost 10-fold in October (transition from stages V to VI, 30 ± 20 ng/ml) and remained at this level in November (stage V or VI).

3.3. Androgen receptor mRNA levels

Both the alpha and beta isoforms of the androgen receptors were amplified in the brook trout testis. We observed a small but significant decrease in *ar-alpha* mRNA levels (Fig. 2A) from June to August (stages I-III) when levels reached their minimum. *ar-alpha* mRNA levels subsequently increased until November (stage V or VI). In contrast, *ar-beta* mRNA levels (Fig. 2B) gradually increased from June (stage I) to November (stage V or VI).

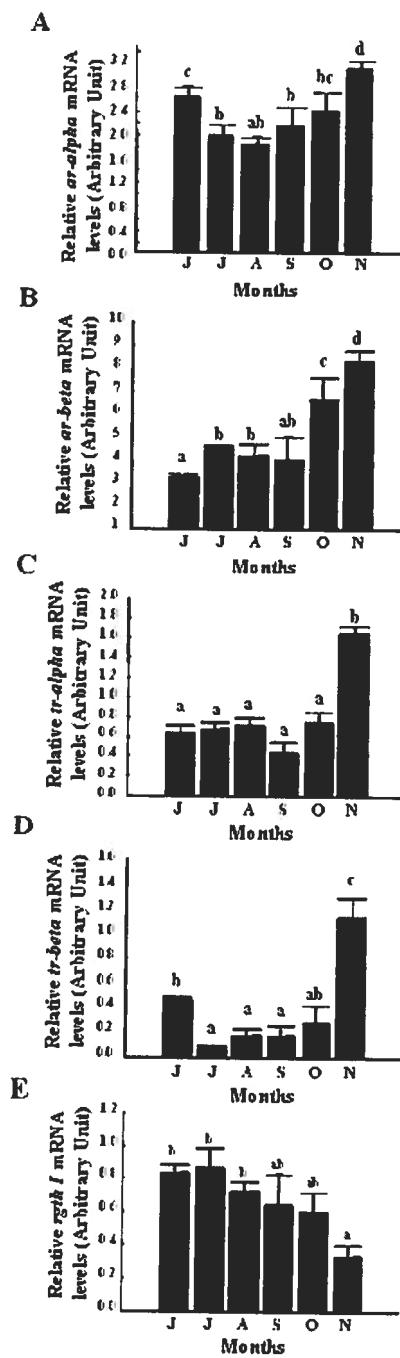


Figure 2: Seasonal variations in mRNA levels of testicular *ar-alpha* (A) *ar-beta* (B), *tr-alpha* (C) *tr-beta* (D) and *rgthI* (E). Total cellular RNA was isolated from testes each month from May until November. Relative mRNA levels were obtained by RT-PCT using gene-specific primers. *gadph* mRNA levels were used to standardize receptor mRNA levels. Different letters indicate significantly different means ($\alpha < 0.05$; $n=6$ per month).

3.4. Thyroid hormone receptor mRNA levels

TH receptor (TR) isoforms were amplified by RT-PCR in the brook trout testis. *tr-alpha* mRNA levels (Fig. 2C) were constant from June to October (stages I-V), and then increased to peak levels in November (stage V or VI). *tr-beta* mRNA levels initially decreased from June to July (stages I-II) by more than 85% and remained constant until November when levels increased 6-fold to peak values (Fig. 2D).

3.5. Gonadotropin IrReceptor mRNA levels

Testicular *rgth I* mRNA levels were high during spermatogenesis (June to October, stages I-V; Fig. 2E). Levels significantly decreased by almost 50% in November (stage V or VI).

3.6. Cxs levels in maturing and immature trout

We compared Cxs levels in immature and maturing trout at the early beginning of testicular development. Interestingly, Cx43, Cx43.4 and Cx31 (Figs. 3A, B, and D) levels were all significantly higher in June and July (transition from stage I to II), in those fish that would mature as compared to fish that remained immature during this reproductive season (stage I). Cx30 was not significantly different between immature and maturing males (Fig. 3C). These data suggest that increased expression of Cxs precedes changes in testicular maturation and that specific gap junctional communication may be required to initiate the process of spermatogenesis.

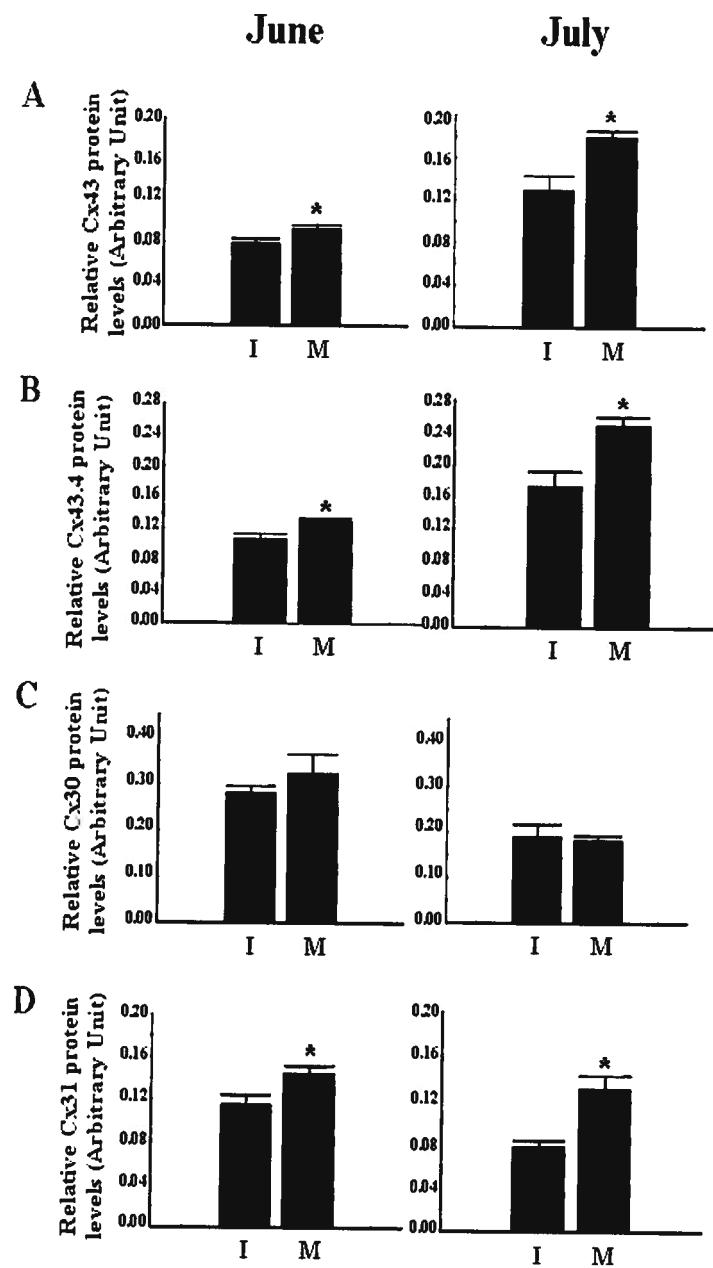


Figure 3: Variations in testicular Cx43 (A), Cx43.4 (B), Cx30 (C), and Cx31 (D) protein levels between immature and maturing fish in June and July when fish were at the same stage of spermatogenesis. Levels of testicular Cxs were determined by Western blot analyses. Actin levels were used to standardize Cxs protein levels. I: immature fish; M: on-going-maturation fish; *: significant variation ($\alpha < 0.05$; $n=6$ per month).

3.7. Testicular Cx protein levels

The Cx antisera used in the present study are the same as those we have previously used to assess the presence of Cxs in brook trout (de Montgolfier et al., 2008). Testicular Cx43 protein levels remained constant throughout the summer until October and then subsequently decreased to their lowest levels in November (Fig. 4A). Cx43.4 levels gradually decreased from July to September (stage III-IV), and were undetectable in October and November (stages V-VI; Fig. 4B). Testicular Cx30 protein levels remained constant from June to October and dramatically decreased by almost 90% in November (Fig. 4C). Testicular Cx31 levels were constant from June (stage I) until September (stage IV; Fig. 4D) and then decreased by 80 and 90% in October and November (stage V or VI).

3.8. In vitro model for testis culture and influence of 11-KT on cx43 mRNA levels

While 11-KT levels were not detectable in fish at stage I of development, and since 11-KT gradually increased until fish reached stage VI, we wanted to know whether or not *cx43* mRNA levels were regulated by 11-KT. *cx43* mRNA levels after 9 days of culture with either 1, 10, and 100 ng/ml of 11-KT were not significantly different from controls (Fig. 5). During the incubation period cultured testicular fragments remained at the same stage of spermatogenesis (data not shown).

3.9. Effect of cAMP and T₃ on cx43 mRNA levels

To assess the effects of cAMP on testicular *cx43* mRNA levels *in vitro*, testicular fragments were first cultured in the presence of cAMP (50 ng/ml) for up to 48 hrs. Results indicated that maximal response was observed after 12 hrs of culture (Fig. 6A). In testes cultured for 12 hrs with varying

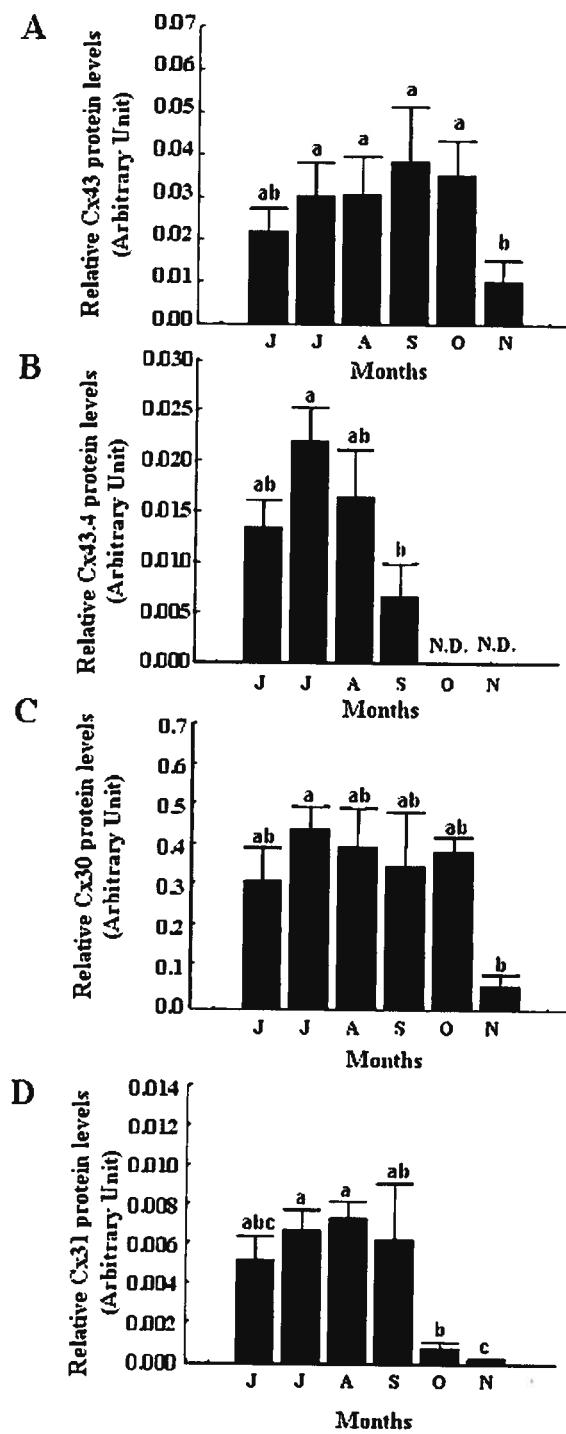


Figure 4: Seasonal variations in testicular Cx43 (A), Cx43.4 (B), Cx30 (C), and Cx31 (D) protein levels during gonadal maturation. Protein levels of Cxs were determined by Western blot analyses. Levels of actin were used to standardize Cx protein levels. Different letters indicate significantly different means ($\alpha < 0.05$; $n = 6$).

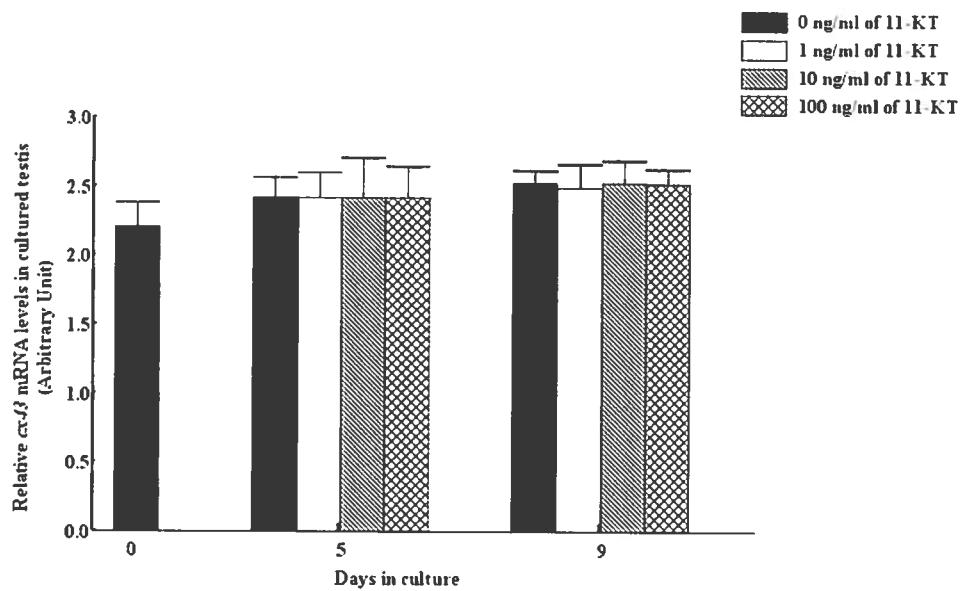


Figure 5: Effects of 11-KT on *cx43* mRNA levels *in vitro*. Testicular fragments were incubated in the presence of 11KT (0-100 ng/ml) for up to 9 days. Total cellular RNA was isolated from the testicular fragments ($n = 4$) at 0, 5 and 9 days of culture. Relative *cx43* mRNA levels were measured by RT-PCR using specific primers for *cx43*. *gadph* mRNA levels were used to standardize mRNA levels. Different letters indicate significantly different means ($\alpha < 0.05$).

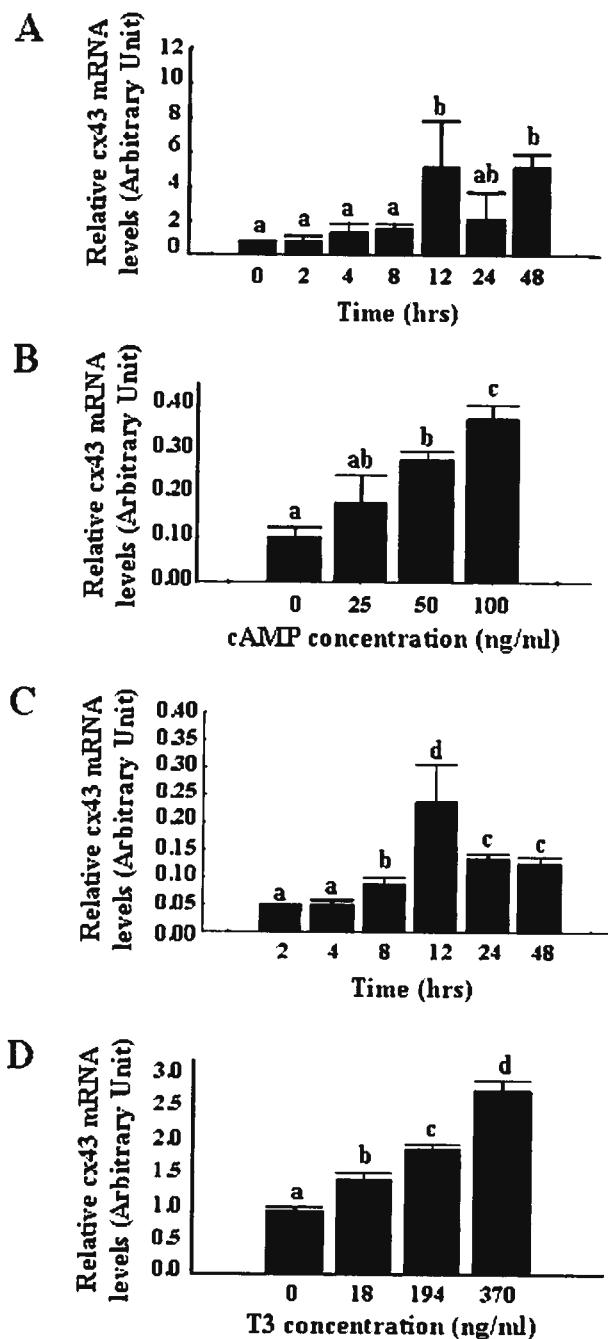


Figure 6: Effects of either cAMP or T₃ on cx43 mRNA levels. Testicular fragments were cultured with cAMP (50 ng/ml) for up to 48 hrs (A). Dose-response experiments were done in which fragments were incubated for 12 hrs with different levels of cAMP (0-100 ng/ml) (B). Testicular fragments were cultured with T₃ (194 nM) for up to 48 hrs (C). Dose-response experiments were done in which fragments were incubated for 12 hrs with different levels of T₃ (0-370 nM) (D). Total RNA was isolated from testicular fragments at each sampling time point. Relative cx43 mRNA levels were measured by RT-PCR using gene-specific primers and the data was expressed relative to *gadph* mRNA levels. Different letters indicate significantly different means ($\alpha < 0.05$; $n = 4$ /group at each time point).

doses of cAMP, a significant dose-response relationship between cAMP and *cx43* mRNA levels was demonstrated (Fig 6B).

To determine if TH regulate testicular *cx43* mRNA levels, testes were first incubated with 194 nM T₃ for up to 48 hrs. Results indicated, as with cAMP, a maximal response after 12 hrs of culture (Fig. 6C). In testes incubated for 12 hrs with varying concentrations of T₃ (0-370 nM), results indicate a significant dose-response relationship between *cx43* mRNA levels and increasing T₃ concentrations (Fig 6D).

In order to determine if cAMP and T₃ acted in synergy with each other, testicular fragments were cultured for 12 hrs in the presence of either cAMP, T₃ or a combination of cAMP and T₃. Results indicate that the combination of cAMP and T₃ did not stimulate testicular *cx43* mRNA levels at levels significantly different from T₃ alone (Fig. 7).

4. Discussion

In this study, we examined seasonal changes in testicular Cxs during the reproductive cycle of the brook trout. Our results indicate that the expression of testicular Cxs was regulated during spermatogenesis. Cx43, Cx30, and Cx31 were expressed throughout spermatogenesis whereas Cx43.4 was present only from June to September. These four Cxs have been previously identified using degenerated primers in a RT-PCR approach, where each PCR product has been cloned and sequenced (de Montgolfier et al., 2007). While recent study suggested that these Cxs could have homology with other Cxs of other fish species (Cruciani and Mikalsen, 2007), we aligned Cxs trout sequences with different Cxs of other fish species, and we did not observed sequence similarities with other Cxs. This supports the notion that each antibody used in this study identified a specific Cx.

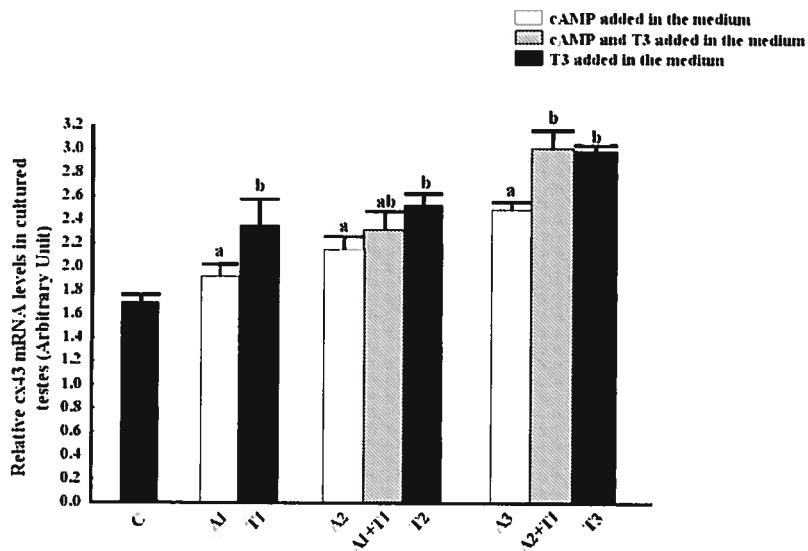


Figure 7: Effects of cAMP and T_3 on testicular *cx43* mRNA levels. Testicular fragments were cultured for 12 hrs in the presence of both cAMP and T_3 . C: negative control; A1: 25 ng/ml of cAMP; A2: 50 ng/ml of cAMP; A3: 100 ng/ml of cAMP; T1: 18 nM of T_3 ; T2: 194 nM of T_3 ; T3: 370 nM of T_3 ; A1+T1: 25 ng/ml of cAMP and 18 nM of T_3 ; A2+T1: 50 ng/ml of cAMP and 18 nM of T_3 . Relative *cx43* mRNA levels were measured by RT-PCR using gene-specific primers and the data was expressed relative to *gadph* mRNA levels. Different letters indicate significantly different means ($\alpha < 0.05$; $n = 4$ /group at each time point).

Our observations indicate that changes in the expression of testicular Cxs may precede the onset of spermatogenesis. By comparing the expression of Cxs in immature with those of maturing fish prior to the onset of spermatogenesis, levels of testicular Cx43, Cx43.4, and Cx31 were always higher in maturing fish. In mammals, it has been shown using a Sertoli-specific conditional knock out mice that *Cx43* is necessary for spermatogenesis (Sridharan et al., 2007). Furthermore, in a previous study on the effects of treated sewage effluent on brook trout testis, it was observed that *cx43* mRNA levels were increased in fish exposed to low doses and that these fish subsequently had increased stages of spermatogenesis (de Montgolfier et al., 2008). The results from this study support the notion that changes in intercellular communication *via* gap junctions may occur prior to the onset of spermatogenesis and that these may contribute to initiating spermatogenesis. However, we cannot discount the possibility that strain differences may account for some of the differences observed.

There is no information on the regulation of testicular Cxs in fish. It has been shown in mammals that the levels of different Cxs may be regulated by different hormones (Cyr et al., 2007). In Leydig cells, *Cx43* levels are regulated by the activation of protein kinase A, protein kinase C as well as cAMP (Goldenberg et al., 2003). TH have also been shown to be important regulators of *Cx43* in Sertoli cells of the seminiferous tubule (St-Pierre et al., 2003). Cyr et al. (1996) have also shown that androgens can regulate the cellular targeting of *Cx43* in the rat epididymis. Therefore, we wanted to determine whether or not there existed any correlations between the seasonal levels of Cxs in the testis and receptor mRNA levels for androgens, TH and GtHs.

In teleost fish, 11-KT and T are the major androgens implicated in gonadal maturation (Miura et al., 1996). Seasonal changes in T and 11-KT during spermatogenesis in brook trout

were similar to those described in other salmonid species (Tveiten et al., 1998). *ar* mRNA levels varied seasonally. While *ar-alpha* mRNA levels were high early in spermatogenesis, levels of both *ar-alpha* and *ar-beta* increased as a function of spermatogenesis and peaked in November at the time of spermiation. Changes in either androgen receptor mRNA levels or in circulating hormone levels did not correlate with the levels of testicular Cxs. Previous studies on mammals, indicate that in prostate, *Cx43* is androgen repressed (Stock et al., 1998) while in the epididymis the targeting of *Cx43* in the initial segment was regulated by androgens (Cyr et al., 1996).

To verify if androgens could regulate testicular *cx43* in brook trout, an *in vitro* model was used in which testicular fragments were incubated with different concentrations of 11-KT. This model, which has been used in both the eel and the rainbow trout (Miura et al., 1991; Bouma et al., 2005). There were no changes in *cx43* mRNA levels after 9 days of culture with increasing concentrations of 11-KT (0, 1, 10, and 100 ng/ml). During the incubation period, cultured testicular fragments remained at the same stage of spermatogenesis.

In rainbow trout, two TRs, *tr-alpha* and *tr-beta*, have been identified and sequenced (Power et al., 2001; Jones et al., 2002; Raine et al., 2004). In the present study, seasonal changes in mRNA levels for the two TR isoforms in the testis were similar. *tr-alpha* mRNA levels were constant throughout spermatogenesis until November when levels increased. The patterns of *tr-beta* mRNA levels were similar except in June when levels were significantly higher than levels observed from July to October. These data were not correlated with changes in any of the testicular Cxs. It has been reported that circulating levels of TH in the dentex (*Dentex dentex*) increase in males at the time of spawning (Pavlidis et al., 2000). In male cod (*Gadus morhua*) there were no discernable cycles of circulating TH levels (Cyr et al., 1998). However, Sambroni, et al. (2001) reported that testicular type 2 deiodinase mRNA levels decreased as a function of spermatogenesis in rainbow trout, suggesting a decrease in TH responsiveness in the testis at the

time of spawning, since type II deiodinase levels have been reported to be TH-dependant (Brown et al. 2004). If this were the case in the brook trout, then this may explain in part the lower levels of Cx43 observed at the time of spawning. The regulation of TH receptor isoforms in the fish testis has not, to our knowledge, been characterized. During development, it has been reported that *tr-beta* mRNA levels are regulated by thyroid hormones but not *tr-alpha* (Walpita et al., 2007; Manchado et al., 2009). In this study both *tr-alpha* and *tr-beta* mRNA levels appear to change simultaneously suggesting that these may be regulated differently from other tissues. Further studies will be needed to establish this.

To determine if TH can regulate *cx43* mRNA levels, experiments were done to determine the effects of T₃ on testicular *cx43* mRNA levels using cultured testicular fragments. The results indicated a clear dose response relationship between T₃ and *cx43* mRNA levels. It has been shown in mammals that the *Cx43* promoter contains a specific thyroid response element and that TH can regulate the expression of Cx43 (Stock et al., 1998; Stock and Sies, 2000). Likewise, St-Pierre et al. (2003) have shown that testicular *Cx43* is decreased during transient PTU-induced hypothyroidism. These data would suggest that the regulation of *cx43* by TH in the testis is similar in fish and mammals. However, the fact that *cx43* and TH receptor isoforms are not correlated during the annual cycle of spermatogenesis, suggests that either the TH receptor isoforms or *cx43* are also regulated by other factors.

GtHs also play a predominant role in the regulation of teleost spermatogenesis (Borg, 1994). GtHs stimulate androgen production by Leydig cells which is necessary for spermatogenesis (Amer et al., 2001). Testicular mRNA levels of *rgth I* were elevated from the onset of spermatogenesis until spermogenesis in brook trout which is consistent with previous studies in the Japanese eel, and the sea bass (Miura et al., 1991; Nagahama, 1994).

Since GtHs act on the testis to increase intracellular levels of cAMP, we determined whether or not cAMP levels could stimulate *cx43* mRNA levels in cultured testicular fragments. Our data indicates that *cx43* mRNA levels were responsive to cAMP. Studies in mammals have reported that *Cx43* levels can be regulated by cAMP (Paulson et al., 2000; Cherian et al., 2003). Depending on the cell type and developmental stage, cAMP has been shown in the rat to either inhibit or stimulate *Cx43* expression (You et al., 2000). Our data suggest that in the adult brook trout testis, cAMP can stimulate *cx43* levels. This may explain why we observe differences in testicular Cx43 levels between immature and maturing fish. In mammals, the onset of spermatogenesis can be induced by T alone (Haywood et al., 2003). FSH also plays an important role in the regulation and development of both Sertoli and germ cells in the immature testis (Sharpe et al., 2003). The initiation of spermatogenesis in fish is induced by GtH I which stimulate Leydig cells to produce 11-KT which in turn can act on Sertoli cells and stimulate gonadal maturation (Miura et al., 1991). Previous studies have shown that T₃ can stimulate GtH-induced steroidogenesis in ovarian follicles (Cyr and Eales, 1989). Our data indicate that T₃ in the culture medium did not significantly enhance cAMP-induced *cx43* mRNA levels and that the regulation of Cx43 by these factors likely occurs independently of one another.

In conclusion, this is the first report on seasonal variations of testicular Cxs during spermatogenesis in fish. The expression of different testicular Cxs appeared to be associated with different stages of spermatogenesis, as previously reported in rainbow trout (de Montgolfier et al., 2007). Cx43, a predominant testicular Cx that is expressed in trout Sertoli cells, was regulated by both T₃ and cAMP indicating that TH and hormones that act on a cell *via* G-protein coupled receptors may regulate, at least in part, by regulating intercellular gap junctional communication.

Acknowledgements

Dominique Lavallée is thanked for her technical assistance. This study was supported by the AQUANET Network of Excellence, the SORDAC, and the VRQ-Réseau Aquaculture Québec (RAQ).

References

- Amer, M.A., Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol Reprod.* 65, 1057-1066.
- Antonopoulou, E., Mayer, I., Borg, B., Swanson, P., Murza, I., Christoforov, O., 1999. Effects of testosterone on gonadotropins, testes, and plasma 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnene-3-one levels in postbreeding mature Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr. *J Exp Zool.* 284, 425-436.
- Batias, C., Defamie, N., Lablack, A., Thepot, D., Fenichel, P., Segretain, D., Pointis, G., 1999. Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res.* 298, 113-121.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 109, 219-245.
- Bouma, G.J., Cloud, J.G., Nagler, J.J., 2005. An in vitro system for the long-term tissue culture of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) testis. *J Exp Zool.* 303A, 698-703.
- Brehm, R., Zeiler, M., Rüttinger, C., Herde, K., Kibschull, M., Winterhager, E., Willecke, K., Guillou, F., Lécureuil, C., Steger, K., Konrad, L., Biermann, K., Failing, K., Bergmann,

M., 2007. A Sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents the initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol.* 171, 19-31.

Brown, S.B., Adams, B., A., Cyr, D.G., Eales, J.G., 2004. Contaminant effects on the teleost fish. *Environ Toxicol Chem.* 23, 1680-1701.

Buzzard, J.J., Wreford, N.G., Morrison, J.R., 2003. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology.* 144, 3722-3731.

Cherian, P.P., Cheng, B., Gu, S., Sprague, E., Bonewald, L.F., Jiang, J.X., 2003. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. *J Biol Chem.* 278, 43146-43156.

Cruciani, V., Mikalsen, S.O., 2007. Evolutionary selection pressure and family relationships among connexin genes. *Biol Chem.* 388, 253-264.

Cyr, D.G., Dufresne, J., Gregory, M., 2003. Cellular communication and the regulation of gap junctions in the epididymis. In: B.T. Hinton and T.T. Turner eds. "The Third International Conference on the Epididymis". The Van Doren Company, Charlottesville, VA, pp 50-59.

Cyr, D.G., Eales, J.G., 1989. T3 enhancement of in vitro estradiol-17 β secretion by oocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, is dependent on cAMP. *Fish Physiol Biochem.* 6, 255-259.

- Cyr, D.G., Eales, J.G., 1988. In vitro effects of thyroid hormones on gonadotropin-induced estradiol-17 β secretion by ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen Comp Endocrinol. 69, 80-87.
- Cyr, D.G., Gregory, M., Dube, E., Dufresne, J., Chan, P.T., Hermo, L., 2007. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. Asian J Androl. 9, 463-475.
- Cyr, D.G., Hermo, L., Laird, D.W., 1996. Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. Endocrinology. 137, 1474-1484.
- Cyr, D.G., Idler, D.R., Audet, C., McLeese, J.M., Eales, J.G., 1998. Effects of long-term temperature acclimation on thyroid hormone deiodinase function, plasma thyroid hormone levels, growth, and reproductive status of male Atlantic cod, *Gadus morhua*. Gen Comp Endocrinol. 109, 24-36.
- de Montgolfier, B., Fournier, M., Audet, C., Marcogliese, D.J., Cyr, D.G., 2008. Influence of municipal effluents on the expression of connexins in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) testis. Aquat Toxicol. 86, 38-48.
- de Montgolfier, B., Dufresne, J., Letourneau, M., Nagler, J., Fournier, A., Audet, C., Cyr, D.G., 2007. The expression of multiple connexins throughout spermatogenesis in the rainbow trout testis suggests a role for complex intercellular communication. Biol Reprod. 76, 2-8.

Defamie, N., Berthaut, I., Mograbi, B., Chevallier, D., Dadoune, J.P., Fenichel, P., Segretain, D., Pointis, G., 2003. Impaired gap junction connexin43 in Sertoli cells of patients with secretory azoospermia: a marker of undifferentiated Sertoli cells. *Lab Invest.* 83, 449-456.

Eastman, S.D., Chen, T.H., Falk, M.M., Mendelson, T.C., Iovine, M.K., 2006. Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes. *Genomics.* 87, 265-274.

Gilleron, J., Nebout, M., Scarabelli, L., Senegas-Balas, F., Palmero, S., Segretain, D., Pointis, G., 2006. A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of Sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol.* 209, 153-161.

Goldenberg, R.C.S., Fortes, F.S.A., Cristancho, J.M., Morales, M.M., Franci, C.R., Varanda, W.A., Campos de Carvalho, A.C., 2003. Modulation of gap junction mediated intercellular communication in TM3 Leydig cells. *J Endocrinol.* 177, 327-335.

Goodenough, D.A., Goliger, J.A., Paul, D.L., 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* 65:475-502.

Haywood, M., Spaliviero, J., Jimemez, M., King, N.J., Handelsman, D.J., Allan, C.M., 2003. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology.* 144, 509-517.

Holsberger, D.R., Cooke, P.S., 2005. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res.* 322, 133-140.

Holsberger, D.R., Jirawatnotai, S., Kiyokawa, H., Cooke, P.S., 2003. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27(Kip1) in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology*. 144, 3732-3738.

Holsberger, D.R., Kiesewetter, S.E., Cooke, P.S., 2005. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor α 1. *Biol Reprod.* 73, 396-403.

Jones, I., Rogers, S.A., Kille, P., Sweeney, G.E., 2002. Molecular cloning and expression of thyroid hormone receptor α during salmonid development. *Gen Comp Endocrinol.* 125, 226-235.

Kumar, N.M., Gilula, N.B., 1996. The gap junction communication channel. *Cell*. 84, 381-388.

Kumar, R.S., Ijiri, S., Kight, K., Swanson, P., Dittman, A., Alok, D., Zohar, Y., Trant, J.M., 2000. Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor from the gonads of a vertebrate (bony fish): potential thyroid-independent role for thyrotropin in reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 167, 1-9.

Lagree, V., Brunschwig, K., Lopez, P., Gilula, N.B., Richard, G., Falk, M.M., 2003. Specific amino-acid residues in the N-terminus and TM3 implicated in channel function and oligomerization compatibility of connexin43. *J Cell Sci.* 116, 3189-3201.

Manchado, M., Infante, C., Rebordinos, L., Canavate, J.P., 2009. Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of thyroid hormone receptors in Senegalese sole. *Gen Comp Endocrinol.* 160, 139-147.

Miura, C., Miura, T., Yamashita, M., Yamauchi, K., Nagahama, Y., 1996. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese eel testis. *Dev Growth Differ.* 38, 257-262.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 5774-5778.

Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol.* 38, 217-229.

Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2006. Molecular characterization and sex-related seasonal expression of thyroid receptor subtypes in goldfish. *Mol Cell Endocrinol.* 253, 83-95.

Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Yoshikuni, M., Kawauchi, H., Nagahama, Y., 1999. The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second

gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Biochem Biophys Res Commun. 265, 366-371.

Paulson, A.F., Lampe, P.D., Meyer, R.A., TenBroek, E., Atkinson, M.M., Walseth, T.F., Johnson, R. G., 2000. Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. J Cell Sci. 113, 3037-3049.

Pavlidis, M., Greenwood, L., Mourat, B., Kokkari, C., Le Menn, F., Divanach, P., Scott, A.P., 2000. Seasonal variations and maturity stages in relation to differences in serum levels of gonadal steroids, vitellogenin, and thyroid hormones in the common dentex (*Dentex dentex*). Gen Comp Endocrinol. 118, 14-25.

Pointis, G., Fiorini, C., Defamie, N., Segretain, D., 2005. Gap junctional communication in the male reproductive system. Biochim Biophys Acta. 1719, 102-116.

Pointis, G., Segretain, D., 2005. Role of connexin-based gap junction channels in testis. Trends Endocrinol Metab. 16, 300-306.

Pottinger, T.G., 1988. Seasonal variation in specific plasma- and target-tissue binding of androgens, relative to plasma steroid levels, in the brown trout, *Salmo trutta* L. Gen Comp Endocrinol. 70, 334-344.

- Power, D.M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M.A., Bjornsson, B.T., Einarsdottir, I.E., Canario, A.V., Sweeney, G.E., 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 130, 447-459.
- Raine, J.C., Cameron, C., Vijayan, M.M., Lamarre, J., Leatherland, J.F., 2004. The effect of elevated oocyte triiodothyronine content on development of rainbow trout embryos and expression of mRNA encoding for thyroid hormone receptors. *J. Fish Biol.* 65, 206-226.
- Risley, M.S., Tan I.P., Roy C, Saez, J.C., 1992. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci.* 103, 81-96.
- Roscoe, W.A., Barr, K.J., Mhawi, A.A., Pomerantz, D.K., Kidder, G.M., 2001. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod.* 65, 829-838.
- Sambroni, E., Gutieres, S., Cauty, C., Guiguen, Y., Breton, B., Lareyre, J J., 2001. Type II iodothyronine deiodinase is preferentially expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and gonads. *Mol Reprod Dev.* 60, 338-350.
- Schulz, R., 1984. Serum levels of 11-oxotestosterone in male and 17 β -estradiol in female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol.* 56, 111-120.

Scott, A.P., Sumpter, J.P., 1989. Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. *Gen Comp Endocrinol.* 73, 46-58.

Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J.S., 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 125, 769-784.

Sridharan, S., Simon, L., Meling, D.D., Cyr, D.G., Gutstein, D.E., Fishman, G.I., Guillou, F., Cooke, P.S., 2007. Proliferation of adult Sertoli cells following conditional knockout of the gap junctional protein GJA1 (Connexin 43) in mice. *Biol Reprod.* 76, 804-812.

St-Pierre, N., Dufresne, J., Rooney, A.A., Cyr, D.G., 2003. Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. *Biol Reprod.* 68, 1232-1240.

Stock, A., Sies, H., 2000. Thyroid hormone receptors bind to an element in the connexin43 promoter. *Biol Chem.* 381, 973-979.

Stock, A., Sies, H., Stahl, W., 1998. Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones. *Biochem Pharmacol.* 55, 475-479.

Swanson, P., Suzuki, K., Kawauchi, H., Dickhoff, W.W., 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol Reprod.* 44, 29-38.

Takeo, J., Yamashita, S., 1999. Two distinct isoforms of cDNA encoding rainbow trout androgen receptors. *J Biol Chem.* 274, 5674-5680.

Tveiten, H., Mayer, I., Johnsen, H. K., Jobling, M., 1998. Sex steroids, growth and condition of Arctic charr broodstock during an annual cycle. *J Fish Biol.* 53, 714-727.

Van der Kraak, G., Suzuki, K., Peter, R.E., Itoh, H., Kawauchi, H., 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *Gen Comp Endocrinol.* 85, 217-229.

Vaney, D.I., Nelson, J.C., Pow, D.V., 1998. Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina. *J Neurosci.* 18, 10594-10602.

Walpita, C.N., Van der Geyten, S., Rurangwa, E., Darras, V.M., 2007. The effect of 3,5,3'-triiodothyronine supplementation on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development and expression of iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors. *Gen Comp Endocrinol.* 152, 206-214.

You, S., Li, W., Lin, T., 2000. Expression and regulation of connexin43 in rat Leydig cells. *J Endocrinol.* 166, 447-453.

DEUXIÈME PARTIE, SECTION 4 : CHARACTERIZATION OF THE BROOK TROUT CX43 PROMOTER : ROLE OF THE THYROID HORMONE RECEPTOR-BETA AND C/EBP BINDING SITES IN TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION.

Benjamin de Montgolfier, Céline Audet, et Daniel G. Cyr

En préparation pour soumission.

4.1 Résumé français de l'article

Les jonctions lacunaires sont essentielles pour assurer le déroulement de la spermatogenèse. En effet, une diminution des niveaux de CX43 dans le testicule entraîne une perturbation de la spermatogenèse, voire une infertilité, chez les mammifères. Des études ont montré que l'AMPc et les hormones thyroïdiennes augmentaient l'expression de la *Cx43*. Les objectifs de la présente étude étaient de déterminer si l'AMPc et la T₃ régulaient l'expression de la *cx43* via la transcription. Un fragment de 607 pb du promoteur de la *cx43* a été cloné et séquencé par Genome Walking. C/EBP (-164 to -156) et *tr-beta* (-112 to -107), deux sites de liaison ont été identifiés sur ce fragment ; de plus, des expériences par retardement sur gel ont montré la fixation de protéines nucléaires sur ces deux régions. Des cellules RTG-2 ont été incubées avec différentes concentrations d'AMPc ou de T₃. En présence d'AMPc, seules les contructions -431 présentaient une augmentation significative des niveaux de transactivation, et

les construits mutés pour le site C/EBP n'ont pas montré de transactivation, suggérant ainsi que C/EBP augmente la transcription de *cx43*. Les constructions -158 et -431 ont montré une augmentation des niveaux de transactivation en présence de T₃. Aucune transactivation n'a été observée lorsque *tr-beta* était muté chez ces construits, confirmant aussi l'activation de la *cx43* par *tr-beta*. En présence d'AMPc et de T₃ dans le milieu de culture, aucun effet additif n'a été noté sur les construits -158 et -431. En conclusion, nous avons isolé, cloné et séquencé pour la première fois le promoteur de la *cx43* et démontré l'activation de sa transcription *in vitro* par C/EBP et *tr-beta*.

4.2 Contribution de l'étudiant

L'ensemble des expériences présentées dans cette étude a été réalisé par l'étudiant. La première version du manuscrit de l'article a été écrite par l'étudiant. De plus, l'étudiant participe au choix du journal et effectue les modifications du manuscrit en apportant les corrections nécessaires.

Characterization of the Brook Trout *cx43* Promoter: Role of the Thyroid Hormone Receptor-*beta* and C/EBP Binding Sites in Transcriptional Activation

Benjamin de Montgolfier¹, Céline Audet², and Daniel G. Cyr¹

¹ INRS-Institut Armand Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC H7V 1B7

² ISMER, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, QC G5L 3A1

Running Title: T₃ and cAMP regulate the *cx43* promoter in brook trout testis.

Keywords: Connexin, Spermatogenesis, Cellular communication, Promoter sequence, Brook trout.

This study was supported by an NSERC Discovery grant to DGC, the AQUANET Network of Excellence, the SORDAC, and the Réseau Aquaculture Québec.

Address for correspondence:

Dr. Daniel G. Cyr
INRS-Institut Armand-Frappier
Université du Québec
531 boul. des Prairies
Laval, QC, H7V 1B7
Tel. (450) 686-5010 ext. 8833
Fax. (450) 686-5309
E-mail: daniel.cyr@iaf.inrs.ca

Abstract

Gap junctions are crucial for spermatogenesis; in fact, a loss of CX43 expression in mammalian Sertoli cells prevents spermatogenesis. Previous studies in brook trout have demonstrated that cAMP and thyroid hormones regulate *Cx43* expression. The objective of the present study was to determine if cAMP and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) regulate *cx43* transcription. A 607 bp 5' flanking sequence of the *cx43* promoter was cloned and sequenced by Genome Walking. The TATA box was predicted to be located between position -36 and -30, and 67 different binding sites were identified using the TRANSFAC software. 5'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE) indicated a single transcriptional start site for the brook trout *cx43* (btCx43) gene. Single C/EBP (-164 to -156) and *tr-beta* (-112 to -107) response elements were identified, and electrophoretic mobility shift assays indicated the presence of competitive protein binding sites at each of the two regions in brook trout testis. Cells from an immortalized rainbow trout gonadal cell line (RTG-2) were shown to express the *cx43* transcript. The btCx43 promoter was inserted into a luciferase gene expression vector and transfected into RTG-2 cells. Transactivation of the construct was stimulated by either cAMP or T_3 . Sequential deletion analysis revealed that cAMP-induced transactivation occurred only in the -431bp construct and that the activity was lost in the -158 bp and -91 bp constructs. This is consistent with the position of the C/EBP response element. Point mutations in the C/EBP response element prevented cAMP-induced transactivation. T_3 induced transactivation was induced in both the -158 and -431 constructs. There was no transactivation activity in the -91pb construct. Mutation of the *tr-beta* response element prevented T_3 -induced transactivation of the btCx43 promoter. No additive effects were observed with the -158 and -431 constructs when cells were incubated with both T_3 and cAMP, suggesting that either signalling molecular can elicit maximal activity. Together these data indicate that both cAMP and T_3 stimulate *cx43* expression via direct regulation of gene

transcription.

Introduction

Spermatogenesis is a process that requires complex cell–cell interactions. Gap junctions, which are low-resistance channels, allow the passage of small molecular weight metabolites (< 1 KDa) such as cAMP, inositol, and ions (Ca^{2+} , H^+ , Cl^-) between neighbouring cells, thereby allowing direct intercellular communication between adjacent cells. Gap junctions are composed of hexomeric connexons which are themselves composed of proteins referred to as connexins (Cx_s) which are differentially expressed in different tissues. Certain cells express a single Cx while others can express several Cxs (Beyer et al., 1990). There are few studies on Cxs in fish. A recent study on the zebrafish genome revealed the presence of 37 different Cxs (Eastman et al., 2006). Previous studies done in our lab have identified four different Cxs in both rainbow and brook trout testis: Cx43, Cx43.4, Cx30, and Cx31 (de Montgolfier et al., 2007; 2008). Each of the four Cxs identified in the testis is expressed in different cell types. Cx43 was localized along the plasma membrane of Sertoli cells in both rainbow and brook trout testes, as is the case in mammals (Risley et al., 1992; Pointis and Segretain, 2005; de Montgolfier et al., 2007).

In brook trout, 11-ketotestosterone (11-KT) does not appear to be an important regulator of testicular *cx43* (de Montgolfier et al., 2009). However, cAMP and triiodothyronine (T₃) can modify *cx43* mRNA levels, suggesting that FSH, acting through cAMP, and thyroid hormone may be implicated in regulating *cx43* levels in brook trout testis (de Montgolfier et al., 2009). cAMP has been implicated in the regulation of gap junctions in various cell types (Dowling-Warriner and Trosko, 2000; Romanello et al., 2001; TenBroek et al., 2001; Yao et al., 2006).

Thyroid hormones (THs) are implicated in fish reproduction (Cyr and Eales, 1996); thyroid inhibitors can inhibit spermatogenesis (Swapna et al., 2006). In teleosts, two isoforms of thyroid hormone receptors (TRs), *tr-alpha* and *tr-beta* have been shown to be present in the brook trout testis (de Montgolfier et al., 2009). Furthermore, incubation of testicular fragments

with varying concentrations of T₃ is correlated with increased levels of *cx43* mRNA levels. Studies in mammals have also shown that THs can modify Cx43 levels in the testis and in a murine Sertoli cell line (St-Pierre et al., 2003; Gilleron et al., 2006). Moreover, THs are known to be important regulators of Sertoli cell differentiation (Buzzard et al., 2003; Holsberger et al., 2003; Holsberger and Cooke, 2005), a process that is dependant on *Cx43* (Brehm et al., 2007; Sridarahan et al., 2007).

While we have previously shown that testicular mRNA levels of *cx43* is dependent on both cAMP and T₃, there is no evidence to indicate whether or not this regulation occurs at the transcriptional level or *via* other means. In order to determine if cAMP and/or T₃ regulate the transactivation of the btCx43 gene, we intend to characterize the btCx43 promoter and, using *in vitro* approaches, assess whether or not cAMP and T₃ can directly stimulate the transcription of the btCx43 gene.

Material and Methods

Animals

One-year-old male brook trout were sampled at the Station aquicole de Pointe-au-Père (Rimouski, Québec). Fish were held indoors in 500 L circular tanks under natural photoperiod and water temperature conditions. For sampling, fish were anesthetized in 3-aminobenzoic-ethyl-ester-acid (MS-222; 0.16 g/L) with constant aeration. Fish were weighed, measured, and sexed. All animal procedures were approved by the University Animal Care Committee.

mRNA extraction and reverse transcription

Total RNA was isolated from brook trout testes and RTG-2 cells using the Absolutely RNA® Miniprep kit (Stratagene, La Jolla, CA). The isolated RNA was treated with DNase (1 U/ μ g of RNA; deoxyribonuclease I, amplification grade; Canadian Life Technologies, Burlington, ON) to remove any contaminating genomic DNA. The resulting RNA was reverse transcribed using oligo d(T) 16-18 primers (GE Health Sciences, Baie D'Urfe, QC, Canada) and M-MLV reverse transcriptase (Canadian Life Technologies) according to the supplier's instructions.

RT-PCR

cDNA templates (250 ng) were amplified for *cx43* using specific primers (Table 1). Amplification by PCR was done using 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 58°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30s. Amplicons were separated on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Rapid amplification of cDNA 5' ends (RACE)

Total RNA was isolated from brook trout testes at stages 2 and 3 of spermatogenesis using the Absolutely RNA Miniprep kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The isolated RNA was treated with DNase (1 U/ μ g of RNA; deoxyribonuclease I, amplification grade; Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Canada) to remove contaminating genomic DNA. A 1 μ g aliquot of total mRNA was used for first-strand cDNA synthesis. RACE-PCR was done using the BD SMARTTM RACE cDNA Amplification kit (BD Biosciences, San Jose, CA). The amplification was done by Touchdown PCR using 5 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 72°C for 3 min; 5 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 70°C for 30 sec, elongation at 72°C for 3 min; and 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 68°C for 30 sec, and elongation at 72°C for 3 min. The RACE-PCR products were separated on a 0.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. RT-PCR products were extracted from the agarose gel (QIAEX II Gel Extraction kit; Qiagen, Mississauga, ON, Canada), and sequenced using an automated sequencer (Genetic analyzer 3130, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). Cx43R1 and Cx43RC1 were used as gene-specific primers in two separate reactions which were designed to amplify products of 594 bp and 233 bp respectively (Table 2). RACE-PCR reactions with buffer alone were used as negative controls and the amplification of transferrin from human placenta was used as positive control. The sequences of the resulting amplicons were compared to other known Cxs using BLAST homology comparisons (GenBank, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

Table 1: Gene-specific primer sequences used for RT-PCR to identify *cx43* in adult brook trout testes.

Primer	Sequence	Product size (bp)
CxF1	ATGGGTGACTGGAGYKYCYTRG	
CxR1	ACCACCARCATRAAGAYRATGAAG	649

Table 2: Gene-specific primer sequences used for RACE-PCR in adult brook trout testes. N = A, C, G, or T; V = A, G, or C

Primer	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)
Cx43R1	CGATGTAGGTTCTCAAGAGGGCTCC	600
UPM	CTAATACGACTCACTATAAGGGC	
Cx43RC1	CGT GGA GTA AGC CTG AAC CTT GT	240
UPM	CTAATACGACTCACTATAAGGGC	
5'-CDS primer	(T)25V N	2600
UPM	CTAATACGACTCACTATAAGGGC	

Isolation of the 5' flanking region of the brook trout cx43 gene

The 5' flanking region of the btCx43 gene was done by genome walking using the Genome Walker kit (Clontech, Palo Alto, CA). Genomic DNA was digested with four different enzymes (Dra I, EcoR V, Pvu II, and Stu I). The BD GenomeWalker Adaptor was linked to the 5' ends of each DNA fragment in the four libraries with T4 DNA ligase. PCRs were done using specific primers; the resulting products were resolved on a 0.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The PCRs products were then extracted from the gel (QIAEX II Gel Extraction kit; Qiagen, Mississauga, ON, Canada), cloned into the pCRII-Topo vector. The resulting clones were sent for automated sequencing (DNA Landmarks, Ste-Julie, QC)

Extraction of nuclear proteins

Nuclear proteins from brook trout testis were extracted using a nuclear protein extraction kit (Nuclear Extraction kit; Active Motif, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Protein concentrations were quantified using the Bio-Rad protein assay reagents (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada).

Electrophoresis mobility shift assays (EMSA)

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were done according to the methods described in previous studies (Plante et al., 2002; Dufresne and Cyr, 2007; Plante et al., 2007). Nuclear extracts from brook trout testes were prepared as described above. Protein concentrations were measured using the Bio-Rad reagent. Two oligonucleotides spanning the region of interest (positions -173 to -143 and -123 to -93 relative to the transcription start site; Table 3) were synthesized, as were their respective complementary strands (Invitrogen Inc., Burlington, ON,

Table 3: Sequence of the promoter fragments used as DNA probes for EMSA.

Fragment name ^a	Position ^b	Length	Sequence (5'-3') ^c
BtT3R-beta F	-123 to -93	30	CCATGCATTGTTACTTCTAGGTTAGACTA
<u>m</u> BtT3R-beta F	<u>-123 to -93</u>	30	<u>CCATGCATTGGGCAGGCTAGGTTAGACTA</u>
BtC/EBP F	-173 to -143	30	ATTGCAAAATCAGAAATTTCTGTCCAGA
<u>m</u> BtC/EBP F	<u>-173 to -143</u>	30	<u>ATTGCAAAACGACTCCCGTTCTGTCCAGA</u>

^a F, forward.^b Forward primer names indicate the length of the PCR products.^c Letters in bold represent a binding site sequence, whereas underlined letters in bold represent a mutation site.

Canada). Brook trout *cx43* promoter fragments (10 pmol of sense oligonucleotides) were incubated with T4 polynucleotide kinase (InVitrogen Life Technologies, Burlington, ON) and [γ -³²P] ATP, for 30 min at 37°C using 5 U of T4 polynucleotide kinase and reaction buffer (GE Healthcare, Mississauga, ON) in a total volume of 50 μ l. Following the incubation, the labeled oligonucleotide was heated at 65.8°C for 10 min and incubated for 30 min at room temperature with a 2.5 molar excess of its antisense counterpart preheated in the same manner. The double-strand oligonucleotide was purified on a sephadex G-50 column (Nick Column; GE Healthcare), and the radioactive content from 2 μ l of the resulting fraction was determined in order to ensure a specific activity of at least 5000 cpm/fmol. A radioactive double-stranded DNA fragment was incubated for 30 min at room temperature with 30 μ g of nuclear protein (a pool of three individuals) in EMSA incubation buffer (4% glycerol, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, and 50 μ g/ml poly dI-dC), and preincubated, when appropriate, with unlabeled oligonucleotide for 30 min at room temperature. Labeled oligonucleotides (30 fmol) were then added to the mixture for a final volume of 15 μ l, and incubated for an additional 30 min at room temperature. The binding reaction products were mixed with 3 μ l of 6X DNA loading buffer then separated by electrophoresis (120 V, 400 mA) on a 6% polyacrylamide gel, dried, exposed overnight to a phosphorus screen, and scanned with a PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Construct and luciferase assay

Sequential deletion constructs of the *cx43* promoter were achieved by PCR using specific primer combinations (Table 4). Restriction sites were inserted into the primers to ensure that the cloning was unidirectional. PCR products were ethanol-precipitated, purified on agarose gel, and

double-digested with NheI and KpnI (GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC). The digested products were loaded onto an agarose gel, separated by electrophoresis, and purified. These fragments were ligated into the NheI and KpnI cloning site of the pGL3-Basic vector upstream of the firefly luciferase gene (Promega, Madison, WI) using T4 DNA ligase (Invitrogen). Competent JM109 bacteria were chemically transformed with the three different constructs. Colonies were analyzed by restriction enzyme digest, and positive clones were selected, grown, purified with a commercial kit (Plasmid Midi Kit; Qiagen), and stored at -20°C.

The *tr-beta* binding site in pGL3 constructs containing the -431 to +75 fragment and the -158 to +75 fragment of the *cx43* promoter were mutated using the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). A four-base mutation (GGCG to TTAC) was introduced according to the manufacturer's instructions using the sense mutagenic primer 5'-GGT ACC GCT GCA TGC CGG GAG GTT ACG AGC TGC TTT AAA TCG-3' and its complementary strand as the antisense primer (Operon Biotechnologies, Huntsville, AL). The selected resulting clones were sequenced (Genome Quebec), and plasmids were purified (Plasmid Midi kit) and stored at -20°C.

The C/EBP binding site in pGL3 constructs containing the -431 to +75 fragment of the *cx43* promoter was mutated using the same protocol described above for the *tr-beta* binding site mutation. A four-base mutation (GGCG to TTAC) was introduced using a sense mutagenic primer 5'-GGT ACC GCT GCA TGC CGG GAG GTT ACG AGC TGC TTT AAA TCG-3' and its complementary strand as the antisense primer (Operon Biotechnologies, Huntsville, AL). The selected resulting clones were sequenced (Genome Quebec) and grown. Plasmids were purified using a Plasmid Midi kit (Qiagen, Mississauga, ON) and stored at -20°C. Plasmids were purified using a Plamid Midi kit (Qiagen, Mississauga, ON) and stored at -20°C. A plasmid containing the luciferase gene under the control of the Rous sarcoma virus long terminal repeat (pRSV-L) was

Table 4: List of primers used to generate the *cx43* promoter sequential deletion constructs.

Primers ^{a,b}	5' Position	Length	Sequence (5' to 3') ^c	Annealing temp. (°C)
<i>BTCx43PF</i> -522pb	-431	14	CGCT <u>GGTACC</u> CTGT	51.3
<i>BTCx43PR</i> -522pb	+75	17	CCT <u>GGAGG</u> CTAGCCTGA	
<i>BTCx43PF</i> -249pb	-158	21	AACTTT <u>CGGTAC</u> CAAAATGAT	50.7
<i>BTCx43PR</i> -249pb	+75	17	CCT <u>GGAGG</u> CTAGCCTGA	
<i>BTCx43PF</i> -172pb	-91	18	TGCAAT <u>GCGGTAC</u> CTTCC	50.7
<i>BTCx43PR</i> -172pb	+64	17	GC <u>CTGAAG</u> CTAGCAATC	

^a R, Reverse; F, forward.^b Forward primer names indicate the length of the PCR products.^c Underlined text indicates NheI (reverse primer) and KpnI (forward primer) restriction sites.

used as a positive control.

RTG-2 cell line culture and transfection

Immortalized rainbow trout gonadal cell line (RTG-2; American Type Culture Collection, ATCC, CCL 55) were used to assess the transactivation of the btCx43 gene. RTG-2 cells were grown at 24°C with 5% CO₂ in Eagles Minimal Essential Medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate 90%, and 1.5 g/L sodium bicarbonate. The medium was changed every two days.

Cells were cotransfected (in triplicate) in 24-well plates with 1 µg of different *cx43* promoter constructs (Table 3) and 100 ng of *Renilla* (transfection control) using lipofectamine. Cells were grown with 0.5 ml of fresh growth medium before transfection. After 24 h, medium was removed and cells were washed with PBS. Cells were lysed directly in the plate using 200 µl of Passive Lysis Buffer (Promega Corporation, Madison, WI). Firefly and *Renilla* luciferase activity in a 20 µl aliquot were determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega). Relative luciferase activity was expressed as the ratio of firefly to *Renilla* activity.

Results

cx43 promoter sequence

We isolated, cloned, and sequenced a 607 bp fragment of the brook trout *cx43* promoter containing the untranslated sequence. The sequence, including a 592 bp upstream fragment of the translation start codon, is shown in Fig. 1. The TATA box was predicted using the Proscan software (Version 1.7) and is located between position -36 to -30. A large number of transcription

factor binding sites (67 different sites) were identified using the TRANSFAC software (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>).

RACE-PCR results

RACE experiments were done using the RACE-PCR kit 5' specific primer and two specific brook trout 3' primers (Cx43R1, and Cx43RC1) in two separate reactions. Two products with a difference in size of 361 bp (594 bp and 233 bp) were purified, and sequenced successfully (Fig. 2A; lanes 5 and 6 respectively). PCR products from each reaction were sequenced (Fig. 2B). Transcription start site was determined to be a guanine at the junction of the genomic sequence and the BD SMART II A oligonucleotide (position 537; Fig. 2B arrow).

EMSA results

To determine if nuclear proteins specifically bind to the C/EBP and *tr-beta* consensus sequences of the *cx43* promoter, we performed EMSA using two oligonucleotides (BtC/EBP and BtT3R; Table 3) spanning the -173 to -143, and -123 to -93 regions respectively. BtC/EBP (position -173 to -143) contains the putative binding site of C/EBP, while BtT3R (position -123 to -93) contains the *tr-beta* binding site. Nuclear proteins from brook trout testes specifically bound to both the BtC/EBP and BtT3R double-stranded oligonucleotides (Fig. 3). Nuclear proteins out competed with double-stranded oligonucleotides and did not bind mutated oligonucleotides. Supershift assays could not be performed as specific antibodies to fish C/EBP and *tr-beta* are not available.

GvAdapter

ACTATAGGGCACOCCTGGTCGACGGCCCGGCTGGTCTGTACATTCAA -462

TGAAACATGGTGGAGCCCCAAAAATTGCCCTCGCTGGAAGCCTGTGTTT -413

CAGACATAAGGAAGTGGATGGCTGAAGACGTTCTACTTTAAACTCGGA -364

CAAAACAGAGATGCTTGTCTAGGTCCAAGAAACAAAGAGAACTTCT -316

GTTGAATCTGACAATTAAATCTTGATGGTTGTAAGTCGTCTCAAATAAA -267

ACTGTGAAGGACCTCGCGTTACTCTTGACCCCTGATCTCTATTGACGAA -218

CATATCAAAGACTGTTCAAGGACAGCTTTTCCATCTACGTAACATTGC -168

C/EBP

IR-beta

AAAAATCAGAAACTTCTGTCCAAAAATGATGCAGAAAAATGAATCCA -120

TGCTTTCTTACTTCTAGGTTAGACTACTGCAATGCTCTACTTCCGGCT -70

ACCCGGATAAAGCACTAAATAACTCAGTTAGCTTAAATACGGCTGC -21

TATA box

TAGAACCTGACTAGAACCCAGAAATTATCATATTACTCAGTGCTAG → 28

CCTCCCTACACTGGCTTCCTGTTAAGGCAAGGGCTGATTCAAGGTCA 77

B_x3R

GGCTTACTCCAGGGCTGGAAGGGCAATTCTGCAGATATCCATCACAC 126

TGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCAATT_{CG} 163

Figure 1: Schematic representation of the *cx43* promoter. Primers used to produce the three deletion constructs for the reporter gene experiment are underlined.

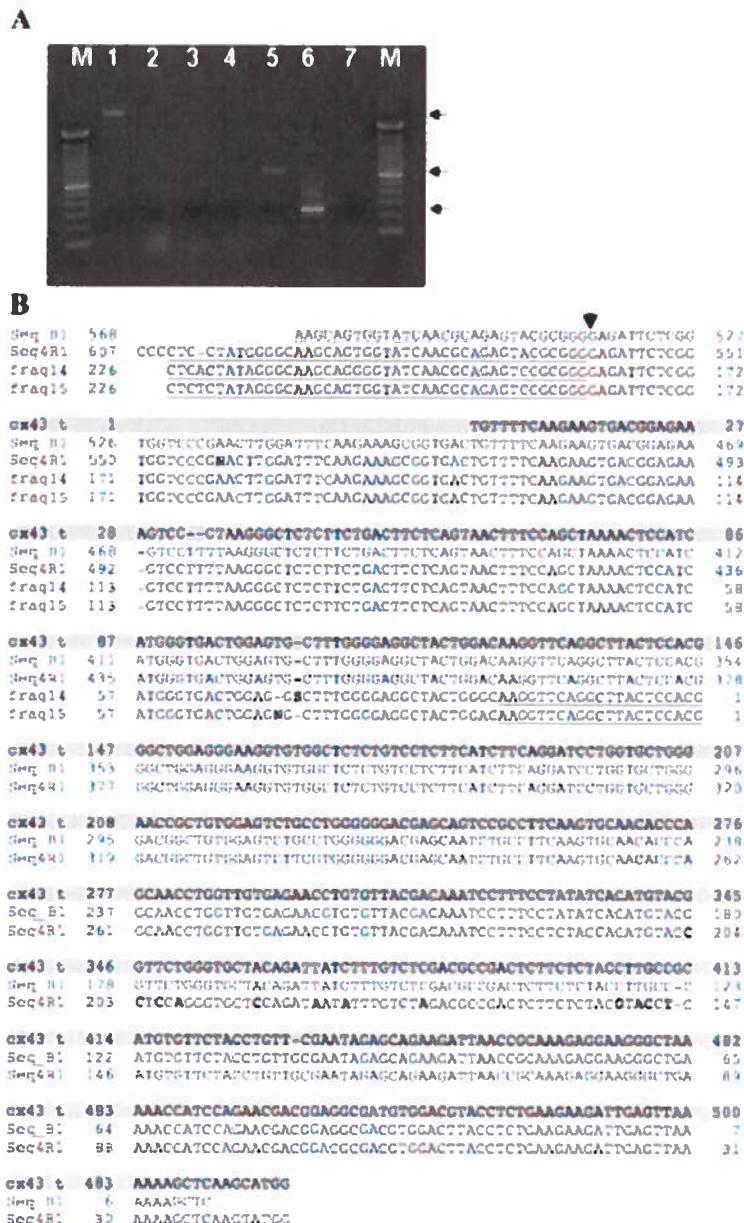


Figure 2: Determination of the *cx43* gene transcription start site by RACE. A) Amplification products of 594 bp and 233 bp were obtained using Cx43R1 and Cx43RC1 respectively as the specific primer (lanes 5 and 6). Human transferrin was used as a positive control for the 5'RACE reaction and produced a 2.6 kb amplicon, as predicted (lane 1). Non-contamination by genomic DNA was tested (lane 2). A water control was included for each primer (lane 3, Cx43R1; lane 4, Cx43RC1; lane 7, 5'-CDS primer). B) Sequences of the cloned 594 bp (Seq_B1, and Seq4R1), and 233 bp (Seq14, and Seq15) RACE products, and *cx43* mRNA rainbow trout sequence. The 3' gene-specific primers and the 5' BD SMART II A oligonucleotide are underlined. The transcriptional start site is indicated by arrow, and sequencing artefacts are indicated in bold.

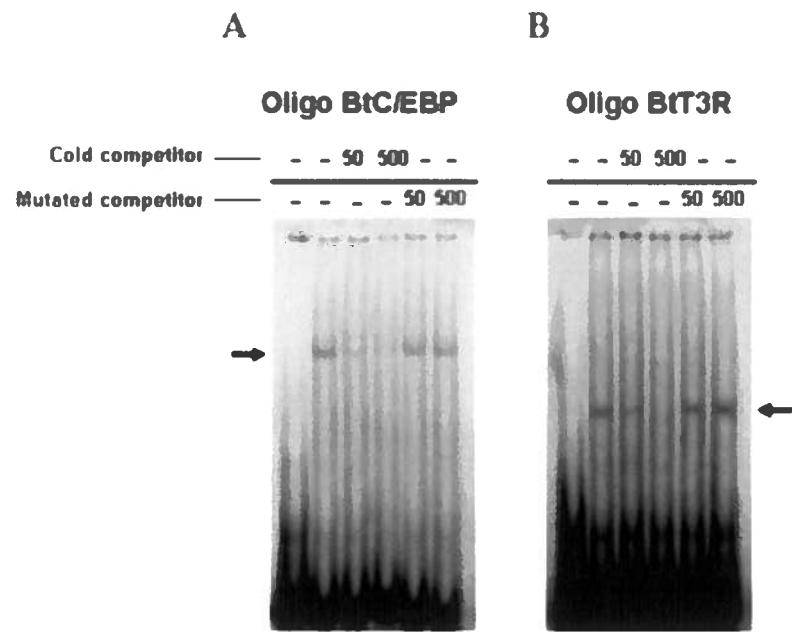


Figure 3: EMSA on the promoter region of the *cx43* gene containing the C/EBP binding site (A) and the *tr-beta* binding site (B). Radiolabeled oligonucleotides were incubated with 30 μ g of nuclear extract from brook trout testis. For competition studies, nuclear extracts were preincubated with 50- or 500-fold molar excess of unlabeled competitor or mutated competitor. Specific shifts are indicated by arrows.

cx43mRNA and tr-beta expression in the RTG-2 cell line

PCR amplifications were done to assess the presence of *cx43* and *tr-beta* by RTG-2 cells. Results indicate that RTG-2 cells expressed transcripts for both *cx43* (Fig. 4A) and *tr-beta* (Fig. 4B).

Experiments were conducted with RTG-2 cells to assess whether the C/EBP and *tr-beta* binding sites could transactivate the *btcx43* promoter. RSV-luciferase was used as a positive control and presented the highest luciferase activity. To determine if cAMP regulated the expression of *cx43*, we performed experiments in which RTG-2 cells transfected with the *cx43* constructs were incubated with increasing concentrations of cAMP (0, 25, 50, and 100 ng/ml). Three different *cx43* promoter constructs were used: the -91 constructs did not contain C/EBP or *tr-beta* binding sites; the -158 constructs contained only the *tr-beta* site; and the -431 constructs contained both *tr-beta* and C/EBP sites. No transactivation was observed with the -158 and -91 constructs when compared to the empty vector (Fig. 5A). The -431 construct, which contains the C/EBP binding element, was significantly transactivated with 50 and 100 ng/ml of cAMP, suggesting that cAMP enhances the *cx43* promoter in brook testis.

To assess whether T₃ also regulates trout *cx43* expression, RTG-2 cells were exposed to different concentrations of T₃ (0, 19, 194, and 370 nM) and luciferase assays were conducted. Three different constructs were done: -91 did not contain C/EBP or *tr-beta* binding sites, -158 constructs contained only *tr-beta* binding sites, and -431 constructs contained both *tr-beta* and C/EBP sites. The -91 construct did not present any transactivation while the -158 and -431 constructs showed a significant dose-response transactivation with increasing T₃ concentrations (Fig. 5B).

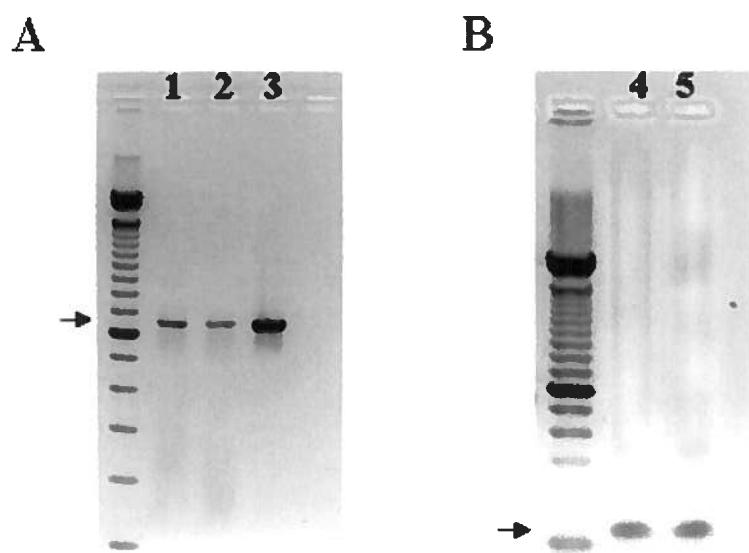


Figure 4: Identification by RT-PCR of *cx43* (A) and *tr-beta* (B) expression in the RTG-2 cell line. 1, 2, and 4: samples from the RTG-2 cell line; 3 and 5: positive controls from brook trout testes.

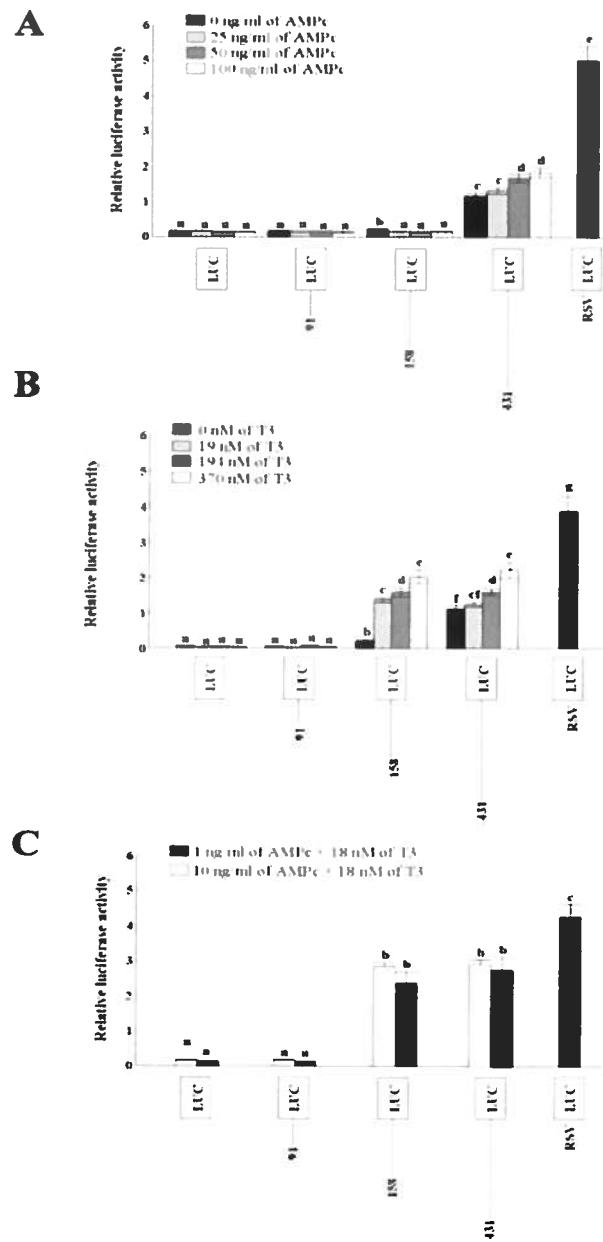


Figure 5: Relative luciferase activity of sequential deletion constructs of the *cx43* promoter. Sequential portions of the *cx43* gene 5' UTR were PCR amplified and directionally inserted in the pGL3-Basic vector. RTG-2 cells were transfected with each construct and with the phRL-TK vector to normalize for transfection efficiency. Cells were incubated for 24 h with different concentrations of cAMP (A), T3 (B), or cAMP and T3 (C), and the firefly and *Renilla* luciferase activities were measured. Data are expressed as the ratio of firefly to *Renilla* luciferase activity. Different letters indicate significantly different means ($\alpha < 0.05$; mean \pm SEM, $n = 3$).

cAMP and T₃ were added simultaneously to the medium to assess potential additive effects. While the -91 construct did not present any activation at all, an increase in transactivation of the -158 and the -431 constructs was observed (Fig. 5C). However, in these two constructs, no changes in transactivation levels were noted relative to the cAMP doses. These observations suggest that there is no additive effect between cAMP and T₃.

To demonstrate that the 5'cAMP binding site was responsible for the transactivation of the *cx43* product, we mutated the C/EBP binding element in the -431 construct. The insertion of the mutation was confirmed by sequencing. Transfection of the mutated -431 construct into the RTG-2 cells with the addition of 100 ng/ml of cAMP resulted in a 30-fold loss in luciferase activity as compared to wild-type constructs (Fig. 6A). This supports the notion that this C/EBP binding site is necessary for *cx43* promoter activity.

To assess if the 5' *tr-beta* binding site was involved in the transactivation of the *cx43* gene, we mutated the -158 and the -431 constructs that contain the thyroid response element. The insertion of the mutation was confirmed by sequencing. RTG-2 cells transfected with the mutated construct were exposed to 370 nM of T₃. This resulted in a 5-fold loss in luciferase activity compared to wild-type constructs (Fig. 6B). Transfection of the -431 constructs from C/EBP mutated binding sites into RTG-2 cells resulted in a 28% increase of luciferase activity, whereas transfection with the -431 constructs from mutated *tr-beta* binding sites induced a 57% decrease in luciferase activity. These results confirmed that this *tr-beta* binding site is required for *cx43* promoter activity in brook trout testis.

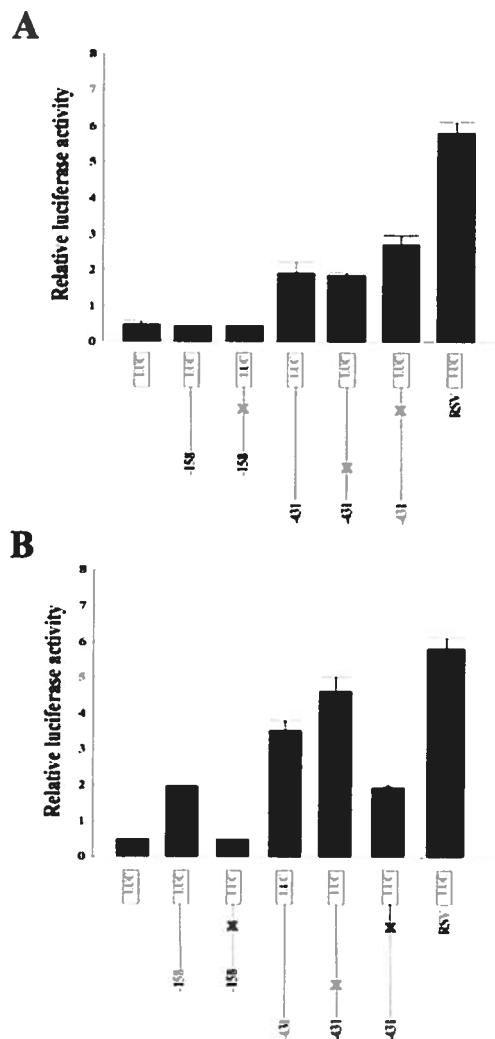


Figure 6: Relative luciferase activity of the different *cx43* promoter constructs mutated at the C/EBP or tr-beta binding sites. RTG-2 cells were transfected with the wild-type construct or with the clones mutated along with the phRL-TK vector to normalize for transfection efficiency. A pGL3-basic empty vector and the pRSV-L plasmid were used as negative and positive controls, respectively. Cells were incubated for 24 h with 100 ng/ml of cAMP (A) or 370 nM of T3 (B) and the firefly and *Renilla* luciferase activity was measured. Data are expressed as a ratio of firefly to *Renilla* luciferase activity (mean \pm SEM, n = 2).

Discussion

Previous studies from our laboratory have demonstrated that Cx43 is localized between Sertoli cells and along the plasma membrane of spermatogonia in both rainbow and brook trout (de Montgolfier et al., 2007; 2008). Cx43 protein levels increase at the onset of spermatogenesis, and this protein is expressed at all stages of spermatogenesis. *In vitro* experiments show that *cx43* mRNA levels were not regulated by androgens, but rather by cAMP and T₃ (de Montgolfier et al., 2009).

The *cx43* promoter has been studied in zebrafish, and its analysis revealed a high degree of conservation with mouse and human *Cx43* promoter (Chatterjee et al., 2001). The *btcx43* promoter did not have a high degree of similarity with zebrafish, mouse, or human *Cx43* promoter. Proscan analysis identified a TATA box between position -36 and -30, and 67 different potential binding sites were identified. The 592 bp sequence obtained by RACE experiments was aligned with reported rainbow trout *cx43* mRNA sequence (DQ204869, 1285 bp). Sequence similarity suggests that the transcript is the brook trout *cx43* mRNA (93% of sequence similarity). The transcriptional start site for the *btcx43* gene in the testis was shown to be a guanine. Previous studies on the *cx43* gene in zebrafish showed that a potential alternative transcript was synthesized as a result of multiple transcription start sites (Chatterjee et al., 2005); this does not appear to be the case for *cx43* in brook trout testis where there was a single transcriptional start site. These results are similar to those reported by Etchetebu el al. (1999) in mouse and human.

Transfection experiments with luciferase reporter gene constructs indicate that the *btcx43* promoter region contained sufficient sequence information to drive the expression of the reporter gene in the RTG-2 cell line. We observed different levels of transactivation when sequential deletions were done, suggesting that the C/EBP and *tr-beta* binding sites may regulate *cx43* transcription in brook trout testis.

Because we had previously shown that cAMP and T₃ were major regulators of *cx43* in brook trout testes, we decided to focus exclusively on the regulation of *cx43* by these two factors. The C/EBP binding site is located between positions -163 and -154 and the *tr-beta* site between -111 and -106 on the *cx43* brook trout promoter. The minimal promoter region of the *cx43* gene was located between -91 and +64 from the transcriptional start and did not show any increase in transactivation activity during luciferase assays compared to the empty vector. This suggests that even though other transcription factor binding sites were predicted in this region of the promoter, these sites were not able to induce transactivation. Promoter constructs (-158 and -431) containing the *tr-beta* binding site showed transactivation when T₃ was added to the medium. T₃ binds to a nuclear receptor that acts as a DNA-binding transcription factor (Oetting and Yen, 2007). According to the nature of the TRES, gene expression may be enhanced or inhibited (Wu and Koenig, 2000). In fact, the absence of ligand induces the recruitment of co-repressor proteins like N-Cor and SMRT, and the bound receptor generally acts as a repressor. However, TR changes its conformations when ligand binds; there is replacement of the corepressor complex by co-activator proteins, which in turn activate transcription of the target gene (Power et al., 2001). Activation of *Cx43* expression by T₃ has been observed in rat liver (Stock et al., 1998; Stock and Sies, 2000) and more recently in rat Sertoli cells, where Gilleron et al. (2006) demonstrated that *Cx43* is a T₃ target gene. Our results confirm that *cx43* is a T₃ target gene, as in rat testis, and demonstrate that *cx43* is directly regulated by T₃, which binds to *tr-beta* and increases *cx43* transcription. This indicates that T₃ regulation of *cx43* is highly conserved during evolution and likely represents a critical regulatory mechanism.

Several studies have shown *Cx43* up-regulation in different cell types by agents increasing intracellular concentrations of cAMP (Flagg-Newton et al., 1981; Kessler et al., 1984; Banoub et al., 1996; Matesic et al., 1996; Yao et al., 2006). C/EBP, a cAMP binding site family, is

composed of six different members (C/EBP α , -b, -g, -d, -e, -z) and regulates the expression of genes involved in cell division, growth, and differentiation in a variety of tissues. cAMP has been shown to inhibit *Cx43* expression in rat Leydig cells (You et al., 2000). Studies have also demonstrated that cAMP can regulate *Cx43* levels in Novikoff hepatoma cell lines and osteocytes (Paulson et al., 2000; Cherian et al. 2003). Since previous studies have suggested that FSH and T₃ could be implicated in *cx43* expression, we decided to focus on these compounds; however, our analysis demonstrated that the *cx43* promoter does not only contain C/EBP and *tr-beta* binding sites. These results suggest that *cx43* activation is not dependent on one or two factors but is likely more complex. In mammals, studies have identified different activation factors, e.g., AP-1, SP-1, SP-3, and c-jun, on the *Cx43* promoter in humans and rats (Echetebu et al., 1999; Fernandez-Cobo et al., 2001; Teunissen et al., 2003). Chatterjee et al. (2005) sequenced the *cx43* gene in zebrafish and observed a high degree of sequence conservation with several transcription factor motifs in mouse.

This is the first study to report that C/EBP and *tr-beta* act on the *btcx43* promoter to regulate the transcriptional activation of this gene. Moreover, *in vitro* experiments showed that cAMP and T₃ binding sites enhanced *cx43* mRNA levels in RTG-2 cells. However, we did not observe any additive effects of cAMP and T₃. It has been shown that T₃ can enhance gonadotropin-induced steroidogenesis in the ovarian follicles of rainbow trout (Cyr and Eales, 1989). As already shown in *in vitro* testis tubule cultures (de Montgolfier et al., 2009), T₃ did not increase cAMP-induced *cx43* mRNA levels. The regulation of *cx43* by these factors is likely independent of one another and appears to be inducible to maximal levels by having only one of these factors present.

This study clearly demonstrates that C/EBP and *tr-beta* activate the *cx43* mRNA expression. *cx43* activation at the beginning of spermatogenesis, as observed in a previous study

(de Montgolfier et al., 2009), could be linked to increases in T₃ and cAMP levels due to increased levels of FSH. Further experiments will be required to determine if other factors are also involved in the regulation of the *cx43* transcription in the salmonid testis.

Acknowledgments

The authors thank Dr. P.J. Devine and Dr. T. Sanderson (INRS-Institut Armand-Frappier) for the use of their air incubators used during our *in vitro* experiment. Julie Dufresne (INRS-Institut Armand-Frappier) is thanked for her helpful suggestions and technical assistance.

REFERENCES

- Banoub RW, Fernstrom M, Malkinson AM, Ruch RJ. 1996. Enhancement of gap junctional intercellular communication by dibutyryl cyclic AMP in lung epithelial cells. *Anticancer Res* 16:3715-3719.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. 1990. Connexin family of gap junction proteins. *J Membrane Biol* 116:187-194.
- Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR. 2003. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology* 144:3722-3731.
- Chatterjee B, Chin AJ, Valdimarsson G, Finis C, Sonntag JM, Choi BY, Tao L, Balasubramanian K, Bell C, Krufka A, Kozlowski DJ, Johnson RG, Lo CW. 2005. Developmental regulation and expression of the zebrafish connexin43 gene. *Dev Dyn* 233:890-906.
- Chatterjee B, Li YX, Zdanowicz M, Sonntag JM, Chin AJ, Kozlowski DJ, Valdimarsson G, Kirby ML, Lo CW. 2001. Analysis of Cx43 α 1 promoter function in the developing zebrafish embryo. *Cell Commun Adhes* 8:289-292.

Cherian PP, Cheng B, Gu S, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX. 2003. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. *J Biol Chem* 278:43146-43156.

Civitelli R, Ziambaras K, Warlow PM, Lecanda F, Nelson T, Harley J, Atal N, Beyer EC, Steinberg TH. 1998. Regulation of connexin43 expression and function by prostaglandin E2 (PGE2) and parathyroid hormone (PTH) in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 68:8-21.

Cyr DG, Eales JG. 1989. T3 enhancement of in vitro estradiol-17 beta secretion by oocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, is dependent on cAMP. *Fish Physiol Biochem* 6:255-259.

Cyr DG, Eales JG. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine system in fish. *Rev Fish Biol Fish* 6:165-200.

de Montgolfier B, Audet C, Marcogliese DJ, Fournier M, Cyr DG. 2008. Influence of municipal effluents on the expression of connexins in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) testis. *Aquat Tox* 86:38-48.

de Montgolfier B, Dufresne J, Letourneau M, Nagler J, Fournier A, Audet C, Cyr DG. 2007. The expression of multiple connexins throughout spermatogenesis in the rainbow trout testis suggests a role for complex intercellular communication. *Biol Reprod* 76:2-8.

de Montgolfier B, Faye A, Audet C, Cyr DG. 2009. Seasonal variations in testicular connexin levels and their regulation in the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. Gen Comp Endocrinol 162: 276-285.

Dowling-Warriner CV, Trosko JE. 2000. Induction of gap junctional intercellular communication, connexin43 expression, and subsequent differentiation in human fetal neuronal cells by stimulation of the cyclic AMP pathway. Neuroscience 95:859-868.

Dufresne J, Cyr DG. 2007. Activation of an SP binding site is crucial for the expression of claudin 1 in rat epididymal principal cells. Biol Reprod 76:825-832.

Eastman SD, Chen TH, Falk MM, Mendelson TC, Iovine MK. 2006. Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes. Genomics 87:265-274.

Echetebu CO, Ali M, Izban MG, MacKay L, Garfield RE. 1999. Localization of regulatory protein binding sites in the proximal region of human myometrial connexin 43 gene. Mol Hum Reprod 5:757-766.

Fernandez-Cobo M, Stewart D, Drujan D, De Maio A. 2001. Promoter activity of the rat connexin 43 gene in NRK cells. J Cell Biochem 81:514-522.

Flagg-Newton JL, Dahl G, Loewenstein WR. 1981. Cell junction and cyclic AMP: 1. Upregulation of junctional membrane permeability and junctional membrane particles by

administration of cyclic nucleotide or phosphodiesterase inhibitor. *J Membrane Biol* 63:105-121.

Gilleron J, Nebout M, Scarabelli L, Senegas-Balas F, Palmero S, Segretain D, Pointis G. 2006. A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of Sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol* 209:153-161.

Holsberger DR, Cooke PS. 2005. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res* 322:133-140.

Holsberger DR, Jirawatnotai S, Kiyokawa H, Cooke PS. 2003. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology* 144:3732-3738.

Jones I, Rogers SA, Kille P, Sweeney GE. 2004. Molecular cloning and expression of thyroid hormone receptor α during salmonid development. *Gen Comp Endocrinol* 135:345-357.

Kessler JA, Spray DC, Saez JC, Bennett MV. 1984. Determination of synaptic phenotype: insulin and cAMP independently initiate development of electrotonic coupling between cultured sympathetic neurons. *Proc Natl A Sci USA* 81:6235-6239.

Liu YW, Lo LJ, Chan WK. 2000. Temporal expression and T3 induction of thyroid hormone receptors $\alpha 1$ and $\beta 1$ during early embryonic and larval development in zebrafish, *Danio rerio*. *Mol Cell Endocrinol* 159:187-195.

Marchand O, Safi R, Escriva H, Van Rompaey E, Prunet P, Laudet V. 2001. Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. *J Mol Endocrinol* 26:51-65.

Matesic DF, Hayashi T, Trosko JE, Germak JA. 1996. Upregulation of gap junctional intercellular communication in immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons by stimulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroendocrinology* 64:286-297.

Oetting A, Yen PM. 2007. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res* 21:193-208.

Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, TenBroek E, Atkinson MM, Walseth TF, Johnson RG. 2000. Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J Cell Sci* 113:3037-3049.

Plante I, Charbonneau M, Cyr DG. 2002. Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. *Carcinogenesis* 23:1243-1249.

Plante I, Cyr DG, Charbonneau M. 2007. Sexual dimorphism in the regulation of liver connexin32 transcription in hexachlorobenzene-treated rats. *Toxicol Sci* 96:47-57.

Pointis G, Segretain D. 2005. Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends Endocrinol Metab* 16:300-306.

Power DM, Llewellyn L, Faustino M, Nowell MA, Bjornsson BT, Einarsdottir IE, Canario AV, Sweeney GE. 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 130:447-459.

Risley MS, Tan IP, Roy C, Saez JC. 1992. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci* 103:81-96.

Romanello M, Moro L, Pirulli D, Crovella S, D'Andrea P. 2001. Effects of cAMP on intercellular coupling and osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Com* 282:1138-1144.

Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK, Kidder GM. 2001. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 65:829-838.

Schiller PC, Roos BA, Howard GA. 1997. Parathyroid hormone up-regulation of connexin 43 gene expression in osteoblasts depends on cell phenotype. *J Bone Miner Res* 12:2005-2013.

St-Pierre N, Dufresne J, Rooney AA, Cyr DG. 2003. Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. *Biol Reprod* 68:1232-1240.

Stock A, Sies H. 2000. Thyroid hormone receptors bind to an element in the connexin43 promoter. *Biol Chem* 381:973-979.

Stock A, Sies H, Stahl W. 1998. Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones. *Biochem Pharmacol* 55:475-479.

Swapna I, Rajasekhar M, Supriya A, Raghuveer K, Sreenivasulu G, Rasheeda MK, Majumdar KC, Kagawa H, Tanaka H, Dutta-Gupta A, Senthilkumaran B. 2006. Thiourea-induced thyroid hormone depletion impairs testicular recrudescence in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp Biochem Physiol* 144:1-10.

TenBroek EM, Lampe PD, Solan JL, Reynhout JK, Johnson RG. 2001. Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. *J Cell Biol* 155:1307-1318.

Teunissen BE, Jansen AT, van Amersfoorth SC, O'Brien TX, Jongsma HJ, Bierhuizen MF. 2003. Analysis of the rat connexin 43 proximal promoter in neonatal cardiomyocytes. *Gene* 322:123-136.

Wu Y, Koenig RJ. 2000. Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* 11:207-211.

Yao J, Kitamura M, Zhu Y, Meng Y, Kasai A, Hiramatsu N, Morioka T, Takeda M, Oite T. 2006. Synergistic effects of PDGF-BB and cAMP-elevating agents on expression of connexin43 in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:1083-1093.

You S, Li W, Lin T. 2000. Expression and regulation of connexin43 in rat Leydig cells. *J Endocrinol* 166:447-453.

TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION ET CONCLUSIONS

TROISIÈME PARTIE, SECTION 1 : DISCUSSION

Chacun des chapitres précédents inclue une discussion des résultats qui y sont présentés. La présente discussion ne se veut pas une répétition ou une traduction d'éléments déjà disponibles dans la thèse, mais au contraire se veut une réflexion plus générale sur l'ensemble du projet.

Très peu d'études ont été réalisées jusqu'à présent sur le rôle particulier des Cxs dans la spermatogenèse. Celles-ci ont été majoritairement réalisées sur la souris ou le rat et celles effectuées chez les poissons ne présentent aucune donnée quant à leur régulation durant la spermatogenèse. Il faut tout de même souligner que les conclusions des études effectuées chez les poissons suggèrent, comme chez les mammifères, un rôle important des Cxs dans la maturation des gonades, tant au niveau de la multiplication que de la différenciation des cellules germinales et somatiques. Les quatre articles présentés dans le cadre de cette thèse de doctorat constituent donc une contribution tout à fait originale et posent les premiers jalons de l'acquisition de connaissances sur cet aspect de la régulation de la spermatogenèse chez ce groupe de vertébrés. Cette discussion générale porte donc plus particulièrement sur les différentes perspectives de recherche qui pourraient faire suite aux travaux présentés dans cette thèse.

1.1 Combien de Cxs testiculaires ?

Les amorces dégénérées, correspondant à des séquences communes de deux familles de connexines α et β , ont permis d'identifier uniquement quatre Cxs dans les testicules de truite arc-en-ciel et d'omble de fontaine. Les alignements de séquences entre les différentes Cxs de truite

arc-en-ciel avec celles de mammifères et d'autres espèces de poissons ont permis d'utiliser deux anticorps commerciaux. La Cx43 de truite possède 33,2% de similarité avec la CX43 de souris, mais cette similitude n'est pas également répartie sur toute la séquence. En effet, on observe une très forte similarité dans la partie C-terminale des deux protéines, ce qui nous a conduit à pouvoir utiliser un anticorps commercial qui identifie cette région. Pour la Cx43.4 de truite, l'alignement de séquence a montré une similitude quasi-parfaite avec la Cx43.4 de poisson zèbre ; c'est pourquoi nous avons pu utiliser le même anticorps que celui identifiant spécifiquement la Cx43.4 de poisson zèbre. En revanche, la Cx30 et la Cx31 ne présentaient pas de réelles similarités de séquences avec d'autres espèces. Afin de mettre au point des anticorps spécifiques dirigés contre ces Cxs, nous avons effectué des tests d'hydropathie pour identifier les régions extramembranaires des Cxs ; puis nous avons synthétisé un peptide correspondant à une partie de cette région pour chacune des deux Cxs. Ces peptides ont ensuite été injectés dans des lapins qui ont produit des anticorps dirigés contre ces peptides. Cela nous a donc permis de pouvoir utiliser des anticorps spécifiques pour localiser et observer les variations des Cx43, Cx43.4, Cx30 et Cx31 chez l'omble de fontaine.

La littérature rapporte pourtant l'existence de 20 connexines différentes chez les mammifères, dont 11 uniquement dans le testicule (Pointis *et al.* 2005; Pointis et Segretain 2005). De plus, une étude portant sur la comparaison des génomes de souris, humain et du poisson zèbre, indique l'existence de 37 Cxs chez le poisson zèbre (Eastman *et al.* 2006). Cette dernière espèce possèderait en outre des Cxs spécifiques qui ne peuvent être comparées avec d'autres déjà identifiées chez les mammifères. Sachant que nous n'en avons identifié que quatre exprimées dans les gonades de truite arc-en-ciel et d'omble de fontaine, on peut s'interroger sur le pourquoi d'un si petit nombre de Cxs exprimées dans les testicules de salmonidés. En effet, plusieurs études rapportent la présence de jonctions lacunaires au niveau des cellules de Sertoli, de Leydig

et des cellules germinales (à l'exception des spermatozoïdes) chez les mammifères (Pointis *et al.* 2005; Pointis et Segretain 2005). La localisation spécifique des quatre Cxs étudiées suggère, au regard des études publiées chez les mammifères et au nombre de Cxs anticipé chez le poisson zèbre, que d'autres types de Cxs devraient être présentes dans le testicule de salmonidé. D'ailleurs, Batlouni *et al.* (2005) ont identifié la Cx32 dans le testicule de poisson chat au niveau des cellules germinales. Ce qui conforte l'hypothèse que d'autres Cxs pourraient être impliquées dans la régulation de la synchronicité du processus de spermatogenèse dans le testicule de poisson. Des études ultérieures s'avèrent nécessaires afin d'obtenir des informations supplémentaires sur l'expression possible d'autres Cxs et notamment au niveau des spermatides, où la présence de Cxs a été détectée chez différentes espèces de mammifères (Pointis *et al.* 2005).

1.2 Les Cxs, marqueurs précoce de maturation

L'étude réalisée durant toute la période de maturation des gonades montre clairement une expression spécifique des différentes Cxs au cours du processus de spermatogenèse. De plus, les travaux réalisés à la station de traitement des eaux usées de Montréal démontrent non seulement une expression spécifique des Cxs, mais une élévation des niveaux d'ARNm de *cx43* et *cx31*, précédant tout changement histologique chez des individus qui débutent leur spermatogenèse. Enfin, les résultats, obtenus durant la deuxième partie section 3, renforcent l'hypothèse que les Cxs jouent un rôle dans la régulation de la spermatogenèse, bien que ce rôle reste à définir. En effet, en comparant deux souches d'omble de fontaine dont les taux de maturation des gonades sont significativement différents à 1⁺, nous avons noté que le groupe caractérisé par un plus fort pourcentage de maturation précoce présentait des niveaux protéiques de Cx43, Cx43.4 et Cx31

significativement supérieurs par rapport aux individus du groupe présentant peu de maturation sexuelle précoce.

En combinant ces résultats avec ceux obtenus lors de l'exposition des ombles de fontaine aux effluents municipaux, on remarque dans les deux cas que l'initiation de la spermatogenèse est accompagnée par l'augmentation des niveaux de *cx43*, *cx43.4* et *cx31*, que ce soit au niveau de l'ARNm pour *cx43* et *cx31* (dans le cas de l'exposition aux effluents municipaux) qu'au niveau protéique pour les trois Cxs (dans le cas de l'expérience entre deux souches différentes). Les résultats obtenus dans les chapitres 2 et 3 suggèrent que l'augmentation d'expression des Cx43 et Cx43.4 chez l'omble de fontaine pourrait être un bon indicateur de la maturation des gonades, et plus particulièrement du déclenchement de la spermatogenèse.

1.3 Le rôle essentiel des Cxs dans la spermatogenèse

Un des objectifs principal de cette thèse était d'étudier les Cxs dans le testicule de salmonidé afin de comprendre dans un premier temps, leur place dans la spermatogenèse, puis de savoir si elles pouvaient être utilisées comme marqueurs de maturation. De part leur expression et leur localisation spécifique, les quatre Cxs identifiées chez la truite arc-en-ciel puis chez l'omble de fontaine semblent être indispensables au bon déroulement de la spermatogenèse. Lorsqu'on compare la localisation des Cxs dans les testicules de souris et de rat avec celle observée chez la truite et l'omble, on note certaines similitudes (Tableau 1).

Tableau 1: Similitudes de localisation entre les Cxs de truite et les Cxs de mammifère dans le testicule.

Cxs de truite	Cxs de mammifère	Localisation
Cx43	Cx43	Cellules de Sertoli; Spermatogonies
Cx43.4	Cx31	Spermatogonies, Spermatocytes I etII
Cx30	Cx43; Cx30.2	Cellules de Leydig
Cx31	Cx37	Endothélium des vaisseaux sanguins

Des études sur le rôle de la *Cx43* dans le testicule de mammifères ont montré que sa présence était essentielle à la réalisation complète du processus de spermatogenèse. Sridharan *et al.* (2007) ont observé chez la souris, en inhibant l'expression de CX43 au niveau des cellules de Sertoli, que les individus mutés ne présentaient pas de différenciation des cellules de Sertoli. De plus, si le développement de spermatogonies a pu être noté, aucune différenciation en spermatocytes ou en tout autre type de cellule germinale n'a été observée indiquant à nouveau l'importance primordiale de la CX43 dans la régulation de la spermatogenèse. L'étude montre également que l'action de la CX43 se situe au niveau des cellules de Sertoli dont elle activerait la différenciation, permettant ainsi la prise en charge par celles-ci de la différenciation et de la maturation des cellules germinales.

Pour la première fois, nous avons donc pu caractériser avec précision l'expression de différentes Cxs dans un testicule de poisson. Les seules études effectuées auparavant sur les Cxs de poissons étaient les travaux de Marina *et al.* (2002) sur l'analyse par microscopie électronique de testicules de raie torpille, *Torpedo marmorata*, et l'étude de Batlouni *et al.* (2005), toujours par microscopie électronique et immunobuvardages de type Western, de testicule de poisson chat, *Pseudoplatystoma fasciatum*. Si Marina *et al.* (2002) ont observé la présence de jonctions

lacunaires au niveau des cellules de Sertoli et suggéré la régulation de cette expression, Batlouni *et al.* (2005) ont, quant à eux, détecté la présence de Cx32 au niveau de la membrane des cellules de Sertoli, dans les spermatogonies et les spermatocytes de premier ordre situés à la base des tubules séminifères. Ces auteurs concluent que la présence de Cxs et de ponts intercellulaires faciliterait la synchronisation des cellules germinales lors de la spermatogenèse. Bien que n'ayant détecté que la Cx32, ils n'en ont pas moins suggéré la présence d'autres Cxs dans le testicule de poisson, ce que nos travaux viennent confirmer.

Par ailleurs, l'expérience d'exposition d'omble de fontaine à des effluents municipaux avait principalement pour but d'observer l'expression des Cxs avant la maturation des gonades (période de latence), ainsi qu'au tout début du processus en présence de perturbations d'origine anthropique. L'augmentation des niveaux de certaines Cxs dans le groupe exposé à 1% d'effluents municipaux est un résultat qui nous a surpris. Nous pensions, avant cette expérience, que les effluents municipaux auraient un effet inhibiteur augmentant avec leur concentration dans les bassins expérimentaux. Ce résultat soulève plusieurs hypothèses.

Premièrement, l'importance de la dose dans notre étude ; en effet, le seul effet significatif d'un impact des effluents sur la spermatogenèse se produit durant l'exposition à la concentration la plus faible ; ce qui correspond sur le terrain à la concentration d'effluents rencontrée à 10 km de la station. D'un point de vue écotoxicologique, cette étude démontre pour la première fois que les Cxs peuvent être la cible de polluants. De plus, on observe des effets alors que la vitellogénine hépatique n'est pas produite, ce qui suggère que des doses très faibles de perturbateurs endocriniens (trop faibles pour induire la production de vitellogénine) peuvent induire de telles variations; ou que les polluants impliqués ne sont pas d'origine oestrogénique. La mise au point d'un protocole de culture de tubules testiculaires *in vitro* devrait permettre d'apporter de nouvelles informations puisque cette technique permettrait de tester directement l'effet d'un ou

plusieurs produits sur l'expression des Cxs. Il s'agit là d'une suite plus écotoxicologique de ce projet.

Le second point important de cette étude a été que l'augmentation des niveaux de Cxs a précédé les changements histologiques ; nous avons déjà discuté de ce point dans la partie précédente, mais il reste à déterminer quelles places occupent les Cxs dans l'initiation de la spermatogenèse. Est-ce l'augmentation du niveau d'expression d'une ou plusieurs Cxs qui, favorisant la communication inter-cellulaire, permet la propagation des signaux de maturation ? Y a-t-il un autre signal, qui serait alors le véritable responsable de l'initiation de la spermatogenèse, envoyé par un autre tissu (ou un autre type cellulaire) qui activerait l'expression des Cxs, d'où découlerait ensuite tout le processus de maturation ?

Nous ne possédons pas de réponse précise à l'issue de ce projet ; cependant, il semble maintenant évident que la place des Cxs dans l'ensemble des processus de la spermatogenèse se situe en amont de la cascade de réactions. Enfin, nous ne savons pas quelles sont les conséquences à plus long terme de ces expositions. Rien dans nos résultats n'indique que les poissons exposés à 1% d'effluents municipaux achèveront leur maturation gonadique, ni qu'ils produiront des spermatozoïdes fonctionnels. De même, nous n'avons aucune indication sur la maturation gonadique que pourraient avoir les individus exposés aux plus fortes doses. Il faut préciser ici que le but de cette expérience était d'observer les variations des niveaux de Cxs lors de l'initiation de la spermatogenèse, afin de mieux cerner leur rôle dans ce phénomène et de pouvoir peut-être les utiliser en tant que marqueur de la maturation gonadique.

De nombreuses études portant sur les mammifères présentent la *Cx43* comme étant la principale Cx dans le testicule, que ce soit au niveau de son rôle biologique ou de sa quantité relative (Pointis et Segretain 2005). Les résultats obtenus lors du suivi de la maturation des gonades, ainsi que lors des expositions aux effluents municipaux indiquent effectivement que

chez l'omble de fontaine, la *cx43* semble jouer un rôle prépondérant lors de l'initiation de la maturation gonadique. Nous avons en effet constaté à chaque fois une augmentation des niveaux d'ARNm de *cx43* lors de l'initiation de la spermatogénèse. Pour cette raison, nous avons décidé de lui porter une attention plus particulière.

Les études, menées *in vitro* et décrites aux chapitres 3 et 4, ont permis d'identifier deux voies de signalisation qui activeraient l'expression de la *cx43* dans le testicule. Nous avons ainsi démontré que la GtH I via son second messager l'AMPc, et l'hormone thyroïdienne T₃ activeraient de façon significative l'expression de *cx43*. Des sites de fixation pour l'AMPc et le récepteur *beta* de l'hormone thyroïdienne ont été identifiés sur le promoteur de *cx43*. L'expérience par retardement sur gel de type EMSA (« *Electrophoresis Mobility Shift Assay* »), décrite au chapitre 4, a permis de vérifier la fixation de protéines nucléaires sur ces sites ; l'absence d'anticorps spécifiques pour ces protéines chez les salmonidés n'a malheureusement pas permis de confirmer la présence spécifique des protéines suspectées, c/EBP et *tr-beta*. Cependant, les essais luciférase nous ont permis d'observer la fonctionnalité des sites par transfection de différents fragments de promoteur de *cx43* dans une lignée cellulaire de cellules de gonades de truite arc-en-ciel, RTG-2.

Des études portant sur la régulation de la *Cx43*, réalisées chez les rongeurs, suggèrent que la *Cx43* serait régulée par les androgènes (Cyr *et al.* 1996; Huynh *et al.* 2001; Roscoe *et al.* 2001; Goldenberg *et al.* 2003). La 11-CT est l'androgène majeur chez les salmonidés (Mayer 1992). Cependant, les résultats, obtenus *in vitro* en culture de tubules séminifères, ne montrent aucune influence directe de la 11-CT sur les niveaux de *cx43*. En revanche, l'ajout d'AMPc ou d'hormones thyroïdiennes (T₃) induit une augmentation significative et dose-dépendante des niveaux d'expression de la *cx43*. À la différence des mammifères, il semblerait donc que la régulation de la *cx43* s'effectue par d'autres voies que celle des androgènes.

Une explication possible de l'utilisation de différentes voies de régulation pourrait être liée à la différence de mode de spermatogenèse entre certains mammifères (continu) et les salmonidés (annuel). En effet, à la différence des rongeurs qui ont une spermatogenèse continue, celle des salmonidés est saisonnière. Chez ces derniers, on observe des profils de sécrétion hormonale caractérisés par de très fortes variations saisonnières. Ainsi, les niveaux d'hormones stéroïdes sont très faibles, voire indétectables, en début de cycle reproducteur (stades I à III). Si la *cx43* est véritablement indispensable à l'initiation de la spermatogenèse, il est alors envisageable que son expression soit régulée par des facteurs plus fortement présents en début de cycle, comme la FSH (GtH I) et la T₃ (Figure 1).

Chez les mammifères, la CX43 est localisée au niveau de la membrane des cellules de Sertoli, mais aussi de celle des cellules de Leydig. Il est connu que ce sont les cellules de Leydig qui sont le siège de la production des hormones stéroïdes dans le testicule. Par contre, tel que nous l'avons démontré chez l'omble de fontaine, la Cx43 est localisée uniquement au niveau des cellules de Sertoli et nous avons observé que ses niveaux d'expression ne coïncidaient pas avec les niveaux d'androgènes. On peut donc poser la question sur le rôle d'une autre connexine, la Cx30, dans la régulation du processus de spermatogenèse. En effet, nos travaux montrent que, durant la spermatogenèse, celle-ci est localisée spécifiquement à la membrane des cellules de Leydig. Si les niveaux protéiques ne montrent pas un lien direct entre les niveaux d'androgènes et la Cx30 (voir les résultats de la deuxième partie, section 2), il est cependant tout à fait envisageable que les androgènes puissent agir sur son expression.

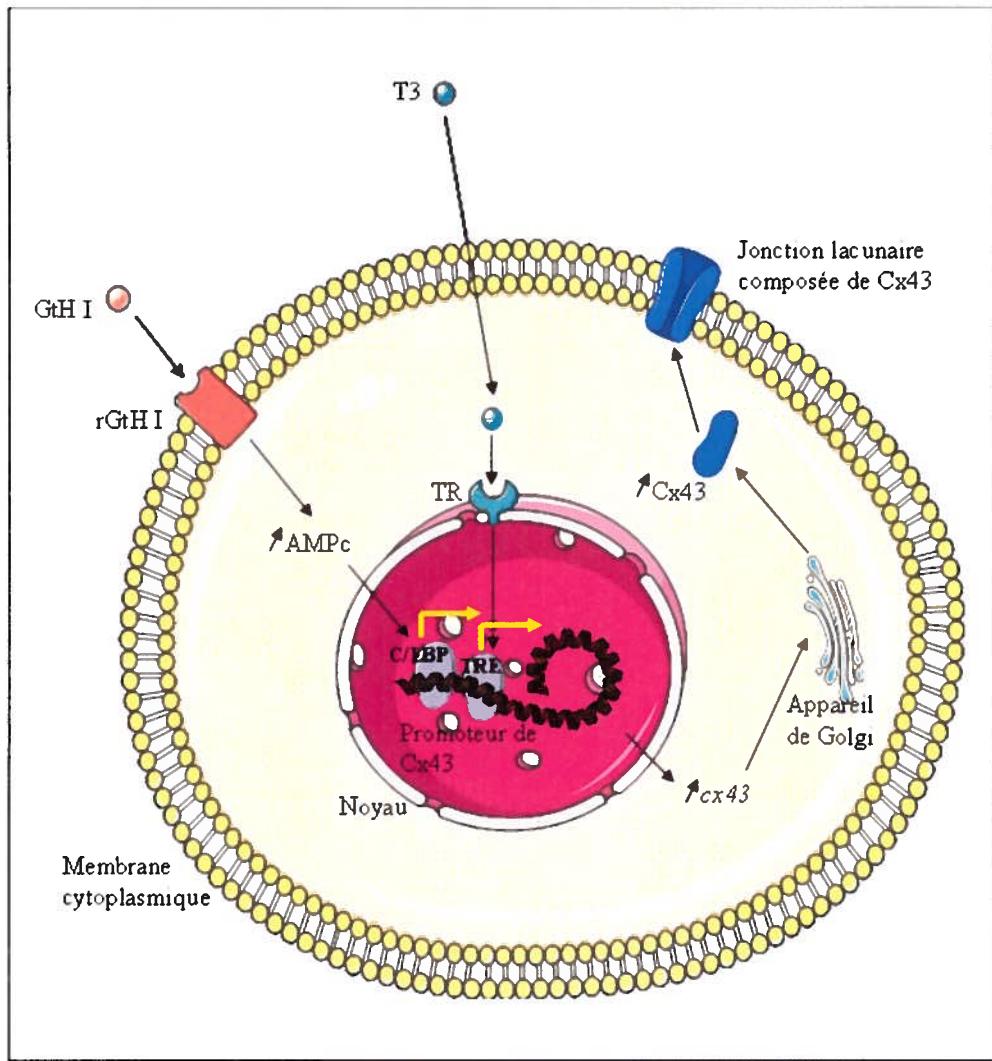


Figure 1: Activation de la synthèse de *cx43* en début de spermatogenèse dans les cellules de Sertoli. L'ensemble des différents chapitres de la thèse a permis de mettre en évidence 2 sites d'activation de *cx43*. Tout d'abord *via* la GtH I qui, en se fixant à son récepteur rGtH I, augmente la concentration d'AMPc qui va entraîner la fixation de protéine liée à l'AMPc sur le promoteur de *cx43* et activer ainsi sa transcription. La seconde voie d'activation s'effectue *via* les hormones thyroïdiennes. T₃ active son récepteur nucléaire (RHT) en se fixant dessus. Le récepteur se lie au promoteur de *cx43* et déclenche aussi son activation.

1.4 Régulation de la cx43

Les résultats présentés au chapitre 2 (lors de l'exposition aux effluents municipaux), au chapitre 3 (lors du suivi de la spermatogenèse) et enfin au chapitre 4 (qui montre la régulation du promoteur de *cx43* par l'AMPc et T₃) permettent de dégager un plan de régulation de la *cx43*.

Les résultats issus du mémoire de Maîtrise par Faye (2006) et repris dans le chapitre 2, montrent que les hormones stéroïdes sont faiblement sécrétées en début de spermatogenèse chez l'omble de fontaine en maturation gonadique. La 11-CT est considérée comme la principale hormone sexuelle stéroïdienne chez les salmonidés mâles (Borg, 1994) et plusieurs études montrent que les hormones stéroïdes jouent un rôle dans l'expression de la *Cx43* chez la souris et le rat (You *et al.* 2000 ; Bravo-Moreno *et al.* 2001 ; Roscoe *et al.* 2001). Cependant, les résultats présentés au chapitre 3, durant l'expérience de culture tissulaire, démontrent l'absence de régulation de l'expression de la *cx43* par la 11-CT chez l'omble de fontaine. La régulation de la synthèse de la *cx43* en début de spermatogenèse passe donc par d'autres facteurs ; ce que confirment les résultats obtenus dans les chapitre 3 et 4. En effet, ceux-ci montrent non seulement une augmentation du niveau de *cx43* en présence d'AMPc ou de T₃, mais indiquent également que ces composés se fixent directement au niveau du promoteur de cette Cx et activent ainsi la transcription du gène.

L'activation de la synthèse de *cx43* passerait donc par les hormones thyroïdiennes. Les travaux de Timmermans *et al.* (1997) sur les juvéniles mâles de carpe (*Cyprinus carpio*) ont montré que la T₃ activait la spermatogenèse en stimulant l'activité des gonadotropines, qui à leur tour activaient la production d'hormones stéroïdes. Par ailleurs, les travaux de Cyr et Eales (1989) sur la truite arc-en-ciel ont montré que la T₃ stimulait l'expression d'AMPc. Sachant que les résultats présentés au chapitre 4 montrent que le promoteur de la *cx43* est activé à la fois par

la T₃ et par l'élément de réponse de l'AMPc, il semble que la T₃ pourrait jouer un rôle primordial dans l'activation de l'expression de la *cx43*. Le mécanisme pourrait être une activation directe de la *cx43* par fixation de la T₃ sur le site tr-beta du promoteur. Ce pourrait également être une activation indirecte, la T₃ augmentant le niveau d'AMPc, qui lui se fixerait sur leur promoteur et activerait ainsi l'expression de la *cx43*.

On pourrait également suggérer que les variations d'expression des Cxs qui ont été observées (augmentation des niveaux d'ARNm de *cx43* après 4 semaines d'exposition) durant l'exposition aux effluents municipaux pourraient être dues à la présence de composés activant les hormones thyroïdiennes ou l'activité des récepteurs. Ainsi, parmi les composés identifiés comme ayant une action de stimulation des récepteurs des hormones thyroïdiennes chez les rongeurs et l'humain, on trouve les biphenyles polychlorés (« *polychlorinated biphenyl* », PCB) et les biphenyles polybromés (« *polybrominated biphenyl* », PBDE) qui sont utilisés pour leurs propriétés ignifuges dans les plastiques (Gutleb *et al.*, 2010). La présence de certains composés, mimant l'action de T₃, activerait *via* les éléments de réponse situés sur le promoteur de *cx43* d'omble de fontaine, la transcription de la *cx43* dans le testicule.

Nous avons également observé une hausse significative de l'expression de la *cx31* durant l'expérience d'exposition des ombles de fontaine aux effluents municipaux, après 4 semaines d'exposition (une augmentation de la *cx43.4* a également été observée, bien que non significative statistiquement). L'augmentation des niveaux de plusieurs Cxs à une même période pourrait être indicateur de similitudes au niveau de leur régulation. Il est en effet envisageable que les hormones thyroïdiennes puisse réguler l'expression d'autres Cxs (*cx31* et/ou *cx43.4*), mais cela reste à démontrer.

1.5 Perspectives

À la suite des résultats obtenus dans cette étude, plusieurs nouvelles études peuvent être envisagées. Tout d'abord, l'identification des Cxs testiculaires doit être poursuivie. Si l'on souhaite comprendre l'importance des Cxs dans la spermatogenèse, il faut connaître tous les composants du réseau de communication intercellulaire. L'utilisation de différentes séquences dégénérées correspondant à d'autres sections homologues de Cxs pourrait permettre d'identifier d'autres Cxs présentes dans le testicule de salmonidé.

Ensuite, sur le rôle spécifique de chaque Cx au sein du testicule doit être élucidé. Si nos expériences ont permis d'identifier, de localiser et de caractériser l'expression de Cx43, Cx43.4, Cx30, et Cx31, elles n'ont pas apporté de réponse précise quant au rôle que chacune d'elles joue au cours des différentes étapes de la spermatogenèse. La Cx43.4, exprimée uniquement dans les spermatogonies et les spermatocytes de types I et II, pourrait jouer un rôle primordial pour l'initiation du processus. De plus, l'augmentation de l'expression des niveaux d'ARNm de *cx43* et *cx31* lors de l'initiation de la spermatogenèse, suppose également un rôle important de ces deux Cxs durant les deux premiers stades de maturation. Cependant, le suivi des niveaux de Cxs au cours de la spermatogenèse indiquent qu'elles sont exprimées durant toute la maturation gonadique, et non uniquement lors des premiers stades. Il faut envisager que *cx43* et *cx31* puissent avoir d'autres rôles à jouer durant les stades plus avancés, ou que ce rôle soit le même durant toute la maturation gonadique.

De plus, la mise au point d'un protocole de culture *in vitro* de tubules testiculaires, et l'induction des différents stades de la spermatogenèse, offrent des outils qui permettront dans l'avenir de mieux cerner les rôles spécifiques de ces quatre Cxs. En effet, connaissant les séquences de chacune d'elles, il est possible de synthétiser des ARN d'interférences (siARN) qui

inhiberont de manière spécifique la traduction de chaque Cx. En combinant cette technique avec la culture tissulaire *in vitro*, on peut envisager suivre les effets de l'inhibition d'une ou plusieurs Cxs sur le déroulement des différentes étapes de la spermatogenèse *in vitro*.

Ensuite, les travaux réalisés sur la régulation du promoteur de la *cx43* ont montré l'influence de la concentration d'AMPc sur l'augmentation des niveaux de *cx43*. Nous avons supposé en s'appuyant sur les résultats du suivi de l'expression des Cxs durant la spermatogenèse, que ce seraient les niveaux de GtH I via l'AMPc, qui moduleraient les niveaux de *cx43*. En ajoutant de la GtH I au milieu de culture, cela permettrait : 1) d'observer, en la quantifiant, la concentration d'AMPc dans les tubules testiculaires ; 2) de suivre l'évolution du testicule durant les stades de maturation.

Le système de culture tissulaire *in vitro* offre de nombreux avantages. Il permet dans un premier temps de se soustraire aux signaux émis par le cerveau en direction des gonades et de n'avoir que les stimulations engendrées par le testicule et le milieu de culture. On comprend aisément qu'il devient alors possible d'observer les effets d'une quantité quasi-illimitée de substances sur le déroulement de la spermatogenèse, et donc aussi sur l'expression des Cxs testiculaires, en ajoutant simplement au milieu de culture le ou les composés à étudier.

TROISIÈME PARTIE, SECTION 2 : CONCLUSIONS ET AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Si la présence de Cxs avait déjà été montrée chez les poissons (Marina *et al.* 2002; Batlouni *et al.* 2005), les travaux réalisés dans le cadre de ce projet apportent, à plusieurs niveaux, une contribution originale à l'avancement des connaissances. Tout d'abord, ils ont permis d'identifier et de localiser quatre nouvelles Cxs dans les testicules de salmonidés et de montrer leurs variations durant les différents stades de la spermatogenèse. De plus, en étudiant plus spécifiquement l'initiation de la spermatogenèse et en comparant les niveaux de Cxs entre individus immatures et d'autres en voie de maturation, ils ont permis de montrer que certaines Cxs pourraient être utilisées comme des marqueurs de maturation. Ensuite, les travaux réalisés plus spécifiquement sur la régulation de l'expression de *cx43* ont démontré que la régulation de cette Cx était différente de ce que l'on observe chez les mammifères, puisqu'elle était dépendante des niveaux de FSH et/ou de T₃.

Un autre élément original mérite d'être souligné. En effet, l'ensemble des expériences *in vitro* a été réalisé grâce à la mise au point d'un protocole de culture de tubules séminifères, permettant d'induire les cinq premiers stades de spermatogenèse en 30 jours. Ce protocole, mis au point par Miura *et al.* (1991) pour l'anguille japonaise, a été spécifiquement adapté pour l'omble de fontaine dans le cadre de ce projet. Cette technique a depuis été reprise au laboratoire dans le cadre d'autres projets portant sur la reproduction de l'omble de fontaine.

En conclusion, en utilisant des approches expérimentales *in vivo* comme *in vitro*, ainsi qu'une grande variété de techniques de biologie cellulaire et moléculaire, les travaux réalisés ont permis de localiser et d'identifier différents types de Cxs dans le testicule ds salmonidés, de faire

le lien entre leur expression et le déroulement de la spermatogenèse, de mettre en lumière certains aspects régulateurs et d'ainsi confirmer l'hypothèse d'un rôle essentiel de ces protéines dans la régulation du processus saisonnier de spermatogenèse caractérisant ces animaux.

RÉFÉRENCES CITÉES

Adams, C.E. et F.A. Huntingford. 1997. Growth, maturation and reproductive investment in Arctic charr. *J Fish Biol* 51:750-759.

Adams, S.M., W.D. Crumby, M.S. Greeley, Jr. L.R. Shugart et C. F. Saylor. 1992. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 24:347-360.

Ahel, M.; C.W. Giger et M. Koch. 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28: 1131-1142.

Albert, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter. 2002. Molecular biology of the cell. 4ième Edition. Ed: Garland publishing 1464 p.

Amano, M., K. Okubo, K. Ikuta, S. Kitamura, K. Okuzawa, H. Yamada, K. Aida et K. Yamamori. 2002. Ontogenetic origin of salmon GnRH neurons in the ventral telencephalon and the preoptic area in masu salmon. *Gen Comp Endocrinol* 127:256-262.

Amano, M., N. Okumoto, S. Kitamura, K. Ikuta, Y. Suzuki et K. Aida. 1994. Salmon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin are involved in precocious maturation induced by photoperiod manipulation in underyearling male masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Gen Comp Endocrinol* 95:368-373.

Amer, M. A., T. Miura, C. Miura et K. Yamauchi. 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol Reprod* 65:1057-1066.

Ando-Akatsuka, Y., M. Saitou, T. Hirase, M. Kishi, A. Sakakibara, M. Itoh, S. Yonemura, M. Furuse et S. Tsukita. 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol* 133:43-47.

Andreassen, T., K.K. Skjoedt, I. Anglade, O. Kah et B. Korsgaard. 2003. Molecular cloning, characterisation, and tissue distribution of oestrogen receptor alpha in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Gen Comp Endocrinol* 132:356-368.

Ankley, G.T., K.M. Jensen, E.A. Makynen, M.D. Kahl, J.J. Korte, M.W. Hornung, T.R. Henry, J.S. Denny, R.L. Leino, V.S. Wilson, M.C. Cardon, P.C. Hartig et L.E. Gray. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

Antonopoulou, B.E., I; Mayer et B. Borg. 1995. Stimulatory and inhibitory effects of testosterone on testes in Atlantic salmon male parr. *J Fish Biol* 47:586-598.

Antonopoulou, E., I. Mayer, B. Borg, P. Swanson, I. Murza et O. Christoforov. 1999. Effects of testosterone on gonadotropins, testes, and plasma 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnene-3-one levels in postbreeding mature Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr. *J Exp Zool* 284:425-436.

Aravindakshan, J. et D.G. Cyr. 2005. Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mitogen-activated protein kinase pathway.

Biol Reprod 72:1232-1240.

Aravindakshan, J., V. Paquet, M. Gregory, J. Dufresne, M. Fournier, D.J. Marcogliese et D.G. Cyr. 2004. Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicol Sci* 78:156-165.

Arjona, F., J.L. Vargas-Chacoff, M.P. Martin del Rio, G. Flik, J.M. Mancera et P.H. Klaren. 2008. The involvement of thyroid hormones and cortisol in the osmotic acclimation of *Solea senegalensis*. *Gen Comp Endocrinol* 155:796-803.

Arukwe, A., T. Celius, B.T. Walther et A. Goksoyr. 2000. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol* 49:159-170.

Atkinson, M.M., P.D. Lampe, H.H. Lin, R. Kollander, X.R. Li et D.T. Kiang. 1995. Cyclic AMP modifies the cellular distribution of connexin43 and induces a persistent increase in the junctional permeability of mouse mammary tumor cells. *J Cell Sci* 108: 3079-3090.

Atse, C.B., C. Audet et J. de la Noüe. 2002. Effects of temperature and salinity on the reproductive success of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): egg composition, milt characteristics and fry survival. *Aquac Res* 33:299-309.

Aurrand-Lions, M., L. Duncan, C. Ballestrem et B.A. Imhof. 2001. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 276:2733-2741.

Baglinière, J.L. et G. Maisse. 1985. Precocious maturation and smoltification in wild Atlantic salmon in the Armorican massif, France. *Aquaculture* 45:249-263.

Balda, M.S. et J.M. Anderson. 1993. Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *Am J Physiol* 264:918-924.

Banoub, R., W.M. Fernstrom, A.M. Malkinson et R.J. Ruch. 1996. Enhancement of gap junctional intercellular communication by dibutyryl cyclic AMP in lung epithelial cells. *Anticancer Res* 16:3715-3719.

Batias, C., N. Defamie, A. Lablack, D. Thepot, P. Fenichel, D. Segretain et G. Pointis. 1999. Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res* 298:113-121.

Batias, C., J.P. Siffroi, P. Fenichel, G. Pointis et D. Segretain. 2000. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem* 48:793-805.

Batlouni, S.R., F.R. Carreno, E. Romagosa et M.I. Borella. 2005. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatum* (Pisces, Siluriformes). *J Mol Histol* 36:97-110.

Baum, D., R.; Laughton, J.D. Armstrong et N.B. Metcalfe. 2005. The effect of temperature on growth and early maturation in a wild population of Atlantic salmon parr. *J Fish Biol* 67:1370-1380.

Bergmann, M., J. Schindelmeiser et H. Greven. 1984. The blood-testis barrier in vertebrates having different testicular organization. *Cell Tiss Res* 238:145-150.

Beyer, E.C., D.L. Paul et D.A. Goodenough. 1987. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol* 105:2621-2629.

Beyer, E.C. 1990. Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol* 116:187-194.

Billard, R. 1983. Ultrastructure of trout spermatozoa: Changes after dilution and deep freezing. *Cell Tissue Res* 228:205-218.

Björnsson, B., T.H. Thorarensen, T. Hirano, T. Ogasawara et J.B. Kristinsson. 1989. Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypoosmoregulatory ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. *Aquaculture* 82:77-91.

Blanton, M.L. et J.L. Specker. 2007. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *Crit Rev Toxicol* 37:97-115.

Boeuf, G. et P. Payan. 2001. How should salinity influence fish growth ? *Comp Biochem Physiol C* 130:411-423.

Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp Biochem Physiol C* 109:219-245.

Bouma, G.J., J.G. Cloud et J.J. Nagler. 2005. An in vitro system for the long-term tissue culture of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) testis. *J Exp Zool A* 303:698-703.

Bouma, J. et J.J. Nagler. 2001. Estrogen receptor- α protein localization in the testis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during different stages of the reproductive cycle. *Biol Reprod* 65:60-65.

Bravo-Moreno, J., F.V. Diaz-Sanchez, J.G. Montoya-Flores, E. Lamoyi, J.C. Saez et E.M. Perez-Armendariz. 2001. Expression of connexin43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development. *Anat Rec* 264:13-24.

Brehm, R., M. Zeiler, C. Ruttinger, K. Herde, M. Kibschull, E. Winterhager, K. Willecke, F. Guillou, C. Lecureuil, K. Steger, L. Konrad, K. Biermann, K. Failing et M. Bergmann. 2007. A Sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol* 171:19-31.

Burr, B.M. et R.L. Mayden. 1992. Phylogenetics and North American freshwater fishes dans *Systematics, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes.*: Mayden R. L.; Stanford University Press, Stanford, California.

Buzzard, J.J., J.R. Morrison, M.K. O'Bryan, Q. Song et N.G. Wreford. 2000. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod* 62:664-669.

Buzzard, J.J., N.G. Wreford et J.R. Morrison. 2003. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology* 144:3722-3731.

Campbell, B., J.T. Dickey et P. Swanson. 2003. Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biol Reprod* 69:2109-2117.

Cardwell, J.R. et N.R. Liley. 1991. Androgen control of social status in males of a wild population of stoplight parrotfish, *Sparisoma viride* (Scaridae). *Horm Behav* 25:1-18.

Cardwell, J.R., P.W. Sorensen, G.J. Van der Kraak et N.R. Liley. 1996. Effect of dominance status on sex hormone levels in laboratory and wild-spawning male trout. *Gen Comp Endocrinol* 101:333-341.

Cavaco, J.E., J. Bogerd, H. Goos et R.W. Schulz. 2001. Testosterone inhibits 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod* 65:1807-1812.

- Cavaco, J.E., J. van Baal, W. van Dijk, G.A. Hassing, H.J. Goos et R.W. Schulz. 2001. Steroid hormones stimulate gonadotrophs in juvenile male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod* 64:1358-1365.
- Cavaco, J.E., C. Vilrokx, V.L. Trudeau, R.W. Schulz et H.J. Goos. 1998. Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Am J Physiol* 275:1793-1802.
- Celius, T., T.B. Haugen, T. Grotmol et B.T. Walther. 1999. A sensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. *Environ Health Perspect* 107:63-68.
- Chang, M., R. Werner et G. Dahl. 1996. A role for an inhibitory connexin in testis? *Dev Biol* 175:50-56.
- Chanson, M., B.A. Kotsias, C. Peracchia et S.M. O'Grady. 2007. Interactions of connexins with other membrane channels and transporters. *Prog Biophys Mol Biol* 94: 233-244.
- Chatterjee, B., A.J. Chin, G. Valdimarsson, C. Finis, J.M. Sonntag, B.Y. Choi, L. Tao, K. Balasubramanian, C. Bell, A. Krufka, D.J. Kozlowski, R.G. Johnson et C.W. Lo. 2005. Developmental regulation and expression of the zebrafish connexin43 gene. *Dev Dyn* 233:890-906.

Chatterjee, B., Y.X. Li, M. Zdanowicz, J.M. Sonntag, A.J. Chin, D.J. Kozlowski, G. Valdimarsson, M.L. Kirby, et C.W. Lo. 2001. Analysis of Cx43 α 1 promoter function in the developing zebrafish embryo. *Cell Commun Adhes* 8:289-292.

Chen, C., S.M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides et D.E. Ingber. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science* 276:1425-1428.

Cherian, P.P., B. Cheng, S. Gu, E. Sprague, L.F. Bonewald et J.X. Jiang. 2003. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. *J Biol Chem* 278:43146-43156.

Choi, C.Y. et H.R. Habibi. 2003. Molecular cloning of estrogen receptor α and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Mol Cell Endocrinol* 204:169-177.

Christiansen, T., B. Korsgaard et A. Jespersen. 1998. Effects of nonylphenol and 17 β -oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparus*. *J Exp Biol* 201:179-192.

Chung, N.P., D.D. Mruk, M.Y. Mo, W.M. Lee et C.Y. Cheng. 2001. A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo. *Biol Reprod* 65:1340-1351.

Chung, S.S., W.M. Lee et C.Y. Cheng. 1999. Study on the formation of specialized inter-Sertoli cell junctions in vitro. *J Cell Physiol* 181:258-272.

Citi, S., H. Sabanay, R. Jakes, B. Geiger et J. Kendrick-Jones. 1988. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* 333:272-276.

Civitelli, R., K. Ziambaras, P.M. Warlow, F. Lecanda, T. Nelson, J. Harley, N. Atal, E.C. Beyer et T.H. Steinberg. 1998. Regulation of connexin43 expression and function by prostaglandin E2 (PGE2) and parathyroid hormone (PTH) in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 68:8-21.

Clarke, W.C., W. Griffioen et A. Solomie. 1977. A factorial mating study comparing the fertility of pen-reared and wild coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fisheries Marine Service Canadian Technical Report* 748 p.

Clarke, W. C. et J. Blackburn. 1994. Effect of growth on early sexual maturation in stream-type chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 121:95-103.

Cochran, R.C. 1992. In vivo and in vitro evidence for the role of hormones in fish spermatogenesis. *J Exp Zool* 261:143-150.

Collins, P.M., D.F. O'Neill, B.R. Barron, R.K. Moore et N.M. Sherwood. 2001. Gonadotropin-releasing hormone content in the brain and pituitary of male and female grass rockfish

(*Sebastes rastrelliger*) in relation to seasonal changes in reproductive status. *Biol Reprod* 65:173-179.

Cooke, P.S., R.A. Hess, J. Porcelli et E. Meisami. 1991. Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology* 129:244-248.

Cooke, P.S. et E. Meisami. 1991. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology* 129 :237-243.

Cosson, J., A.L. Groison, M. Suquet, C. Fauvel, C. Dreanno et R. Billard. 2008. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction* 136: 277-294.

Cruciani V., S.O. Mikalsen. 2005. The connexin gene family in mammals. *Biol Chem* 386:325-332.

Cruciani V., S.O. Mikalsen. 2006. The vertebrate connexin family. *Cell Mol Life Sci* 63:1125-1140.

Cruciani, V. et S.O. Mikalsen. 2007. Evolutionary selection pressure and family relationships among connexin genes. *Biol Chem* 388:253-264.

Curry, R.A. 2005. Assessing the reproductive contributions of sympatric anadromous and freshwater-resident brook trout. *J Fish Biol* 66:741-757.

Cyr, D.G. et J.G. Eales. 1988. In vitro effects of thyroid hormones on gonadotropin-induced estradiol-17 β secretion by ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol* 69:80-87.

Cyr, D.G., M. Gregory, E. Dube, J. Dufresne, P.T. Chan et L. Hermo. 2007. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian J Androl* 9:463-475.

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* 140:3815-3825.

Cyr, D. G. D. R. Idler C. Audet J. M. McLeese et J.G. Eales. 1998. Effects of long-term temperature acclimation on thyroid hormone deiodinase function, plasma thyroid hormone levels, growth, and reproductive status of male Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Gen Comp Endocrinol* 109:24-36.

Cyr, D.G., L. Hermo et D.W. Laird. 1996. Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. *Endocrinology*. 137:1474-1484.

Cyr, D.G. et J.G. Eales. 1989. T3 enhancement of in vitro estradiol-17 beta secretion by oocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, is dependent on cAMP. *Fish Physiol Biochem* 6:255-259.

Cyr, D.G. et J.G. Eales. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Rev Fish Biol.* 6:165-200.

Darrow, B.J., V.G. Fast, A.G. Kléber, E.C. Beyer et J.E. Saffitz. 1996. Functional and structural assessment of intercellular communication. Increased conduction velocity and enhanced connexin expression in dibutyryl cAMP-treated cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 79: 174-183.

Das Sarma, J., R.A. Meyer, F. Wang, V. Abraham, C.W. Lo et M. Koval. 2001. Multimeric connexin interactions prior to the trans-Golgi network. *J Cell Sci* 114: 4013-4024.

de Montgolfier, B., C Audet, D.J. Marcogliese, M. Fournier et D.G Cyr. 2008. Influence of municipal effluents on the expression of connexins in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) testis. *Aquat Toxicol* 86:38-48.

de Montgolfier, B., J. Dufresne, M. Letourneau, J.J. Nagler, A. Fournier, C. Audet et D.G. Cyr. 2007. The expression of multiple connexins throughout spermatogenesis in the rainbow trout testis suggests a role for complex intercellular communication. *Biol Reprod* 76:2-8.

Defamie, N., I. Berthaut, B. Mograbi, D. Chevallier, J.P. Dadoune, P. Fenichel, D. Segretain et G. Pointis. 2003. Impaired gap junction connexin43 in Sertoli cells of patients with secretory azoospermia: a marker of undifferentiated Sertoli cells. *Lab Invest* 83:449-456.

Defamie, N., B. Mograbi, C. Roger, L. Cronier, A. Malassine, F. Brucker-Davis, P. Fenichel, D.

Segretain et G. Pointis. 2001. Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells. *Carcinogenesis* 22:1537-1542.

Dehm, S.M. et D.J. Tindall. 2006. Ligand-independent androgen receptor activity is activation function-2-independent and resistant to antiandrogens in androgen refractory prostate cancer cells. *J Biol Chem* 281:27882-27893.

Denslow, N.D., H.S. Lee, C.J. Bowman, M.J. Hemmer et L.C. Folmar. 2001. Multiple responses in gene expression in fish treated with estrogen. *Comp Biochem Physiol B* 129:277-282.

Dickey, J.T. et P. Swanson. 1998. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Mol Endocrinol* 21:291-306.

Diez, J.A., S. Ahmad et W.H., Evans. 1999. Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions. *Eur J Biochem* 262: 142-148.

Dodds, E. et W. Lawson. 1938. Molecular Structure in Relation to Oestrogenic Activity. compounds without a phenanthrene nucleus. *Proc. R. Soc. London B* 125:222-232.

Dowling-Warriner, C.V. et J.E. Trosko. 2000. Induction of gap junctional intercellular communication, connexin43 expression, and subsequent differentiation in human fetal neuronal cells by stimulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroscience* 95:859-868.

Dufresne, J. et D.G. Cyr. 2007. Activation of an SP binding site is crucial for the expression of claudin 1 in rat epididymal principal cells. *Biol Reprod* 76:825-832.

Dupont, E., A. el Aoumari, J. P. Briand, C. Fromaget et D. Gros. 1989. Cross-linking of cardiac gap junction connexons by thiol/disulfide exchanges. *J Membr Biol* 108:247-252.

Duston, J. Astatkie, T. MacIsaac, P.F. 2003. Long-to-short photoperiod in winter halves the incidence of sexual maturity among Arctic charr. *Aquaculture* 221:567-580.

Dym, M. et D.W. Fawcett. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3:308-326.

Dziewulska, K. et J. Domagała. 2003. Histology of salmonid testes during maturation. *Reprod Biol* 3:47-61.

Dziewulska, K., Domagała, J. 2005. Differentiation of gonad maturation in sibling precocious males of the sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) in their first year of life. *Aquaculture* 250:713-725.

Dziewulska, K. et J. Domagala. 2004. Testicular development in the sea trout (*Salmo trutta* morpha *trutta* L.) after sex differentiation, with a reference to precocious maturation. *J App. Ichthyol* 20:282-289.

Eales, J.G. 1979. Thyroid function in cyclostomes and fishes. In *Hormones and evolution*, edited by E. J. W. Barrington. New York: Academic press.

Eales, J.G. et S.B. Brown. 1993. Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. . *Rev. Fish. Biol.* 3:299-347.

Eastman, S.D., T.H. Chen, M.M. Falk, T.C. Mendelson et M.K. Iovine. 2006. Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes. *Genomics* 87:265-274.

Echetebu, C.O., M. Ali, M.G. Izban, L. MacKay et R.E. Garfield. 1999. Localization of regulatory protein binding sites in the proximal region of human myometrial connexin 43 gene. *Mol Hum Reprod* 5:757-766.

Elfgang, C., R. Eckert, H. Lichtenberg-Frate, A. Butterweck, O. Traub, R.A. Klein, D.F. Hulser et K. Willecke. 1995. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129:805-817.

Elias, L.A.B. et A.R. Kriegstein. 2008. Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends Neurosci* 31: 243-250.

Encyclopédie Larousse. Site internet: <http://www.larousse.fr/encyclopedie>

Estebanez-Perpina, E.L., A. Arnold, P. Nguyen, E.D. Rodrigues, E. Mar, R. Bateman, P. Pallai, K.M. Shokat, J.D. Baxter, R.K. Guy, P. Webb et R.J. Fletterick. 2007. A surface on the androgen receptor that allosterically regulates coactivator binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16074-16079.

Evans, W.H., G. Carlile, S. Rahman et K. Torok. 1992. Gap junction communication channel: peptides and anti-peptide antibodies as structural probes. *Biochem Soc Trans* 20:856-861.

Evans, W.H., E. De Vuyst et L. Leybaert. 2006. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J* 397:1-14.

Falk, M.M., N.M. Kumar et N.B. Gilula. 1994. Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *J Cell Biol* 127:343-355.

Falk, M.M. et U. Lauf. 2001. High resolution, fluorescence deconvolution microscopy and tagging with the autofluorescent tracers CFP, GFP, and YFP to study the structural composition of gap junctions in living cells. *Microsc Res Tech* 52:251-262.

Fallon, R.F. et D.A. Goodenough. 1981. Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J Cell Biol* 90: 521-526.

Faye, A. 2006. Profil endocrinien de mâles d'omble (Salvelinus fontinalis et Salvelinus alpinus) en fonction ou non d'apparition de maturité sexuelle précoce. Mémoire de maîtrise en Océanographie ISMER-UQAR. 62 p.

Fernandes, R., H. Girao et P. Pereira. 2004. High glucose down-regulates intercellular communication in retinal endothelial cells by enhancing degradation of connexin 43 by a proteasome-dependant mechanism. *J Biol Chem* 279: 27219-27224.

Fernandez-Cobo, M., D. Stewart, D. Drujan et A. De Maio. 2001. Promoter activity of the rat connexin 43 gene in NRK cells. *J Cell Biochem* 81:514-522.

Fiorini, C., B. Mograbi, L. Cronier, I. Bourget, X. Decrouy, M. Nebout, B. Ferrua, A. Malassine, M. Samson, P. Fenichel, D. Segretain et G. Pointis. 2004. Dominant negative effect of connexin33 on gap junctional communication is mediated by connexin43 sequestration. *J Cell Sci* 117:4665-4672.

Fiorini, C., A. Tilloy-Ellul, S. Chevalier, C. Charuel et G. Pointis. 2004. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 18:413-421.

Fischer, P., R. Brehm, L. Konrad, S. Hartmann, S. Kliesch, R.M. Bohle et M. Bergmann. 2005. Connexin 33: A rodent-specific member of the gap junction protein family? *J Androl* 26:75-84.

Fishelson, L. 2003. Comparison of testes structure, spermatogenesis, and spermatocytogenesis in young, aging, and hybrid cichlid fish (Cichlidae, Teleostei). *J Morphol* 256:285-300.

Flagg-Newton, J., L.G. Dahl et W.R. Loewenstein. 1981. Cell junction and cyclic AMP: 1. Upregulation of junctional membrane permeability and junctional membrane particles by administration of cyclic nucleotide or phosphodiesterase inhibitor. *J Membr Biol* 63:105-121.

Folmar, L.C., N.D. Denslow, K. Kroll, E.F. Orlando, J. Enblom, J. Marcino, C. Metcalfe et L.J. Guillette, Jr. 2001. Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Arch Environ Contam Toxicol* 40:392-398.

Folmar, L.C., N.D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D.A. Crain, J. Enblom, J. Marcino, et L.J. Guillette, Jr. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 104:1096-1101.

Fostier, A., R. Billard et B. Breton. 1984. Plasma 11-oxotestosterone and gonadotrophin in relation to the arrest of spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol* 54:378-381.

Friend, D.S. et N.B. Gilula. 1972. Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J Cell Biol* 53:758-776.

Froese, R. et D. Pauly. Éditeurs. 2004. FishBase. World Wide Web electronic publication.

www.fishbase.org,

Gilleron, J., M. Nebout, L. Scarabelli, F. Senegas-Balas, S. Palmero, D. Segretain et G. Pointis. 2006. A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of Sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol* 209:153-161.

Goldenberg, R.C., F.S. Fortes, J.M. Cristancho, M.M. Morales, C.R. Franci, W.A. Varanda et A.C. Campos de Carvalho. 2003. Modulation of gap junction mediated intercellular communication in TM3 Leydig cells. *J Endocrinol* 177:327-335.

Gomez, J., M. Weil, C. Ollitrault, M. Le Bail, P.Y. Breton, F. Le Gac. 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 113:413-428.

Goodenough, D.A, J.A Goliger et D.L. Paul. 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* 65:475-502.

Goodwin, M. et A.S. Yap. 2004. Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. *J Mol Histol* 35:839-44.

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* 99:649-659.

Gregory, M.J. Aravindakshan, S. Nadzialek et D.G. Cyr. 2007. Effects of endocrine disrupting chemicals on male reproduction dans *Fish spermatology*: S.M.H. Alavi, R. Raffiee, J. Cosson, and K. Coward, Eds. Alpha Science Intl Ltd

Grier, H.J. 1993. *Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier*. Clearwater: Cacher River Press.

Gronemeyer, H. et V. Laudet. 1995. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2:1173-308.

Gronen, S., N. Denslow, S. Manning, S. Barnes, D. Barnes et M., Brouwer. 1999. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ Health Perspect* 107: 385-390.

Gross, T.S., B.S. Arnold, M.S Sepulveda et K. McDonald. 2002. Endocrine disrupting chemicals and endocrine active agents dans *Handbook of Toxicology*, edited by D. J. Hoffmann, B. Rattner, G. A. J. Burton et J. J. Cairns. Boca Raton, FL: CRC Press.

Gumbiner, B., T. Lowenkopf et D. Apatira. 1991. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3460-3464.

Gye M.C. 2004. Expression of occludin in canine testis and epididymis. *Reprod Domest Anim* 39:43-47.

Gye M.C. et S. Ohsako . 2003. Effects of flutamide in the rat testis on the expression of occludin, an integral member of the tight junctions. *Toxicol Lett* 143:217-222.

Habibi, H.R. 1991. Homologous desensitization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors in the goldfish pituitary: effects of native GnRH peptides and a synthetic GnRH antagonist. *Biol Reprod* 44:275-283.

Haffray, P., A. Fostier, Y. Normant, A. Fauré, M. Loir, B. Jalabert, G. Maisse, et F. Le Gac. 1995. Influence du maintien en mer ou de la période de transfert en eau douce des reproducteurs de saumon atlantique *Salmo salar* sur la maturation sexuelle et la qualité des gamètes. *Aquatic Living Resources* 8:135-145.

Haskins, J., L. Gu, E.S. Wittchen, J. Hibbard et B.R. Stevenson. 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141:199-208.

Haywood, M., J. Spaliviero, M. Jimemez, N.J. King, D.J. Handelsman, et C.M. Allan. 2003. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology* 144:509-517.

- Heath, D.D., R.H. Devlin, J.W. Heath, R.M. Sweeting, B.A. McKeown et G.K. Iwama. 1996. Growth and hormonal changes associated with precocious sexual maturation in male chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum)) *J Exp Mar Biol Ecol* 208:239-250
- Heinlein, C.A. et C. Chang. 2002. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23:175-200.
- Hertzberg, E.L., R.M. Fisher, A.A. Tiller, Y. Zhou et R.G. Cook. 1988. Topology of the Mr 27,000 liver gap junction protein. Cytoplasmic localization of amino- and carboxyl termini and a hydrophilic domain which is protease-hypersensitive. *J Biol Chem* 263:19105-19111.
- Herve, J.C., M. Derangeon, B. Bahbouhi, M. Mesnil et D. Sarrouilhe. 2007. The connexin turnover, an important modulating factor of the level of cell-to-cell junctional communication: comparison with other integral membrane proteins. *J Membr Biol* 217:21-33.
- Herve, J.C., F. Pluciennik, F. Verrecchia, B. Bastide, B. Delage, M. Joffre et J. Deleze. 1996. Influence of the molecular structure of steroids on their ability to interrupt gap junctional communication. *J Membr Biol* 149:179-187.

- Hess, R.A., D.H. Gist, D. Bunick, D.B. Lubahn, A. Farrell, J. Bahr, P.S. Cooke et G.L. Greene. 1997. Estrogen receptor (α and β) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J Androl* 18:602-611.
- Hewitt, L.M., T.G. Kovacs, M.G. Dube, D.L. MacLatchy, P.H. Martel, M.E. McMaster, M.G. Paice, J.L. Parrott, M.R. van den Heuvel et G.J. van der Kraak. 2008. Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: roles of individual compounds and mill operating conditions. *Environ Toxicol Chem* 27:682-697.
- Hewitt, L.M., J.L. Parrott et M.E. McMaster. 2006. A decade of research on the environmental impacts of pulp and paper mill effluents in Canada: sources and characteristics of bioactive substances. *J Toxicol Environ Health B* 9:341-356.
- Holder, J.W., E. Elmore et J.C. Barrett. 1993. Gap junction function and cancer. *Cancer Res* 53:3475-3485.
- Holsberger, D.R., G.M. Buchold, M.C. Leal, S.E. Kiesewetter, D.A. O'Brien, R.A. Hess, L.R. Franca, H. Kiyokawa et P.S. Cooke. 2005. Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biol Reprod* 72:1429-1436.
- Holsberger, D.R. et P.S. Cooke. 2005. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res* 322:133-140.

Holsberger, D.R., S. Jirawatnotai, H. Kiyokawa, et P.S. Cooke. 2003. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology* 144:3732-3738.

Holsberger, D.R., S.E. Kiesewetter, et P.S. Cooke. 2005. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor α 1. *Biol Reprod* 73:396-403.

Hoover, E. et H. Hubbard. 1937. Modification of the sexual cycle in trout by control of light. *Copeia* 4:206-210.

Hourigan, T.F., M. Nakamura, Y. Nagahama, K. Yamauchi et E.G. Grau. 1991. Histology, ultrastructure, and in vitro steroidogenesis of the testes of two male phenotypes of the protogynous fish, *Thalassoma duperrey* (Labridae). *Gen Comp Endocrinol* 83:193-217.

Huhtaniemi, I.T., H. Nikula, A. Detta, J.M. Stewart et R.N. Clayton. 1987. Blockade of rat testicular gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptors by infusion of a GnRH antagonist has no major effects of Leydig cell function *in vivo*. *Mol Cell Endocrinol* 49:89-97.

Hunter, A.W., R.J. Barker, C. Zhu et R.G. Gourdie. 2005. Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol Biol Cell* 16: 5686-5698.

- 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. *J Mol Endocrinol* 26:1-10.
- Ikeuchi, T., T. Todo, T. Kobayashi et Y. Nagahama. 1999. cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype. *J Biol Chem* 274:25205-25209.
- Ikeuchi, T., T. Todo, T. Kobayashi et Y. Nagahama. 2001. Two subtypes of androgen and progestogen receptors in fish testes. *Comp Biochem Physiol B* 129:449-455.
- Islinger, M., S. Pawlowski, H. Hollert, A. Volkl et T. Braunbeck. 1999. Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay. *Sci Total Environ* 233:109-122.
- Islinger, M., D. Willimski, A. Volkl et T. Braunbeck. 2003. Effects of 17 α -ethinylestradiol on the expression of three estrogen-responsive genes and cellular ultrastructure of liver and testes in male zebrafish. *Aquat Toxicol* 62:85-103.
- Itoh, H., K. Suzuki et H. Kawauchi. 1988. The complete amino acid sequences of β -subunits of two distinct chum salmon GTBs. *Gen Comp Endocrinol* 71:438-451.
- Jamieson, B.G.M. 1991. *Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa*. Cambridge, England: Cambridge Univ. Press.

Jana, N.R.; et S. Bhattacharya. 1993. Binding of thyroid hormone to freshwater perch Leydig cell nuclei-rich preparation and its functional relevance. *Zool. Sci.* 10:489-496.

Jannini, E.A., M. Olivieri, S. Francavilla, A. Gulino, E. Ziparo et M. D'Armiento. 1990. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the rat testis. *Endocrinology* 126: 2521-2526.

Jiang, J.X. et D.A. Goodenough. 1996. Heteromeric connexons in lens gap junction channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1287-1291.

Jobling, S., N. Beresford, M. Nolan, T. Rodgers-Gray, G.C. Brighty, J.P. Sumpter et C.R. Tyler. 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod* 66:272-281.

Jobling, S., M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brightly et J.P. Sumpter. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32:2498-2506.

Jobling, S., T. Reynolds, R. White, M.G. Parker et J.P. Sumpter. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 103:582-587.

Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen et J.P. Sumpter. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:194-202.

Joblings, S., M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brightly et J.P. Sumpter. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32:2498-2506.

Jones, I., S.A. Rogers, P. Kille et G. E. Sweeney. 2002. Molecular cloning and expression of thyroid hormone receptor α during salmonid development. *Gen Comp Endocrinol* 125:226-35.

Jones, I., S.A. Rogers, P.; Kille et G.E. Sweeney. 2004. Molecular cloning and expression of thyroid hormone receptor α during salmonid development. *Gen Comp Endocrinol* 135:345-357.

Juneja, S.C., K.J. Barr, G.C. Enders et G.M. Kidder. 1999. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 60:1263-1270.

Kadri, S., N.B.; Metcalfe, F.A. Huntingford et J.E. Thorpe. 1995. What controls the onset of anorexia in maturing adult female Atlantic salmon? *Funct Ecol* 9:790-797.

Kanamori, A. et Y. Nagahama. 1988. Involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate in the control of follicular steroidogenesis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Gen Comp Endocrinol* 72:39-53.

- Kardami, E., X. Dang, D.A. Iacobas, B.E. Nickel, M. Jeyaraman, W. Srisakuldee, J. Makazan, S. Tanguy et D.C. Spray. 2007. The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Prog Biophys Mol Biol* 94: 245-264.
- Kausea, A., O. Ritolab, T. Paananenb, E. Mäntysaaria et U. Eskelinenc. 2003. Selection against early maturity in large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the quantitative genetics of sexual dimorphism and genotype-by-environment interactions. *Aquaculture* 228:53-68.
- Kawauchi, H., K. Suzuki, H. Itoh, P. Swanson, N. Naito, Y. Nagahama, M. Nozaki, Y. Nakai et S. Itoh. 1989. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiol Biochem* 7:29-38.
- Keon, B., H.S. Schafer, C. Kuhn, C. Grund et W.W. Franke. 1996. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol* 134:1003-1018.
- Kessler, J.A., D.C. Spray, J.C. Saez et M.V. Bennett. 1984. Determination of synaptic phenotype: insulin and cAMP independently initiate development of electrotonic coupling between cultured sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6235-6239.
- King, H.R., N.W. Pankhurst et M. Watts. 2007. Reproductive sensitivity to elevated water temperatures in females atlantic salmon is heightened at certain stages of vitellogenesis. *J Fish Biol* 70:190-205.
- King, J.A. et R.P. Millar. 1992. Evolution of gonadotropin-releasing hormones. *Trends Endocrinol Metab* 257:10729-10732.

- King, T.J. et P.D. Lampe. 2005. Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues. *Biochim Biophys Acta* 1719:24-35.
- Kinnberg, K. et G. Toft. 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol Environ Saf* 54:16-24.
- Kobayashi, T., M. Nakamura, H. Kajiura-Kobayashi, G. Young et Y. Nagahama. 1998. Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, P450arom, and 3 β -HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res* 292:573-577.
- Kotula-Balak, M., A. Hejmej, J. Sadowska et B. Bilinska. 2007. Connexin 43 expression in human and mouse testes with impaired spermatogenesis. *Eur J Histochem* 51:261-268.
- Kreuzberg, M.M., J.W. Schrickel, A. Ghanem, J.S. Kim, J. Degen, U. Janssen-Bienhold, T. Lewalter, K. Tiemann et K. Willecke. 2006a. Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5959-5964.
- Kreuzberg, M., M.K. Willecke et F.F. Bukauskas. 2006b. Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends Cardiovasc Med* 16:266-272.

Krutovskikh, V.A., C. Piccoli et H. Yamasaki. 2002. Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. *Oncogene* 21:1989-1999.

Krutovskikh, V. et H. Yamasaki. 1997. The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 12:761-768.

Krutovskikh, V. et H. Yamasaki. 2000. Connexin gene mutation in human genetic diseases. *Mutat Res* 462:197-207.

Kumar, N.M. et N.B. Gilula. 1992. Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Semin Cell Biol* 3:3-16.

Kumar, N.M et N.B. Gilula. 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.

Kumar, R.S., S. Ijiri, K. Kight, P. Swanson, A. Dittman, D. Alok, Y. Zohar et J.M. Trant. 2000. Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor from the gonads of a vertebrate (bony fish): potential thyroid-independent role for thyrotropin in reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 167:1-9.

Lagree, V., K. Brunschwig, P. Lopez, N.B. Gilula, G. Richard et M.M. Falk. 2003. Specific amino-acid residues in the N-terminus and TM3 implicated in channel function and oligomerization compatibility of connexin43. *J Cell Sci* 116:3189-3201.

- Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Weismann et R.A. Patzner. 1996. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. *Progr Fish Cult* 58:149-159.
- Laird, D.W., K.L. Puranam et J.P., Revel. 1991. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J* 273:67-72.
- Lal, R. et H. Lin. 2001. Imaging molecular structure and physiological function of gap junctions and hemijunctions by multimodal atomic force microscopy. *Microsc Res Tech* 52:273-288.
- Lampe, P.D. et A.F. Lau. 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36 :1171-1186.
- Larsen, D.A. et P. Swanson. 1997. Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* 108:152-160.
- Larsson, D.G., J.T.S. Sperry et P. Thomas. 2002. Regulation of androgen receptors in Atlantic croaker brains by testosterone and estradiol. *Gen Comp Endocrinol* 128:224-230.
- Le François, N.R., H., Lemieux et P.U. Blier. 2002. Biological and technical evaluation of the potential of marine and anadromous fish species for cold-water mariculture. *Aquacul Res* 33:95-108.

Leatherland, J.F. 1994. Reflections on the thyroidology of fishes: from molecules to humankind. *Guelph Ichthyol. Rev.* 2:1-67.

Lee, H.B. et T.E. Peart. 1992. Supercritical carbon dioxide extraction of resin and fatty acids from sediments at pulp mill sites. *J. Chromatogr. A* 594:309-315.

Lehtinen, K., J.K. Mattsson, J. Tana, C. Engstrom, O. Lerche et J. Hemming. 1999. Effects of wood-related sterols on the reproduction, egg survival, and offspring of brown trout (*Salmo trutta lacustris* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* 42:40-49.

Lescheid, D.W., E. Terasawa, L.A. Abler, H.F. Urbanski, C.M. Warby, R.P. Millar et N.M. Sherwood. 1997. A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology* 138:5618-5629.

Lethimonier, C., T. Madigou, J.A. Munoz-Cueto, J.J. Lareyre et O. Kah. 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 135:1-16.

Lin, Y W., B.A. Rupnow, D.A. Price, R.M. Greenberg et R.A. Wallace. 1992. *Fundulus heteroclitus* gonadotropins. 3. Cloning and sequencing of gonadotropic hormone (GTH) I and II β -subunits using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Endocrinol* 85:127-39.

Liney, K.E., S. Jobling, J.A. Shears, P. Simpson et C.R. Tyler. 2005. Assessing the sensitivity of different life stages for sexual disruption in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to effluents from wastewater treatment works. *Environ Health Perspect* 113:1299-1307.

Liu, Y.W., L.J. Lo et W.K. Chan. 2000. Temporal expression and T3 induction of thyroid hormone receptors $\alpha 1$ and $\beta 1$ during early embryonic and larval development in zebrafish, *Danio rerio*. *Mol Cell Endocrinol* 159:187-195.

Lo, C.W. 1999. Genes, gene knockouts, and mutations in the analysis of gap junctions. *Dev Genet* 24:1-4.

Loir, M. 1999. Spermatogonia of rainbow trout: II. in vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Mol Reprod Dev* 53:434-442.

Loir, M., P. Sourdaine, S.M. Mendis-Handagama et B. Jegou. 1995. Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc Res Tech* 32:533-552.

Lou, Y.H. et H. Takahashi. 1989. The blood-testis barrier and its breakdown following immunization to testis material in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Cell Tiss Res* 258:491-498.

Lui, W.Y. et W.M. Lee. 2005. cAMP perturbs inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro via its effect on proteasome-sensitive ubiquitination of occludin. *J Cell Physiol* 203:564-572.

MacLatchy, D.L. et G.J. Van Der Kraak. 1995. The phytoestrogen beta-sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. *Toxicol Appl Pharmacol* 134:305-312.

Madigou, T., E. Mananos-Sanchez, S. Hulshof, I. Anglade, S. Zanuy et O. Kah. 2000. Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 63:1857-1866.

Madigou, T., S. Uzbekova, J.J. Lareyre et O. Kah. 2002. Two messenger RNA isoforms of the gonadotrophin-releasing hormone receptor, generated by alternative splicing and/or promoter usage, are differentially expressed in rainbow trout gonads during gametogenesis. *Mol Reprod Dev* 63:151-160.

Magnan, P., C. Audet, H. Glémet, M. Legault, M.A. Rodriguez et E.B. Taylor. 2002. Developments in the ecology, evolution, and behaviour of the charrs, genus *Salvelinus*: relevance for their management and conservation. *Environ Biol Fish* 64:9-14.

Maisse, G. et B.Breton. 1996. Contrôle photopériodique de la saison de reproduction chez les salmonidés. *INRA Prod Anim* 9:71-77.

Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon et R.M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.

Marcailou, C. et A. Szollosi. 1980. The "blood-testis" barrier in a nematode and a fish: a generalizable concept. *J Ultrastruct Res* 70:128-136.

Marchand, O., R. Safi, H. Escriva, E. Van Rompaey, P. Prunet et V. Laudet. 2001. Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. *J Mol Endocrinol* 26:51-65.

Marina, P., L. Annamaria, D. Barbara, R. Loredana, A. Piero et A. Francesco. 2002. Fine structure of Leydig and Sertoli cells in the testis of immature and mature spotted ray *Torpedo marmorata*. *Mol Reprod Dev* 63:192-201.

Martyniuk, C.J., G.M.L. Perry, H.K. Mogahadam, M.M. Ferguson et R.G. Danzmann. 2003. The genetic architecture of correlations among growth-related traits and male age at maturation in rainbow trout. *J Fish Biol* 63:746-764.

Matesic, D.F., T. Hayashi, J.E. Trosko et J.A. Germak. 1996. Upregulation of gap junctional intercellular communication in immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons by stimulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroendocrinol* 64:286-297.

Mayer, I, M. Schmitz, B. Borg, et R. Schultz. 1992. Seasonal endocrine changes in male and female Artic charr (*Salvelinus alpinus*). I. Plasma levels of three androgens, 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone, and 17 β -estradiol. *Can J Zool* 70:37-42.

McCormick, S.D. et R.J. Naiman. 1984. Some determinants of maturation in brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 43:269-278.

McLachlan, R., I.L. O'Donnell, S.J. Meachem, P.G. Stanton, D.M. de Kretser, K. Pratis et D.M. Robertson. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 57:149-179.

Mellinger, J. 2002. *Sexualité et reproduction des poissons*. CNRS éditions ed. Paris.

Mese, G., G. Richard et T.W. White. 2006. Gap junctions: Basic structure and function. *J Inv Derm* 127:2516-2524.

Mitic, L.L., C.M. Van Itallie et J.M. Anderson. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:250-254.

Miura, C., T. Miura, K. Yamauchi et Y. Nagahama. 1996. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese eel testis. *Dev Growth Differ* 38:257-262.

Miura, T., S. Kawamura, C. Miura et K. Yamauchi. 1997. Impaired spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*: possibility of the existence of factors that regulate entry of germ cells into meiosis. *Dev Growth Differ* 39:685-691.

Miura, T., N. Kudo, C. Miura, K. Yamauchi et Y. Nagahama. 1998. Two testicular cDNA clones suppressed by gonadotropin stimulation exhibit ZP2- and ZP3-like structures in Japanese eel. *Mol Reprod Dev* 51:235-242.

Miura, T., C. Miura, T. Ohta, M.R. Nader, T. Todo et K. Yamauchi. 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Commun* 264:230-234.

Miura, T., K. Yamauchi, H. Takahashi et Y. Nagahama. 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5774-5778.

Miura, T., T. Kobayashi et Y. Nagahama. 1994. Hormonal regulation of spermatogenesis in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) dans *Perspectives in Comparative Endocrinology.*, edited by D. K. (ed.). OttawaNational: Research Council of Canada.

Miura, T. et C.I. Miura. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol Biochem* 28:181-186.

Miwa, S., L. Yan et P. Swanson. 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. *Biol Reprod* 50:629-642.

Mok, B.W., W.S. Yeung et J.M. Luk. 1999. Differential expression of gap-junction gene connexin 31 in seminiferous epithelium of rat testes. *FEBS Lett* 453:243-248.

Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads dans: *Hoars, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Fish Physiology, vol. 9. Academic Press, New York, Part A, 433 pp., Part B, 477 pp.*

Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol* 38:217-229.

Nagahama, Y., T. Miura, K. Kobayashi et J. Ding. 1997. The role of Activin in spermatogenesis in Fish.: Springer-Verlag New-york.

Nagahama, Y., T. Miura et T. Kobayashi. 1994. The onset of spermatogenesis in fish. *Ciba Found Symp* 182:255-267.

Nelson, E R. et H.R. Habibi. 2006. Molecular characterization and sex-related seasonal expression of thyroid receptor subtypes in goldfish. *Mol Cell Endocrinol* 253:83-95.

Nielsen, PA, Kumar N.M. 2003. Differences in expression patterns between mouse connexin-30.2 (Cx30.2) and its putative human orthologue, connexin-31.9. *FEBS Lett.* 540:151-156.

Nimrod, A.C. et W.H. Benson. 1996. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit Rev Toxicol* 26: 335-364.

Nollet, F., P. Kools et F. van Roy. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 299:551-572.

Nowell, M.A., D.M. Power, A.V. Canario, L. Llewellyn et G.E. Sweeney. 2001. Characterization of a sea bream (*Sparus aurata*) thyroid hormone receptor- β clone expressed during embryonic and larval development. *Gen Comp Endocrinol* 123:80-89.

Nozaki, M., N. Naito, P. Swanson, W.W. Dickhoff, Y. Nakai, K. Suzuki et H. Kawauchi. 1990a. Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *Gen Comp Endocrinol* 77:358-367.

Nozaki, M., N. Naito, P. Swanson, K. Miyata, Y. Nakai, Y. Oota, K. Suzuki et H. Kawauchi. 1990b. Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. *Gen Comp Endocrinol* 77:348-357.

Nunn, R.S., T.J. Macke, A.J. Olson et M. Yeager. 2001. Transmembrane alpha-helices in the gap junction membrane channel: systematic search of packing models based on the pair potential function. *Microsc Res Tech* 52:344-351.

O'Brien, J., R. Bruzzone, T.W. White, M.R. Al-Ubaidi et H. Ripps 1998. Cloning and expression of two related connexins from the perch retina define a distinct subgroup of the connixin family. *J Neurosci*. 18:7625-7637.

Oba, Y., T. Hirai, Y. Yoshiura, M. Yoshikuni, H. Kawauchi et Y. Nagahama. 1999a. Cloning, functional characterization, and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem Biophys Res Commun* 263:584-590.

Oba, Y., T. Hirai, Y. Yoshiura, M. Yoshikuni, H. Kawauchi et Y. Nagahama. 1999b. The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem Biophys Res Commun* 265:366-371.

Oetting, A. et P.M. Yen. 2007. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21:193-208.

Olsén, K.H., M. Grahn, J. Lohm et A. Lange fors. 1998. MHC and kin discrimination in juvenile Artic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Anim Behav* 56: 319-327.

Olsson, P.E., A.H. Berg, J. von Hofsten, B. Grahn, A. Hellqvist, A. Larsson, J. Karlsson, C. Modig, B. Borg et P. Thomas. 2005. Molecular cloning and characterization of a nuclear androgen receptor activated by 11-ketotestosterone. *Reprod Biol Endocrinol* 3:37.

Omura, T. et K. Morohashi. 1995. Gene regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:19-25.

- Orlando, E.F., D.E. Bass, L.M. Caltabiano, W.P. Davis, L.E. Gray, Jr. et L.J. Guillette, Jr. 2007. Altered development and reproduction in mosquitofish exposed to pulp and paper mill effluent in the Fenholloway River, Florida USA. *Aquat Toxicol* 84:399-405.
- Orrego, R., A. Burgos, G. Moraga-Cid, B. Inzunza, M. Gonzalez, A. Valenzuela, R. Barra et J.F. Gavilan. 2006. Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): biomarker responses along a pollution gradient in the Biobio River, Chile. *Environ Toxicol Chem* 25:2280-2287.
- Oyamada, M., Y. Oyamada et T. Takamatsu. 2005. Regulation of connexin expression. *Biochem Biophys Acta* 1719: 6-23.
- Palmero, S., M. Prati, F. Bolla et E. Fugassa. 1995. Tri-iodothyronine directly affects rat Sertoli cell proliferation and differentiation. *J Endocrinol* 145:355-362.
- Pati, D. et H.R. Habibi. 2000. Direct action of GnRH variants on goldfish oocyte meiosis and follicular steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 160:75-88.
- Paul, D.L. 1986. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J Cell Biol* 103:123-134.
- Paulson, A.F., P.D. Lampe, R.A. Meyer, E. TenBroek, M.M. Atkinson, T.F. Walseth et R.G. Johnson. 2000. Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J Cell Sci* 113:3037-3049.

- Pavlidis, M., L. Greenwood, B. Mourot, C. Kokkari, F. Le Menn, P. Divanach et A.P. Scott. 2000. Seasonal variations and maturity stages in relation to differences in serum levels of gonadal steroids, vitellogenin, and thyroid hormones in the common dentex (*Dentex dentex*). *Gen Comp Endocrinol* 118:14-25.
- Pelletier, R.M. 1995. The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *J Androl* 16:400-409.
- Pelletier, R.M. et S.W. Byers. 1992. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech* 20:3-33.
- Perez-Armendariz, E.M., M.C. Romano, J. Luna, C. Miranda, M.V. Bennett et A.P. Moreno. 1994. Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *Am J Physiol* 267:570-580.
- Plante, I., M. Charbonneau et D.G. Cyr. 2002. Decreased gap junctional intercellular communication in hexachlorobenzene-induced gender-specific hepatic tumor formation in the rat. *Carcinogenesis* 23:1243-1249.
- Plante, I., D.G. Cyr et M. Charbonneau. 2007. Sexual dimorphism in the regulation of liver connexin32 transcription in hexachlorobenzene-treated rats. *Toxicol Sci* 96:47-57.

Pluciennik, F., M. Joffre et J. Deleze. 1994. Follicle-stimulating hormone increases gap junction communication in Sertoli cells from immature rat testis in primary culture. *J Membr Biol* 139:81-96.

Pluciennik, F., F. Verrecchia, B. Bastide, J.C. Herve, M. Joffre et J. Deleze. 1996. Reversible interruption of gap junctional communication by testosterone propionate in cultured Sertoli cells and cardiac myocytes. *J Membr Biol* 149:169-77.

Plum, A., G. Hallas, T. Magin, F. Dombrowski, A. Hagendorff, B. Schumacher, C. Wolpert, J. Kim, W.H. Lamers, M. Evert, P. Meda, O. Traub et K. Willecke. 2000. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* 10:1083-1091.

Pointis, G., C. Fiorini, N. Defamie et D. Segretain. 2005. Gap junctional communication in the male reproductive system. *Biochim Biophys Acta* 1719:102-116.

Pointis, G. et D. Segretain. 2005. Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends Endocrinol Metab* 16:300-306.

Pottinger, T.G. 1988. Seasonal variation in specific plasma- and target-tissue binding of androgens, relative to plasma steroid levels, in the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen Comp Endocrinol* 70:334-344.

- Power, D., M.L. Llewellyn, M. Faustino, M.A. Nowell, B.T. Bjornsson, I.E. Einarsdottir, A.V. Canario et G.E. Sweeney. 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp Biochem Physiol C* 130:447-459.
- Pudney, J. 1996. Comparative cytology of the Leydig cell. In *The Leydig cell*, edited by H. M. P. Payne A., Russel L.D. Vienna: Cache River Press.
- Purdom, C.E., P.A. Hardiman, V.V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler et J.P. Sumpter. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8:275-285.
- Rahman, M., D. Saydur, A. Takemura et K. Takano. 2000. Annual changes in testicular activity and plasma steroid hormones in the golden rabbitfish *Siganus guttatus* (Bloch). *Fish Sci* 66:894-900.
- Raine, J.C., M.M. Cameron, J. Vijayan, J. Lamarre et J.F. Leatherland. 2004. The effect of elevated oocyte triiodothyronine content on development of rainbow trout embryos and expression of mRNA encoding for thyroid hormone receptors. *J. Fish Biol.* 65:206-226.
- Risley, M.S. 2000. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod* 62:748-754.
- 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. *J Cell Sci* 103:81-96.

Roche-Mayzaud, O, P Mayzaud et C. Audet. 1998. Changes in lipid classes and trypsin activity during the early development of brook charr, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), fry. *Aquac Res* 29:137-152.

Romanello, M., L. Moro, D. Pirulli, S. Crovella et P. D'Andrea. 2001. Effects of cAMP on intercellular coupling and osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 282:1138-1144.

Roscoe, W.A., K.J. Barr, A.A. Mhawi, D.K. Pomerantz et G.M. Kidder. 2001. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 65:829-838.

Rowe, D.K. et J.E. Thorpe. 1990. Suppression of maturation in male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr by reduction in feeding and growth during spring months. *Aquaculture* 86:291-313.

Sabik, H., F. Gagne, C. Blaise, D.J. Marcogliese et R. Jeannot. 2003. Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*). *Chemosphere* 51:349-356.

Sacobie, C.F.D. et T.J. Benfey. 2005. Sex differentiation and early gonadal development in brook trout. *N Am J Aquacul* 67:181-186.

Saez, J.C., V.M. Berthoud, M.C. Branes, A.D. Martinez et E.C. Beyer. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359-1400.

Saez, J.C., J.A. Connor, D.C. Spray et M.V. Bennett. 1989. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2708-2712.

Safe, S.H. 2000. Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environ Health Perspect* 108:487-493.

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. *Eur J Cell Biol* 73:222-231.

Saitou, M., M. Furuse, H. Sasaki, J.D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda et S. Tsukita. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11:4131-4142.

Sambroni, E., S. Gutieres, C. Cauty, Y. Guiguen, B. Breton et J.J. Lareyre. 2001. Type II iodothyronine deiodinase is preferentially expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and gonads. *Mol Reprod Dev* 60:338-350.

Sangalang, G.B. et H.C. Freeman. 1974. Effects of sublethal cadmium on maturation and testosterone and 11-ketotestosterone production in vivo in the brook trout. *Biol Reprod* 11:429-435.

Schiller, P.C., B.A. Roos et G.A. Howard. 1997. Parathyroid hormone up-regulation of connexin 43 gene expression in osteoblasts depends on cell phenotype. *J Bone Miner Res* 12:2005-2013.

Schulz, R.W. 1984. Serum levels of 11-oxotestosterone in male and 17 β -estradiol in female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 56:111-120.

Schulz, R.W., H.F. Vischer, J.E. Cavaco, E.M. Santos, C.R. Tyler, H.J. Goos et J. Bogerd. 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129:407-417.

Scott, A.P. et J.P. Sumpter. 1989. Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. *Gen Comp Endocrinol* 73:46-58.

Setchell, B.P. 1980. The functionnal significance of the blood-testis-barrier. *J Androl* 1:3-10.

Setchell, B.P. 1998. Blood-testis barrier. In *Encyclopedia of reproduction 1*, edited by E. K. J. D. Niell. New York: Academic Press.

Sharpe, R., M.C. McKinnell, C. Kivlin et J.S. Fisher. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125:769-784.

Sherwood, N.M. et B.A. Adams. 2005: - Gonadotropin-releasing hormone in fish: Evolution, expression and regulation of the GnRH genes. *Dans: Hormones and their receptors in fish reproduction* (Melamed P. et N.M. Sherwood, eds), pp. 1-39. Singapour: World Scientific Publishing.

Simon, A.M. et D.A. Goodenough. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends in cell biol* 8:477-483.

Söhl, G. et K. Willecke. 2004 Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62:228-232.

Sohoni, P. et J.P. Sumpter. 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 158:327-339.

Sohoni, P., C.R. Tyler, K. Hurd, J. Caunter, M. Hetheridge, T. Williams, C. Woods, M. Evans, R. Toy, M. Gargas, et J.P. Sumpter. 2001. Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 35:2917-2925.

Sosinsky, G.E. et B.J. Nicholson. 2005. Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* 1711:99-125.

Sperry, T.S. et P. Thomas. 1999a. Characterization of two nuclear androgen receptors in Atlantic croaker: comparison of their biochemical properties and binding specificities. *Endocrinology* 140:1602-1611.

Sperry, T.S. et P. Thomas. 1999b. Identification of two nuclear androgen receptors in kelp bass (*Paralabrax clathratus*) and their binding affinities for xenobiotics: comparison with Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) androgen receptors. *Biol Reprod* 61:1152-1161.

Sperry, T.S. et P. Thomas . 2000. Androgen binding profiles of two distinct nuclear androgen receptors in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *J Steroid Biochem Mol Biol* 73:93-103.

Sridharan, S., L. Simon, D.D. Meling, D.G. Cyr, D.E. Gutstein, G.I. Fishman, F. Guillou et P.S. Cooke. 2007. Proliferation of adult Sertoli cells following conditional knockout of the gap junctional protein GJA1 (Connexin 43). *Biol Reprod* 76:804-812.

St-Pierre, N, J. Dufresne, A.A. Rooney et D.G. Cyr. 2003. Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. *Biol Reprod.* 68:1232-1240.

Stauffer, K.A. 1995. The gap junction proteins β 1-connexin (connexin-32) and β 2-connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels. *J Biol Chem* 270:6768-6772.

Steger, K.F. Tetens et M. Bergmann. 1999. Expression of connexin 43 in human testis.
Histochem Cell Biol 112:215-220.

Stock, A. et H. Sies. 2000. Thyroid hormone receptors bind to an element in the connexin43 promoter. *Biol Chem* 381:973-979.

Stock, A., H. Sies et W. Stahl. 1998. Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones. *Biochem Pharmacol* 55:475-479.

Sumpter, J.P. et S. Jobling. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103:173-178.

Suzuki, K., H. Kawauchi et Y. Nagahama. 1988a. Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol* 71:302-306.

Suzuki, K., H. Kawauchi et Y. Nagahama. 1988b. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen Comp Endocrinol* 71:292-301.

Swanson, P., K. Suzuki, H. Kawauchi et W.W. Dickhoff. 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol Reprod* 44:29-38.

Swapna, I., M. Rajasekhar, A. Supriya, K. Raghuveer, G. Sreenivasulu, M.K. Rasheeda, K.C. Majumdar, H. Kagawa, H. Tanaka, A. Dutta-Gupta et B. Senthilkumaran. 2006.

Thiourea-induced thyroid hormone depletion impairs testicular recrudescence in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp Biochem Physiol A* 144:1-10.

Swapna, I. et B. Senthilkumaran. 2007. Thyroid hormones modulate the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis in teleosts: Molecular insights. *Fish Physiol Biochem* 33: 335-345.

Takeo, J. et S. Yamashita. 1999. Two distinct isoforms of cDNA encoding rainbow trout androgen receptors. *J Biol Chem* 274:5674-5680.

Tan, I.P., C. Roy, J.C. Saez, C.G. Saez, D.L. Paul et M.S. Risley. 1996. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biol Reprod* 54:1300-1310.

Taranger, G.L., C. Haux, S.O. Stefansson, B.T. Björnsson, B.T. Walther et T. Hansen. 1998. Abrupt changes in photoperiod affect age at maturity, timing of ovulation and plasma testosterone and oestradiol-17 profiles in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 162:85-98.

TenBroek, E.M., P.D. Lampe, J.L. Solan, J.K. Reynhout et R.G. Johnson. 2001. Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. *J Cell Biol* 155:1307-1318.

- Teunissen, B.E., A.T. Jansen, S.C. van Amersfoorth, T.X. O'Brien, H.J. Jongsma et M.F. Bierhuizen. 2003. Analysis of the rat connexin 43 proximal promoter in neonatal cardiomyocytes. *Gene* 322:123-136.
- Thorpe, J.E., C.; Talbot et C. Villarreal. 1982. Bimodality of growth and smolting in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 28:123-132.
- Tollefsen, K.E. 2002. Interaction of estrogen mimics, singly and in combination, with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 56:215-225.
- Tollefsen, K.E., J. Ovrevik et J. Stenersen. 2004. Binding of xenoestrogens to the sex steroid-binding protein in plasma from Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Comp Biochem Physiol C* 139:127-133.
- Traub, O., J. Look, R. Dermietzel, F. Brummer, D. Hulser et K. Willecke. 1989. Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J Cell Biol* 108:1039-1051.
- Trosko, J.E. et R.J. Ruch. 1998. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* 3:208-236.

Tveiten, H., H.K. Johnsen et M. Jobling. 1996. Influence of maturity status on the annual cycles of feeding and growth in Arctic charr reared at constant temperature. *J Fish Biol* 48:910-924.

Tveiten, H., I. Mayer, H.K. Johnsen et M. Jobling.. 1998. Sex steroids, growth and condition of Arctic charr broodstock during an annual cycle. *J Fish Biol* 53:714-727.

Tyler, C.R., S. Jobling et J.P. Sumpter. 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol* 28:319-361.

Umesono, K. et R.M. Evans. 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57:1139-1146.

Van den Belt, K., R. Verheyen et H. Witters. 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol Environ Saf* 56:271-281.

van den Hurk, R. et G.A. Slof. 1981. A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tiss Res* 218:487-497.

Van der Kraak, G., K. Suzuki, R.E. Peter, H. Itoh et H. Kawauchi. 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *Gen Comp Endocrinol* 85:217-229.

van Haaster, L.H., F.H. de Jong, R. Docter et D.G. de Rooij. 1993. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinology* 133:755-760.

Vaney, D.I., J.C. Nelson et D.V. Pow. 1998. Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina. *J Neurosci* 18:10594-10602.

Van Slyke, J.K. et L.S. 2000. Analysis of connexin intracellular transport and assembly. *Methods* 20: 156-164.

Vinken, M., T. Vanhaecke, P. Papeleu, S. Snykers, T. Henkens et V. Rogiers. 2006. Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signal* 18:592-600.

Wang, R.S., S. Yeh, L.M. Chen, H.Y. Lin, C. Zhang, J. Ni, C.C. Wu, P.A. di Sant'Agnese, K.L. deMesy-Bentley, C.R. Tzeng et C. Chang. 2006. Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* 147:5624-5633.

Waring, C.P., A. Moore et A.P. Scott. 1996. Milt and endocrine responses of mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr to water-borne testosterone, 17,20 β -dihydroxy-4-pregn-3-one 20-sulfate, and the urines from adult female and male salmon. *Gen Comp Endocrinol* 103:142-149.

Werner, R. 2000. IRES elements in connexin genes: a hypothesis explaining the need for connexins to be regulated at the translational level. *IUBMB Life* 50:173-176.

White, R., S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter et M.G. Parker. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135:175-182.

White, T.W. et R. Bruzzone. 2000. Gap junctions: fates worse than death? *Curr Biol* 10:685-688.

Wu, Y. et R.J. Koenig. 2000. Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* 11:207-211.

Xia W., C.H. Wong, N.P. Lee, W.M. Lee et C.Y. Cheng. 2005. Disruption of Sertoli-germ cell adhesion function in the seminiferous epithelium of the rat testis can be limited to adherens junctions without affecting the blood-testis barrier integrity: an in vivo study using an androgen suppression model. *J Cell Physiol* 205:141-157.

Yamasaki, H., V. Krutovskikh, M. Mesnil et Y. Omori. 1996. Connexin genes and cell growth control. *Arch Toxicol Suppl* 18:105-114.

Yancey, S.B., B.J. Nicholson et J.P. Revel. 1981. The dynamic state of liver gap junctions. *J Supramol Struct Cell Biochem* 16:221-232.

- Yao, J., M. Kitamura, Y. Zhu, Y. Meng, A. Kasai, N. Hiramatsu, T. Morioka, M. Takeda et T. Oite. 2006. Synergistic effects of PDGF-BB and cAMP-elevating agents on expression of connexin43 in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:1083-1093.
- Yaron, Z., G. Gur, P. Melamed, H. Rosenfeld, B. Levavi-Sivan et A. Elizur. 2001. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. *Comp Biochem Physiol B* 129:489-502.
- Ying, G., G.B. Williams et R. Kookana. 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates-a review. *Environ Int* 28:215-226.
- Yoshida, S., M. Sukeno et Y. Nabeshima. 2007. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* 317:1722-1726.
- You, S., W. Li et T. Lin. 2000. Expression and regulation of connexin43 in rat Leydig cells. *J Endocrinol* 166:447-453.
- Young, G., H. Ueda et Y. Nagahama. 1983. Estradiol-17 β and 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one production by isolated ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) in response to mammalian pituitary and placental hormones and salmon gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 52:329-335.
- Zhang, Y.W., K. Nakayama, K. Nakayama et I. Morita. 2003. A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res* 63:1623-1630.

Zhong, Y., T. Saitoh, T. Minase, N. Sawada, K. Enomoto et M. Mori. 1993. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol* 120:477-483.

Zimmer, D.B., C.R. Green, W.H. Evans et N.B. Gilula. 1987. Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures. *J Biol Chem* 262:7751-7763.