

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en Santé Humaine

Régulation des jonctions cellulaires dans l'épididyme

Par Nancy ST-PIERRE

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du Jury
et examinateur interne

Denis Girard
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

John Geoffery Eales
University of Manitoba
Department of Zoology

Directeur de recherche

Daniel G. Cyr
INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Sans le soutien de beaucoup de personnes ce mémoire ne serait pas... Je tiens donc à les remercier sincèrement.

Merci Daniel de m'avoir ouvert les portes de la science...merci pour ta présence, tes conseils et ton soutien...

Un merci particulier à la Fondation Armand-Frappier et au Fond FCAR-FRSQ pour leur soutien financier.

Chère Julie, cette maîtrise m'aurait été beaucoup plus difficile sans ton support technique et moral...

Et toi, ma petite Johanna chérie, tu es un rayon de soleil dans ma vie...

Merci à Isabelle pour les bons moments à rigoler ensemble

Et que serait la vie de laboratoire sans collègues de travail...merci

Thanks to Kelly, Koren and April from LDI...without your support girls, writing would have been much harder...

Merci à toi Véro qui, même au loin, sait m'apporter du réconfort...

Merci à ma famille pour leur présence...

Et un merci tout particulier à toi Hervé, mon amour chéri, pour ce que tu es dans ma vie... je t'aime...

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	II
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX	VIII
RÉSUMÉ.....	1
INTRODUCTION.....	5
PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	7
1.1 ORGANES DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR MÂLE.....	8
1.1.1 <i>Les testicules</i>	8
1.1.1.1 La barrière hémato-testiculaire.....	9
1.1.1.2 La spermatogenèse.....	10
1.1.2 <i>Les canicules efférentes</i>	10
1.1.3 <i>L'épididyme</i>	11
1.1.4 <i>Les conduits déférents</i>	11
1.1.5 <i>La prostate</i>	11
1.1.6 <i>Les vésicules séminales</i>	12
1.1.7 <i>Autres glandes</i>	12
1.2 RÉGULATION HORMONALE DES FONCTIONS DU TRACTUS REPRODUCTEUR MÂLE.....	12
1.3 L'ÉTUDE DES FONCTIONS DU TRACTUS REPRODUCTEUR MÂLE.....	13
2.1 GÉNÉRALITÉS.....	14
2.1.1 <i>Historique</i>	14
2.1.2 <i>Évolution</i>	14
2.2 STRUCTURE.....	14
2.2.1 <i>Segmentation</i>	15
2.2.1.1 Types cellulaires.....	15
2.2.1.2 Autres caractéristiques.....	16
2.3 FONCTIONS.....	17
2.3.1 <i>Fonctions de l'épithélium</i>	17
2.3.1.1 Absorption.....	17
2.3.1.2 Sécrétion.....	17
2.3.1.3 Métabolisme.....	17
2.3.1.4 Spermiphagie.....	17
2.3.2 <i>Fonctions au niveau de la lumière du tubule</i>	18
2.3.2.1 Transport.....	18
2.3.2.2 Maturation.....	18
2.3.2.2.1 Motilité.....	19
2.3.2.2.2 Pouvoir fécondant.....	20
2.3.2.3 Stockage des spermatozoïdes.....	20
2.3.3 <i>Régulation</i>	21
2.3.3.1 Androgènes.....	21
2.3.3.1.1 Formation de l'épididyme.....	21
2.3.3.1.2 Régulation des fonctions de l'épididyme.....	22
2.3.3.1.3 Mécanismes d'action.....	23
2.3.3.2 Autres hormones.....	23
2.4 BARRIÈRE HÉMATO-ÉPIDIDYMAIRE.....	25
2.4.1 <i>Fluide séminal</i>	25

2.4.2	<i>La barrière hémato-épididymaire</i>	25
3.1	LA JONCTION D'ADHÉRENCE	28
3.1.1	<i>Cadhérines</i>	28
3.1.1.1	Structure.....	29
3.1.1.2	Formation de la jonction.....	29
3.1.1.3	Fonctions des cadhérines.....	30
3.1.1.4	Les cadhérines dans le testicule et l'épididyme.....	32
3.1.1.4.1	Le testicule.....	32
3.1.1.4.2	L'épididyme.....	33
	Références.....	34
3.2	LA JONCTION LACUNAIRE (GAP)	35
3.2.1	<i>Connexines</i>	36
3.2.1.1	Structure.....	37
3.2.1.2	Formation de la jonction.....	37
3.2.1.3	Fonctions des connexines.....	39
3.2.1.4	Les connexines dans le testicule et l'épididyme.....	39
3.2.1.4.1	Le testicule.....	40
3.2.1.4.2	L'épididyme.....	41
	Tableau 5- Connexines dans l'épididyme.....	42
	Connexine.....	42
	Présence du messager.....	42
	Présence de la protéine.....	42
3.3	LA JONCTION SERRÉE	43
3.3.1	<i>Les protéines de jonction serrée</i>	44
3.3.1.1	La structure des protéines de la jonction serrée.....	45
3.3.1.2	Formation de la jonction.....	46
3.3.1.3	Fonction de la jonction serrée.....	46
3.3.1.4	La jonction serrée dans le testicule et l'épididyme.....	48
3.3.1.4.1	Le testicule.....	48
3.3.1.4.2	L'épididyme.....	48
3.4	RÉGULATION DES JONCTIONS	49
3.4.1	<i>Interactions entre les différents types de jonctions cellulaires</i>	49
3.4.2	<i>Régulation des jonctions par d'autres facteurs</i>	51
4.1	HORMONES SYNTHÉTISÉES	52
4.2	FONCTIONS DES HORMONES THYROÏDIENNES	52
4.3	MODE D'ACTION DES HORMONES DE LA THYROÏDE	53
4.3.1	<i>Les récepteurs</i>	53
4.4	INHIBITION DE LA PRODUCTION D'HORMONES THYROÏDIENNES	54
4.5	LES HORMONES THYROÏDIENNES ET LE SYSTÈME REPRODUCTEUR MÂLE	54
5.0	OUTILS POUR L'ÉTUDE DE LA RÉGULATION DES JONCTIONS CELLULAIRES DANS L'ÉPIDIDYME PAR LES HORMONES THYROÏDIENNES	57
5.1	LES LIGNÉES CELLULAIRE	57
5.1.1	<i>L'antigène grand-T de SV40</i>	58
5.1.2	<i>Lignée cellulaire épididymaire</i>	59
	SECONDE PARTIE : LES ARTICLES SCIENTIFIQUES	61
	MA CONTRIBUTION - PREMIER ARTICLE	63
	RÉSUMÉ DU PREMIER ARTICLE	65
	PREMIER ARTICLE	69
	MA CONTRIBUTION - SECOND ARTICLE	115
	SECOND ARTICLE	117

TROISIÈME SECTION : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	171
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	173
BIBLIOGRAPHIE	179

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -cat	: alpha-caténine	DBD	:domaine de liaison à l'ADN ; DNA binding domain
ABP	: protéine de liaison à l'androgène ; androgen binding protein	DHT	: dihydrotestostérone
AMPc	: adénosine-monophosphate cyclique	EGF	:facteur de croissance épidermal ; epidermal growth factor
ADN	:acide désoxyribonucléique	FBS	:sérum de veau fœtal ; fetal bovine serum
ADNc	:acide désoxyribonucléique complémentaire	FSH	:hormone folliculo-stimulante
ARN	:acide ribonucléique	IS	:initial segment ; segment initial de l'épididyme
ARNm	:acide ribonucléique messenger	JE	:jour embryonnaire
β -cat	:beta-caténine	LBD	:domaine de liaison du ligand ; ligand binding domain
CA	:cauda ; queue de l'épididyme	LH	: hormone lutéinisante
CD	: conduit déférent	LH-RH	: gonadolibérine
CE	: canicules efférentes	NCS	:new calf serum ; sérum de veau
CI	:claudine	Occ	:occludine
CS	:corpus ; corps de l'épididyme	PCR	:réaction de polymérisation en chaîne ; polymerase chain reaction
CT	:caput ; tête de l'épididyme	TR	: récepteur à hormones thyroïdiennes
Cx	:connexine		
-cad	:cadhérine	ZO-1, 2, 3	:Zonula Occludens-1, 2, 3

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la segmentation de l'épididyme	15
Figure 2 : Représentation schématique du complexe jonctionnel.....	27
Figure 3 : Représentation schématique de la jonction d'adhérence.....	28
Figure 4 : Représentation schématique de la jonction serrée.....	36
Figure 5. Représentation schématique d'une jonction.....	43
Figure 6 : Structure chimique du propylthiouracil.....	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Cadhérines dans le testicule.....	32
Tableau 2 : Cadhérines dans l'épididyme.....	34
Tableau 3 : Phénotypes des souris Knock-Out pour certaines connexines.....	40
Tableau 4 : Connexines dans le testicule.....	41
Tableau 5. Connexines dans l'épididyme.....	42
Tableau 6 : Protéines de jonctions serrées dans le testicule.....	48
Tableau 7 : Protéines de jonctions serrées dans l'épididyme.....	50

RÉSUMÉ

L'épididyme est un organe du système reproducteur mâle qui a un rôle clé dans la maturation des spermatozoïdes. Le maintien du micro-environnement luminal spécifique de l'organe est crucial. Celui-ci est possible grâce à la barrière hémato-épididymaire, formée des jonctions serrées à l'apex des cellules principales. Ces jonctions sont essentielles au maintien des fonctions de l'organe. Toutefois, le complexe jonctionnel de l'épididyme est beaucoup plus développé et comprend aussi des jonctions adhérentes et lacunaires. Ces dernières sont impliquées dans la communication cellulaire et régulent certains événements telle la différenciation des cellules.

Les facteurs de régulation de ces processus cellulaires sont nombreux et certains sont encore mal connus. Toutefois, plusieurs études ont déjà démontré l'impact des hormones thyroïdiennes dans la différenciation des différents types cellulaires du testicule. Les facteurs de régulation des jonctions sont aussi nombreux et certaines études ont démontré un rôle possible des hormones de la thyroïde à ce niveau.

Les objectifs de cette maîtrise étaient doubles. Dans un premier temps, la régulation de la protéine de jonction lacunaire Cx43 par les hormones de la thyroïde dans le testicule et l'épididyme fut étudiée *in vivo*. Par la suite, afin de pouvoir éventuellement mieux cerner les impacts de ces hormones sur les jonctions cellulaires dans l'épididyme, nous avons développé une lignée cellulaire comme modèle *in vitro*.

Les épididymes de rats mâles de 26 et 91 jours furent utilisés pour déterminer la présence du récepteur à hormones thyroïdiennes dans l'épididyme. Pour l'étude de régulation *in vivo*, de jeunes rats furent rendus hypothyroïdes par l'administration de PTU dans l'eau de boisson des mères. Le PTU est transmis aux ratons via la lactation et le traitement cesse avec le sevrage. Les testicules et épididymes furent prélevés à différents jours après le début du traitement (14, 18, 22, 26, 30 et 91). Les organes de certains animaux furent congelés dans l'azote liquide pour éventuellement en extraire l'ARN et d'autres fixés et montés en sections de paraffine. Des études d'immunohistochimie et des analyses Northern furent ensuite réalisées.

Ainsi, nous avons pu déterminer que le récepteur pour les hormones thyroïdiennes est présent autant chez les jeunes animaux que chez les adultes. Les résultats obtenus

dans l'étude d'hypothyroïdie nous permettent d'abord de conclure qu'il y a effectivement modification dans l'expression de la Cx43 dans le testicule et l'épididyme chez de jeunes animaux. Dans le testicule, la modification se trouve au niveau du ciblage et de la localisation de la protéine, qui n'est plus entièrement localisée au niveau de la membrane plasmique des cellules mais aussi dans le cytoplasme. Dans l'épididyme, l'expression du gène et de la protéine sont affectés, les niveaux d'ARNm étant à la baisse dans la portion proximale de l'organe pendant le traitement et la protéine absente dans ces mêmes segments. L'étude de l'expression d'occludine, protéine de jonction serrée, dans le testicule suggère un retard général dans la croissance de l'organe plutôt qu'un effet direct, puisque l'organisation des jonctions serrées est similaire à celle de plus jeunes animaux.

Afin de poursuivre l'étude de la régulation des jonctions cellulaires épидидymaires par les hormones de la thyroïde, nous avons créé une lignée de cellules principales de l'épididyme. Cette lignée fut réalisée par l'immortalisation des cellules principales de la région proximale (segment initial et tête) de l'épididyme de rats âgés de 40 jours. Dans un premier temps, nous avons dû adapter une méthode d'isolation de cellules et de culture primaire et vérifier la possibilité de marquer les différentes protéines de jonctions selon les conditions choisies. Par la suite, les cellules furent transfectées avec le plasmide contenant l'antigène grand-T du virus simien 40 (SV40) par précipitation au phosphate de calcium. Un seul clone a ensuite été analysé. L'analyse en microscopie électronique a permis de démontrer que le clone est composé d'une population contenant trois types cellulaires épithéliaux caractéristiques de l'épididyme, soit des cellules principales, apicales et claires. Des expériences d'amplification par RT-PCR ont aussi permis de démontrer la présence des messagers de certains marqueurs épидидymaires, dont CRISP-1, le récepteur à androgènes et CI-1. Les cellules en culture croissent lentement ce qui suggère la nécessité de modifier les conditions de culture. En conclusion, le taux de croissance des cellules ne nous a pas permis d'utiliser la lignée aux fins espérées, soit de poursuivre *in vitro* l'étude de la régulation des jonctions cellulaires par les hormones thyroïdiennes.


Étudiant


Directeur de recherche

INTRODUCTION

L'épididyme est un organe du système reproducteur mâle qui a un rôle crucial dans la fertilité. À la sortie du testicule, les spermatozoïdes sont non motiles et incapables de féconder un ovule. Ces caractéristiques se développent lors du passage dans l'épididyme qui leur procure le micro-environnement nécessaire à leur maturation (Bedford, 1975 ; Bernard et Robaire, 1988). La barrière hémato-épididymaire, formée par la présence de jonctions serrées à l'apex des cellules principales, est responsable de cet environnement luminal favorable à la maturation des gamètes (Cyr, Robaire et Hermo, 1995).

Ainsi, les jonctions serrées sont essentielles au développement de spermatozoïdes matures dans l'épididyme. Cependant, la complexité de cet organe laisse aussi présager un réseau d'interactions cellulaires plus développé. Ceci est confirmé par la présence de jonctions adhérentes et lacunaires, et une régulation impliquant divers facteurs (Cyr et al., 2002).

La communication intercellulaire dans l'épididyme, tout comme dans de nombreux organes, est aussi essentielle à divers autres processus, telle la différenciation cellulaire. Les facteurs de régulation de ces processus sont cependant très nombreux. Parmi ceux-ci, mentionnons les hormones produites par la glande thyroïde. Dans le testicule par exemple, les hormones thyroïdiennes sont largement impliquées dans la différenciation des cellules de Sertoli (Cooke et Meisami, 1991) et de Leydig (Hardy et al., 1996), alors que dans l'épididyme, l'hypothyroïdie causée par une thyroïdectomie provoque une diminution du nombre de mitoses (Del Rio, Valdez et Quiros, 1979).

Les hormones thyroïdiennes sont impliquées dans la régulation d'événements cellulaires qui sont aussi reliés aux jonctions de communication. Cela soulève la possibilité intéressante d'une action de ces hormones par leur régulation des jonctions cellulaires. Quelques études *in vitro* ont déjà démontré la régulation de certaines protéines de jonction par les hormones de la thyroïde dans divers tissus, dont les cellules de Sertoli (Stock, Sies et Stahl, 1998 ; Laslett *et al.*, 2000). Cependant, les impacts observés semblent varier selon la protéine de jonction et le tissu étudiés. Aucune donnée

n'est toutefois disponible en ce qui concerne la régulation des jonctions cellulaires par les hormones thyroïdiennes dans l'épididyme, aspect sur lequel nous avons porté notre attention. De plus, nous avons porté notre intérêt sur les jonctions dans le testicule, organe du système reproducteur mâle dans lequel l'impact des hormones thyroïdiennes sur le développement de l'organe a été largement étudié.

L'utilisation de modèles *in vivo* occasionne toutefois quelques limitations. C'est dans cette optique que nous avons voulu développer un modèle épидидymaire *in vitro*. Depuis quelques années, plusieurs méthodes de cultures primaires de cellules de l'épididyme ont été élaborées (Kierszenbaum *et al.*, 1981 ; Kirchhoff *et al.*, 2000). Toutefois, l'étude de l'organe à l'aide de ces cultures est limitée par le faible taux de division des cellules épithéliales de l'épididyme et aussi par la capacité de conserver ces cultures pour un nombre limité de passages avant leur dédifférenciation ou leur mort.

L'outil par excellence pour ces études est souvent une lignée cellulaire, dont les cellules peuvent être conservées pour un nombre très élevé de passages et qui croissent généralement plus rapidement. Nous avons donc voulu développer une lignée cellulaire de l'épididyme par immortalisation avec l'antigène grand-T du virus simien 40 (SV40), utilisé à maintes reprises pour la formation de lignées cellulaires de tissus épithéliaux de diverses origines (Almazan et McKay, 1992 ; DenBesten *et al.*, 1999), dont des cellules épидидymaires foetales (Coleman et Harris, 1991).

Les travaux de cette maîtrise ont donc porté sur deux aspects différents. Dans un premier temps, un modèle *in vivo* a permis l'étude de la régulation de la protéine de jonction lacunaire Cx43 par les hormones thyroïdiennes dans l'épididyme, mais aussi dans le testicule. La deuxième partie des travaux a porté sur le développement d'une lignée cellulaire de l'épididyme, celle-ci devant éventuellement être utilisée pour l'étude de la régulation des jonctions cellulaires épидидymaires par les hormones thyroïdiennes avec un modèle *in vitro*. Ce mémoire présente donc les résultats obtenus et comporte trois parties. La première comprend un résumé de la littérature du domaine de recherche. Elle est suivie d'une seconde partie présentant les travaux de recherche sous la forme de deux articles scientifiques. Une discussion générale termine la présentation du mémoire.

PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.0 Généralités sur le tractus reproducteur mâle

La première représentation précise de l'anatomie du testicule est attribuable à Aristote 400 ans Av.J.C. Cependant, les fonctions reproductrices du testicule et la présence de spermatozoïdes dans le liquide séminal furent précisées au 17^{ième} siècle seulement. Au milieu du 19^e siècle, beaucoup d'études sur le testicule furent réalisées et le développement des gamètes mâles à partir de cellules testiculaires fut alors mis en évidence. La découverte du site de production de la testostérone ne se fera toutefois que plus tard, vers 1903 (Steinberger et Steinberger, 1975 ; de Kretser et Kerr, 1988).

1.1 Organes de l'appareil reproducteur mâle

Le système reproducteur mâle est composé de deux testicules, des canicules efférentes, de deux épидидymes avec leur canal déférent ainsi que de glandes accessoires. La présence ou l'absence de certaines de ces glandes accessoires varient selon les espèces (Setchell et Brooks, 1988).

1.1.1 Les testicules

Les testicules sont les gonades mâles qui produisent les spermatozoïdes ainsi que certaines hormones. Les testicules peuvent être subdivisés en deux parties fonctionnellement distinctes : le tissu interstitiel, principal responsable de la production d'androgènes, et les tubules séminifères, lieu de production des spermatozoïdes. La taille et la localisation des testicules varient selon les espèces (Setchell et Brooks, 1988). Cependant, dans la majorité des cas, les testicules migrent de leur position originale dans l'abdomen vers une position plus externe au niveau du scrotum (Bedford, 1991). La position scrotale des testicules permet d'y maintenir une température de 2 ou 3°C inférieure à celle du corps, condition essentielle à la méiose et à la spermatogénèse (Harrison, 1975).

La spermatogénèse a lieu dans les tubules séminifères. Ces tubules sont composés de cellules germinales et de cellules de Sertoli. Celles-ci sont adjacentes à la membrane basale. C'est à partir des cellules germinales que vont s'élaborer, au cours d'une série de divisions et de transformations cellulaires, les spermatozoïdes. Cependant, la

spermatogénèse nécessite des conditions spécifiques qui sont réalisées grâce à l'environnement unique que l'on retrouve à l'intérieur des tubules séminifères. Ce micro-environnement est possible grâce à la barrière hémato-testiculaire. Les cellules de Sertoli jouent un rôle de soutien pour les cellules germinales en migration (de Krester et Kerr, 1988) et contribuent à la composition du micro-environnement tubulaire en sécrétant une centaine de protéines (Bardin *et al.*, 1988).

Les testicules sont majoritairement formés des tubules séminifères. Cependant, selon les espèces, on retrouve entre ces tubules une proportion plus ou moins grande de tissu interstitiel. C'est au niveau de ce tissu que se retrouvent, en plus des cellules de Leydig, tous les vaisseaux sanguins et lymphatiques de même que certains nerfs (Setchell et Brooks, 1988). La fonction première des cellules de Leydig est la production d'androgènes, dont la principale est la testostérone (Hall, 1988). Les testicules peuvent aussi transformer des androgènes en oestrogènes (Carreau, 2001).

1.1.1.1 La barrière hémato-testiculaire

La première présomption de l'existence d'une barrière hémato-testiculaire remonte au début des années 1900 (Byers, Pelletier et Suárez-Quian, 1993). Contrairement à la barrière hémato-cervicale, la barrière hémato-testiculaire n'est pas présente à la naissance. Dans le testicule de rat, les jonctions serrées formant la barrière commencent à se développer vers le douzième jour postnatal et la barrière devient fonctionnelle entre les jours quinze et dix-neuf (Vitale, Fawcett et Dym, 1973). La barrière hémato-testiculaire est composée en majeure partie par les complexes jonctionnels qui existent entre les cellules de Sertoli adjacentes. Cette barrière permet la sélection des molécules qui traversent du compartiment sanguin pour atteindre la lumière des tubules et vice versa. Elle est responsable de l'énorme différence existant entre la composition du liquide à l'intérieur des tubules et celle du sang. Cet environnement spécifique est essentiel au développement des cellules germinales. Toutefois, la barrière protégerait aussi le sperme immunogénique du système immunitaire (Byers, Pelletier et Suárez-Quian, 1993).

1.1.1.2 La spermatogenèse

La spermatogenèse se définit comme la série d'événements cytologiques menant à la formation de spermatozoïdes à partir des cellules germinales (de Krester et Kerr, 1988). Lors de ce processus, on retrouve dans les tubules séminifères des cellules à différentes phases, la spermatogenèse comportant plusieurs divisions mitotiques, deux divisions méiotiques, ainsi qu'un remodelage prononcé des cellules. La formation des spermatozoïdes est un long procédé. Chez le rat, la durée de la spermatogenèse est de 49 jours (de Krester et Kerr, 1988), alors que chez l'homme, le processus s'étale sur 64 à 72 jours (Marieb, 1993).

Les cellules les moins différenciées et les plus externes des tubules sont les cellules souches. Ces cellules, appelées spermatogonies, subissent sans arrêt des mitoses de la naissance jusqu'au début de la spermatogenèse. Avec le début de la spermatogenèse, les mitoses génèrent deux cellules différentes : la spermatogonie A, qui demeurera près de la lame basale et subira d'autres mitoses, et la spermatogonie B qui, poussée vers la lumière du tubule, se transformera en spermatocyte de premier ordre. Les spermatocytes sont des cellules méiotiques. La méiose I produira deux spermatocytes de deuxième ordre, des cellules haploïdes plus petites. Rapidement, ces spermatocytes subiront la méiose II, qui produira quatre spermatides. Ces spermatides, qui sont aussi des cellules haploïdes, entreront alors en spermiogenèse. Ce dernier processus n'implique aucune division, mais permet le profilage des spermatides par une série de changements morphologiques, dont une réduction importante du cytoplasme (de Krester et Kerr, 1988 ; Marieb, 1993). Les spermatozoïdes qui résultent de ce processus sont non motiles et infertiles. La maturation des spermatozoïdes prendra place au niveau de l'épididyme.

1.1.2 Les canicules efférentes

À la suite du rété testis, un réseau de canaux situés dans la partie postérieure du testicule, et juste avant leur entrée dans l'épididyme, les spermatozoïdes doivent d'abord traverser les canicules efférentes. Leur nombre et leur longueur varient selon les espèces. En plus de permettre le transport des spermatozoïdes, ces canicules ont des propriétés de

réabsorption des fluides et des activités d'acide phosphatase, estérase, β -glucoronidase et d'anhydrase carbonique. (Setchell et Brooks, 1988).

1.1.3 L'épididyme

Les spermatozoïdes quittent les canicules efférentes pour être dirigés dans l'épididyme. Chez le rat, les premiers spermatozoïdes font leur entrée dans l'épididyme vers le jour postnatal 49. L'épididyme est un long tubule unique et pelotonné qui recouvre la face supérieure du testicule. Il est généralement divisé en quatre segments distincts : le segment initial, la tête, le corps et la queue. Chacun de ces segments diffère par les divers types cellulaires présents de même que par leurs fonctions. Dans son ensemble, l'épididyme permet le transport, la maturation et le stockage des spermatozoïdes. Il s'y produit aussi une réabsorption des fluides et une synthèse de protéines (Hamilton, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988). Une discussion plus détaillée de l'épididyme est présentée à la section 2 de la revue de littérature.

1.1.4 Les conduits déférents

Le conduit déférent est le prolongement de l'épididyme et s'élargit à son extrémité pour former une ampoule. Il sert principalement de conduit pour permettre le passage du sperme de l'épididyme vers l'urètre. Toutefois, son épithélium complexe, possédant à la fois des propriétés sécrétrices et absorbantes, laisse présager qu'il possède aussi d'autres fonctions (Setchell et Brooks, 1988).

1.1.5 La prostate

La prostate est la seule glande accessoire qui est présente au niveau de toutes les espèces de mammifères. Sa position est antérieure à la vessie et aux vésicules séminales. La prostate est formée de plusieurs glandes tubulo-alvéolaires composées. Elle sécrète environ 1/3 du volume du sperme et cette sécrétion légèrement acide contenant divers ions exerce un rôle important dans l'activation des spermatozoïdes. Chez le rat, la glande est polylobée et son lobe ventral est sensible à l'activité des androgènes circulants (Setchell et Brooks, 1988 ; Marieb, 1993).

1.1.6 Les vésicules séminales

La sécrétion des vésicules séminales chez l'homme constitue environ 60% du volume du sperme. Les vésicules séminales sont les principales responsables de la synthèse du fructose à partir du glucose sanguin. Ce fructose est une composante majeure du liquide alcalin visqueux et jaunâtre que sécrète ces glandes. Ces glandes sont situées sur la paroi postérieure de la vessie (Setchell et Brooks, 1988 ; Marieb, 1993) et sont sensibles aux androgènes circulants (Neaves et Bramley, 1972).

1.1.7 Autres glandes

L'ampoule du canal déférent est un élargissement en forme de fuseau de la portion terminale du conduit déférent. Son liquide luminal contient des corps globulaires et des spermatozoïdes. Les glandes bulbo-urétrales, aussi appelées glandes de Cowper, produisent un épais mucus translucide libéré avant l'éjaculation et qui a pour fonction de neutraliser l'acidité des traces d'urine qui persiste dans l'urètre. Elles se localisent sous la prostate, généralement au nombre de deux. Les glandes urétrales sont aussi appelées glandes de Littre. Ces glandes mucosales sont nombreuses et s'ouvrent dans l'urètre. Chez les rongeurs, il y a aussi les glandes préputiales qui, contrairement aux autres glandes accessoires, ne produisent pas une abondante sécrétion aqueuse, mais plutôt une sécrétion lipidique associée à une fonction de phéromone (Setchell et Brooks, 1988).

1.2 Régulation hormonale des fonctions du tractus reproducteur mâle

Le système reproducteur mâle remplit donc deux fonctions principales : la formation des spermatozoïdes et la production d'androgènes. La régulation de ces fonctions est complexe et fait intervenir à la fois l'hypothalamus, l'adénohypophyse et les testicules (axe cérébro-testiculaire). La gonadolibérine (LH-RH) sécrétée par l'hypothalamus stimule l'adénohypophyse qui à son tour libère l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH). Suite à l'action de la FSH sur les cellules de Sertoli, il y a libération de l'ABP (androgen binding protein) et d'inhibine. La production de testostérone par les cellules de Leydig est quant à elle stimulée par l'action de la LH sur

ces dernières. La spermatogenèse est alors intensifiée par la liaison de l'ABP et de la testostérone. Il y a par la suite rétro-inhibition sur l'hypothalamus et l'hypophyse, rétro-inhibition qui résulte d'une augmentation des concentrations de testostérone et d'inhibine. La stimulation de l'axe cérébro-testiculaire mène à une augmentation de la concentration de testostérone produite et par le fait même à une augmentation de la spermatogenèse. Bien que la testostérone soit l'hormone la plus synthétisée par le testicule, celui-ci sécrète aussi la dihydrotestostérone, l'androsténérone, l'androstendione, 17hydroxyprogestérone, progestérone et la pregnénolone (Griffin et Wilson, 1998).

Pour produire ces effets, la testostérone se lie dans un premier temps aux récepteurs à androgènes de la cellule cible. Dans certains organes, il doit d'abord y avoir conversion de la testostérone en dihydrotestostérone (DHT) par la 4-ène-stéroïde-5 α -réductase. La DHT se lie plus solidement aux mêmes récepteurs que son précurseur et le complexe formé se lie aussi plus fermement à la chromatine. C'est cette liaison qui activera des gènes spécifiques ; il y aura alors transcription de l'ARN messenger (ARNm) et augmentation de la synthèse des protéines ciblées. La testostérone et/ou la DHT régule(nt) donc la sécrétion de gonadotropines, initie(nt) et maintient(nent) la spermatogenèse, permet(tent) la formation du phénotype mâle lors de la différenciation sexuelle et l'expression des caractères sexuels mâles à la puberté (Marieb, 1993 ; Griffin et Wilson, 1998).

1.3 L'étude des fonctions du tractus reproducteur mâle

Les nombreuses études réalisées sur les composantes du tractus reproducteur mâle ont permis de démontrer que les testicules ne peuvent assurer à eux seuls la fonction reproductrice masculine, puisque les spermatozoïdes qu'ils produisent sont immatures. La production des spermatozoïdes féconds nécessite d'abord leur passage dans l'épididyme, organe sur lequel nous avons porté notre intérêt.

2.1 L'épididyme

2.1 Généralités

2.1.1 Historique

L'épididyme fut décrit pour la première fois par Aristote durant la même période que le testicule. Les premières grandes contributions sont toutefois attribuables à Benoit en 1926 et Young entre 1929 et 1931. Celles-ci furent suivies d'une longue période où très peu d'attention fut portée à l'épididyme (Orgebin-Crist, 1998).

2.1.2 Évolution

Les fonctions de l'épididyme à travers le règne animal sont variées. Chez les poissons, où il n'y a pas d'épididyme à proprement parlé, il n'y a qu'un conduit qui permet le passage des spermatozoïdes testiculaires fonctionnels. L'épididyme apparaît chez les oiseaux et reptiles, où sa structure, encore relativement simple, permet à la fois le transport et l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes. Chez les mammifères, comme pour les oiseaux et reptiles, l'épididyme origine des conduits mésonéphriques (origine embryonnaire du rein). Cependant, la structure de même que les fonctions de l'épididyme sont beaucoup plus complexes, permettant non seulement le transport, mais également l'acquisition de la motilité et de la fertilité des spermatozoïdes immatures (Jones, 1998).

2.2 Structure

L'épididyme est formé d'un seul tubule, largement replié sur lui-même. Le terme épididyme origine du Grec et signifie "adjacent au testicule" (Robaire et Hermo, 1988). Relié à celui-ci par les nombreuses canicules efférentes, l'épididyme tire son origine de la fusion de ces dernières et son prolongement forme le canal déférent. L'épididyme étant un conduit, il est donc composé de deux compartiments : un épithélium et une lumière (Hamilton, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988).

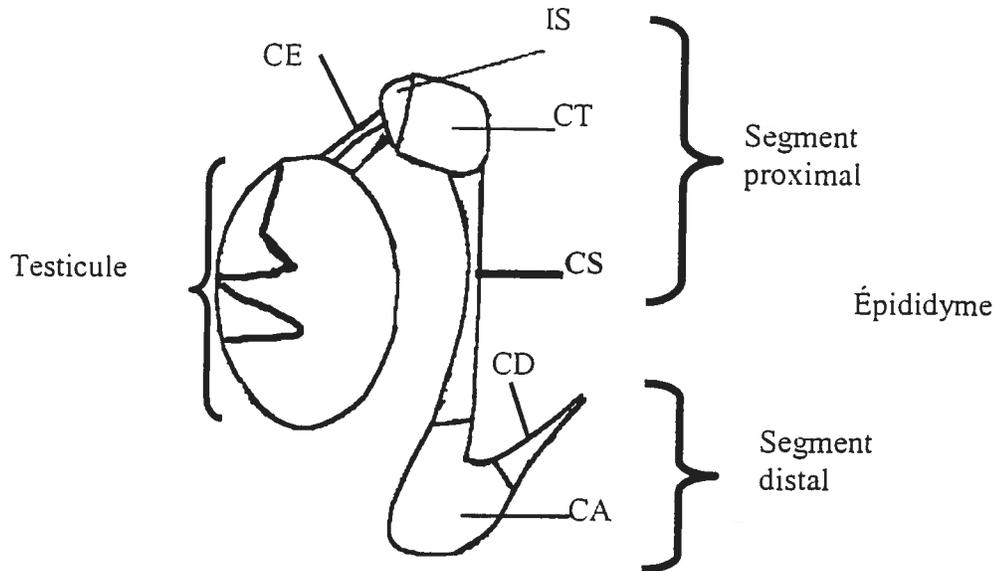


Figure 1. Représentation schématique de la segmentation de l'épididyme
(CD=Canal déférent : CE=Canicules efférentes)

2.2.1. Segmentation

L'observation de la structure de l'épididyme permet sa division en quatre segments distincts : le segment initial (IS), la tête (CT), le corps (CS) et la queue (CA) (Fig. 1). Ces segments se distinguent autant par leur histologie que par les fonctions qu'ils remplissent. Les types cellulaires rencontrés diffèrent, de même que leur proportion. L'épaisseur de l'épithélium, les propriétés d'absorption et la sécrétion de protéines sont aussi fonction du segment (Hamilton, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988).

2.2.1.1 Types cellulaires

Six types cellulaires sont présents dans l'épididyme de rat mature : les cellules principales, apicales, basales, étroites, halos et claires. Toutefois, le développement de l'épididyme peut être divisé en trois phases : un stade indifférencié, une période de différenciation et une phase d'expansion. Durant la première phase, qui s'échelonne de la naissance au jour quinze postnatal, les cellules ont une apparence uniforme. Les premières cellules halos sont visibles au jour quatorze. La période de différenciation s'étale des jours seize à quarante-quatre. Les premières cellules étroites font leur apparition au jour seize, alors que la différenciation des cellules principales et basales se produit vers le jour 28. L'apparition de sperme dans le lumen est caractéristique de la phase d'expansion qui débute au jour 45 (Sun et Flickinger, 1979).

Dans l'épididyme différencié, les cellules principales constituent la base de l'épithélium et sont prédominantes dans tous les segments. Au niveau du segment initial, ces cellules sont hautes et coloniales et possèdent quelques microvilli qui forment une bordure en brosse. Leur noyau, relativement petit, se situe à la base de la cellule. En ce qui concerne les autres segments, la taille des cellules principales est moindre et celles-ci deviennent plutôt cuboïdales dans les régions distales alors que leur noyau est légèrement plus gros. La hauteur des cellules étant diminuée, le diamètre de la lumière du tubule en est ainsi augmenté. Les cellules apicales sont caractéristiques du segment initial de l'épididyme. Ces dernières ont un noyau localisé près de la surface du lumen et possèdent un nombre réduit de microvilli. Les cellules étroites, aussi exclusives au segment initial, sont peu nombreuses et se caractérisent par un noyau allongé situé dans la portion supérieure de la cellule et par une base très étroite les reliant à la membrane basale. Les cellules basales quant à elles occupent une plus grande proportion. Présentes à tous les niveaux de l'épididyme, ces cellules de forme allongée, caractérisées par un noyau oblong, se situent à la base de l'épithélium et sont en contact avec la membrane basale. Les cellules halos se retrouvent aussi dans tous les segments de l'épididyme. Leur nombre varie largement tout au long de l'organe et celles-ci sont caractérisées par un noyau très dense. Les cellules claires sont quant à elles présentes dans la tête, le corps et la queue de l'épididyme et leur région apicale est très vacuolée (Robaire et Hermo, 1988).

2.2.1.2 Autres caractéristiques

La différence entre les segments de l'épididyme n'est pas limitée à l'aspect morphologique. La tête de l'épididyme est responsable de l'absorption d'une large proportion de liquides et molécules sécrétées par le testicule. La synthèse protéique est aussi variable selon les segments ; celle-ci est plus active au niveau de la tête et du corps de l'épididyme qu'au niveau de la queue. Les protéines sécrétées dans la tête sont aussi différentes de celles produites dans le corps et la queue. L'expression de certains gènes diffère aussi selon les régions de l'épididyme, la tête étant une fois de plus la région la plus active (Orgebin-Crist, 1996 ; Kirchhoff, 1999).

2.3 Fonctions

L'épididyme est un organe complexe qui remplit diverses fonctions au sein du système reproducteur mâle. Plusieurs de ces fonctions ont été attribuées à l'épithélium de l'organe, alors que d'autres sont assurées à l'intérieur de la lumière du tubule. Certaines d'entre elles sont aussi dépendantes des segments de l'organe.

2.3.1 Fonctions de l'épithélium

2.3.1.1 Absorption

L'épithélium de l'épididyme joue un rôle primordial dans la composition du fluide séminal. En fait, il est responsable de l'absorption d'un large volume de liquide et de molécules provenant du testicule, ce qui permet de multiplier grandement la concentration des spermatozoïdes à leur entrée dans l'épididyme (Hamilton, 1975).

2.3.1.2 Sécrétion

L'épithélium sécrète aussi dans le lumen une variété d'ions et de petites particules organiques prélevées de la circulation, de même que certaines protéines, glycoprotéines et petites molécules synthétisées par l'épididyme. Ces deux propriétés de l'épithélium épидидymaire permettent aussi la création du micro-environnement spécifique qui règne dans la lumière du tubule (Hamilton, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988).

2.3.1.3 Métabolisme

La structure épithéliale de l'épididyme possède aussi une activité métabolique. En plus d'assurer le métabolisme intermédiaire du glucose (Bernadis *et al.*, 1995), elle permet le métabolisme de la testostérone en DHT (Cooke et Robaire, 1987). L'épididyme est aussi impliqué dans la biosynthèse, le métabolisme et la conjugaison du glutathion, la biosynthèse des prostaglandines (Blodorn *et al.*, 1996 ; Leung *et al.*, 1998) de même que le métabolisme de la vitamine D (Kidroni *et al.*, 1983).

2.3.1.4 Spermiphagie

L'épithélium épидидymaire est capable de spermiphagie (phagocytose des spermatozoïdes par l'épithélium) et prend en charge les spermatozoïdes non éjaculés.

Une portion de ces spermatozoïdes est évacuée dans l'urine, tandis que la grande majorité est absorbée, puis détruite par les cellules bordant l'épididyme et le canal déférent (Glover, 1974 ; Bedford, 1975).

2.3.2 Fonctions au niveau de la lumière du tubule

Trois fonctions de l'épididyme, en lien direct avec les gamètes mâles, lui sont généralement attribuées. Ainsi, la lumière du tubule permet à la fois le transport, la maturation et le stockage des spermatozoïdes en provenance des testicules.

2.3.2.1 Transport

L'implication du testicule dans le transport des spermatozoïdes, depuis les testicules vers les canaux déférents, a été proposée il y a plus d'un siècle. À leur arrivée dans l'épididyme, les spermatozoïdes sont incapables de se mouvoir. Le transport des spermatozoïdes le long de la lumière épидидymaire est rendu possible grâce à la pression hydrostatique qui varie le long du tubule, à des contractions musculaires de même qu'à l'activité ciliaire des parois du tubule. L'activité péristaltique de l'épididyme a aussi beaucoup d'impact dans le mouvement des spermatozoïdes le long du tubule. Une faible activité électrique parcourt l'épididyme provoquant de 7 à 9 contractions par minute. Ces contractions sont largement responsable du transport des gamètes (Bedford, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988). De plus, le voyage des spermatozoïdes à travers la lumière du tubule épидидymaire semble être un processus bien régulé, puisque indépendamment de l'espèce, le temps requis pour le trajet est relativement constant et oscille entre 10 et 14 jours, sauf chez l'humain où celui-ci est plutôt variable (Orgebin-Crist, 1998).

2.3.2.2 Maturation

La maturation des spermatozoïdes est un processus complexe. À leur sortie du testicule, les gamètes mâles sont incapables de se mouvoir et de fertiliser un ovule. Ces propriétés se développeront lors de leur transit dans l'épididyme. Ce phénomène de maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme a été reconnu au début du 20^e siècle.

L'implication précise de chacun des segments de l'épididyme dans le processus de

maturation des spermatozoïdes est difficile à évaluer. Toutefois, un modèle de souris transgénique déficiente pour le récepteur de tyrosine kinase c-ros a permis d'étudier l'apport du segment initial de l'organe dans ce processus. La seule anomalie chez ces souris se situe chez les mâles homozygotes, où le segment initial de l'épididyme ne se développe pas. Ces souris s'accouplent normalement, mais la fertilisation ne se produit pas *in vivo*, malgré le fait qu'elle soit possible *in vitro*. Ainsi, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes n'est pas en cause, ni même le nombre de spermatozoïdes produits et relâchés. L'étude de la motilité et du patron de nage des spermatozoïdes de ces souris démontre que tout est semblable à ce qui est observé chez les souris fertiles. En fait, leur infertilité est plutôt reliée à l'incapacité des gamètes à atteindre les ovules. Cette incapacité est causée par une angulation du flagelle lors de la nage (Yeung *et al.*, 1998). Ainsi, certaines étapes de la maturation des spermatozoïdes prennent place dans le segment initial. Toutefois, l'implication réelle de ce segment, de mêmes que des autres sections de l'épididyme, n'est pas parfaitement connue.

2.3.2.2.1 Motilité

La première observation du gain de mobilité par les spermatozoïdes lors de leur passage dans l'épididyme remonte aussi loin qu'en 1897 (Orgebin-Crist, Danzo et Davies, 1975). Depuis, de nombreuses études l'ont aussi confirmé. La capacité de se mouvoir se développe chez les gamètes lors de leur passage dans les régions proximales de l'épididyme. Elles acquièrent peu à peu le pouvoir de se déplacer de façon progressive et en ligne droite, ce qui est une condition essentielle à la fertilisation. L'acquisition de cette motilité se fait graduellement. Les spermatozoïdes de la région proximale de la tête sont capables de mouvements vibratiles légers. Puis, vers la région centrale de la tête, ils sont capables de nager en petits cercles serrés. Ces cercles s'agrandiront avec la descente des gamètes dans le corps de l'épididyme et ce n'est qu'au début du segment caudal que leurs déplacements deviendront progressifs (Orgebin-Crist, Danzo et Davies, 1975 ; Brooks, 1983a). Cependant, la composition du fluide séminal de la queue de l'épididyme conserve les spermatozoïdes dans un stade quiescent qui les empêche de se mouvoir (Robaire et Hermo, 1988).

2.3.2.2.2 Pouvoir fécondant

Le gain de motilité acquis dans la portion proximale de l'épididyme est une étape importante vers l'acquisition du pouvoir fécondant. Le développement de la capacité de pouvoir fertiliser un ovule et d'initier une croissance embryonnaire normale est le résultat de la maturation de diverses organelles du spermatozoïde. Ce potentiel s'acquiert lors du transit épидидymaire et les spermatozoïdes sont matures et fertiles à partir de la partie proximale de la queue de l'épididyme (Orgebin-Crist, Danzo et Davies, 1975 ; Brooks, 1983a).

Les changements qui prennent place chez les spermatozoïdes lors du trajet dans l'épididyme sont nombreux. Un événement important est la migration de la gouttelette cytoplasmique du col du spermatozoïde jusqu'au milieu du flagelle, puis le détachement de celle-ci. Chez certaines espèces, il y a modification de l'acrosome (Bedford, 1975 ; Glover, 1974). Des changements majeurs ont aussi été observés au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde : diminution du point iso-électrique, augmentation de la surface de la cellule possédant une charge négative et de la composition lipidique et protéique. Il y a aussi changement dans la composition antigénique et l'activité enzymatique des gamètes. De plus, il y a une altération de la liaison des lectines à la surface de la cellule. Ces modifications à la surface des spermatozoïdes libèrent certains récepteurs de surface, ce qui permet la reconnaissance entre les spermatozoïdes et les ovules d'une espèce favorisant ainsi la fertilisation. D'autres changements affectent plutôt le noyau des spermatozoïdes. La spermiogénèse provoque une condensation du noyau de même qu'une augmentation des liens disulfures (Bedford, 1975 ; Brooks, 1983a). Ces changements se font graduellement lors du transit épидидymaire.

2.3.2.3 Stockage des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes atteignent la queue de l'épididyme sous une forme mature et celle-ci leur servira de réservoir durant l'attente de la prochaine éjaculation. Le milieu baignant les gamètes en réserve les conserve dans un stade quiescent, pour une période

pouvant aller de quelques jours à plus d'un mois. Les facteurs permettant la préservation des spermatozoïdes pour de longues périodes ne sont pas bien connus. Toutefois, chez le rat, l'immobiline serait impliquée dans ce processus. Par ces propriétés viscoélastiques, l'immobiline empêcherait mécaniquement le mouvement du flagelle des spermatozoïdes (Hinton et Palladino, 1995).

Selon certaines études, la nécessité de stocker les spermatozoïdes à de basses températures aurait provoqué la descente des testicules et épидидymes en position scrotale, ce qui leur permet de conserver une température de 2 à 3°C sous la température corporelle. Cela est essentiel, car la queue de l'épididyme est un organe sensible à la température. Une température avoisinant celle du corps a des conséquences sur les propriétés d'absorption et de sécrétion de ce segment, ce qui influence sa capacité de stockage. Il y aurait ainsi dégénérescence des spermatozoïdes non éjaculés et réduction de leur nombre dans les éjaculats (Bedford, 1991).

2.3.3 Régulation

Les fonctions luminales et épithéliales de l'épididyme, sont sous un contrôle hormonal complexe.

2.3.3.1 Androgènes

2.3.3.1.1 Formation de l'épididyme

La différenciation sexuelle vers un phénotype mâle est un processus dépendant de la présence de testostérone. À l'état embryonnaire, la castration empêche l'apport en androgènes nécessaire au développement des canaux de Wolff en épидидymes. Le développement postnatal des épидидymes est aussi dépendant de la présence des testicules ou encore d'un apport exogène en testostérone. Le retrait des testicules chez les souris et lapins provoque une modification du diamètre du tubule de même que de la hauteur des cellules. Il y a aussi une diminution drastique du réticulum endoplasmique lisse et de la taille de l'appareil de Golgi en plus d'une augmentation du nombre de lysosomes et de vacuoles autophagiques. L'administration de testostérone permet de rétablir presque totalement les caractéristiques de l'épithélium de l'organe, sauf au niveau du segment

caudal. La castration affecte aussi certaines caractéristiques biochimiques (synthèse protéique, etc.) de l'épididyme (Orgebin-Crist, Danzo et Davies, 1975).

2.3.3.1.2 Régulation des fonctions de l'épididyme

Les diverses fonctions de l'épididyme au sein du tractus reproducteur mâle sont elles aussi largement régulées par les androgènes. Chez des animaux castrés, la survie des spermatozoïdes déjà produit est grandement diminuée. Il y a aussi réduction de la motilité des gamètes ainsi que de leur pouvoir fécondant. Plusieurs études ont concrètement démontré que la maturation et le stockage des spermatozoïdes dans l'épididyme dépendent d'un apport en testostérone. Le transport des spermatozoïdes est quant à lui indirectement dépendant de ces hormones (Orgebin-Crist, Danzo et Davies, 1975).

D'autres fonctions, qui ne sont pas en lien direct avec les spermatozoïdes, subissent aussi l'influence des androgènes. Le métabolisme intermédiaire en est un bon exemple. Le transport des ions à travers l'épithélium de l'épididyme est aussi dépendant de la présence de ces hormones (Brooks, 1983a ; Orgebin-Crist, 1996). De plus, la synthèse et la sécrétion de nombreuses protéines, autant chez les animaux matures qu'immatures, est aussi influencées par les androgènes (Toney et Danzo, 1989a ;1989b). Cette régulation de la synthèse protéique est variable selon les segments de l'épididyme et il semble que dans le segment initial elle soit aussi influencée par d'autres facteurs testiculaires (Brooks, 1983b). La synthèse et la sécrétion de petites molécules organiques de même que l'activité enzymatique de l'épididyme sont aussi contrôlées par les androgènes (Orgebin-Crist, 1996).

Dans de nombreux tissus, l'expression de certains gènes peut aussi être reliée à la présence d'androgènes. Toutefois, un aspect unique à l'épididyme est la régulation de l'expression très limitée de certains gènes dans des régions précises de l'épididyme. Par exemple, l'expression de l'ARNm de SGP-2 (sulfated glycoprotein-2 / clusterin), une protéine sécrétée majoritairement par les cellules principales du segment initial et de la tête de l'épididyme qui se lie aux spermatozoïdes lors de leur transit dans l'épididyme, est inhibée par la testostérone dans les sections du corps et de la queue de l'épididyme. L'expression de ce gène dans la portion proximale de l'épididyme n'est pas influencée par

des facteurs testiculaires (Cyr et Robaire, 1992). Plusieurs autres gènes sont aussi régulés de façon différente selon le segment de l'épididyme (Orgebin-Crist, 1996). L'expression de certains gènes présents principalement au niveau du segment initial de l'épididyme (CRES, 5a-réductase, GGT...) est plutôt régulée par des facteurs testiculaires autres que les androgènes (Hinton *et al.*, 1998)

2.3.3.1.3 Mécanismes d'action

L'épididyme reçoit les androgènes du liquide séminal provenant du testicule et de la circulation sanguine. La testostérone est l'androgène testiculaire dominant et elle atteint l'épididyme liée à l'ABP. Cependant, au niveau de l'épididyme, des études ont démontré que l'androgène primaire est la DHT et qu'elle est aussi liée à l'ABP (Turner *et al.*, 1984). La réduction de la testostérone en DHT est effectuée par la 4ène-stéroïde-5a-réductase, une enzyme dont le messenger et la protéine possèdent les plus fortes concentrations au niveau du segment initial de l'épididyme dès le jour postnatal 42 (Viger et Robaire, 1991 ; 1992 ; 1994). Les androgènes sont des stéroïdes et ils exercent leurs fonctions par l'intermédiaire d'un récepteur intracellulaire, nommé récepteur à androgènes (AR), qui est commun aux deux formes de l'hormone. La liaison de l'hormone à son récepteur provoque la translocation du complexe vers le noyau et la liaison avec la chromatine, ce qui induit l'expression de certains gènes spécifiques, processus commun dans plusieurs autres tissus (Brooks, 1983a). L'expression des récepteurs à androgènes est prédominante dans la tête de l'épididyme et les plus faibles niveaux se retrouvent dans le corps. De plus, cette expression est dépendante des androgènes testiculaires (Pujol et Bayard, 1979).

2.3.3.2 Autres hormones

Malgré une forte implication des androgènes dans la régulation des diverses fonctions de l'épididyme, d'autres hormones sont aussi reliées à ce processus. L'épididyme de différentes espèces possède des récepteurs spécifiques aux œstrogènes (Kwon *et al.*, 1997 ; Hess *et al.*, 1997b). Des études ont démontré que, dans l'épididyme de souris, les œstrogènes régulent la concentration des spermatozoïdes par la réabsorption du liquide séminal dans la région proximale de l'organe, par l'intermédiaire du récepteur

ER α (Hess *et al.*, 1997a). De plus, l'estradiol régule la synthèse et la sécrétion de différentes protéines dans l'épididyme de lapins immatures et matures (Toney et Danzo, 1989a ; 1989b). Ainsi, le système reproducteur mâle, incluant l'épididyme, de souris déficientes en ER α est largement affecté et celles-ci sont infertiles (Korach *et al.*, 1996 ; Hess *et al.*, 2000).

Le développement et le maintien de plusieurs épithéliums nécessitent un apport en vitamine A ou en acide rétinoïque, la forme active de la vitamine. Dans l'épididyme, une carence en vitamine A provoque le remplacement de l'épithélium normal par un épithélium stratifié et kératinisé. Chez le rat adulte, la portion proximale de l'épididyme exprime fortement l'ARNm et la protéine pour le récepteur RAR α . L'infertilité des souris transgéniques mâles déficientes en RAR α suite à une disfonction épидидymaire montre bien l'implication de la vitamine A dans la régulation des fonctions de l'organe (Costa *et al.*, 1997).

Certaines études ont aussi démontré la présence de sites de liaison de la prolactine dans l'épididyme. La prolactine est impliquée dans la régulation du transport des ions dans divers tissus, telles entre autres les glandes mammaires. Ceci suggère que cette hormone régule certaines fonctions de l'épididyme. De plus, la présence de récepteurs pour la prolactine dans le testicule et l'épididyme suggère un rôle pour cette hormone dans la stéroïdogenèse ou la spermatogenèse (Jabbour *et al.*, 1998).

Finalement, la vitamine D pourrait aussi être impliquée dans la régulation du flux de phosphore au niveau de l'épididyme. Plusieurs études laissent supposer que l'épididyme est une cible potentielle pour l'action de la vitamine D ou de ses métabolites. La présence de récepteurs, de même que les niveaux très élevés de certains métabolites de la vitamine D et de phosphore dans la queue de l'épididyme, permet de supposer une implication directe de cette hormone dans la régulation de certaines fonctions de l'épididyme (Kidroni *et al.*, 1983).

2.4 Barrière hémato-épididymaire

L'épididyme est largement impliqué dans la fonction reproductrice masculine et la régulation des fonctions de l'organe est complexe. Un élément essentiel au bon fonctionnement de l'organe est le micro-environnement spécifique que l'on retrouve dans la lumière du tubule. Cet environnement luminal est primordial à la maturation des gamètes. La composition du fluide séminal est maintenue grâce à la barrière hémato-épididymaire.

2.4.1 Fluide séminal

L'épididyme reçoit son fluide séminal du testicule. Ce liquide contient alors de l'eau, divers ions, protéines, glycoprotéines, petites particules de matières ainsi que les spermatozoïdes. Cette composition sera cependant largement modifiée tout au long de son parcours dans l'épididyme (Robaire et Hermo, 1988).

Pour permettre la maturation des spermatozoïdes, l'épididyme doit les préserver dans un environnement optimum. Par des mécanismes d'absorption et de sécrétion, l'épididyme régule finement le mouvement des molécules qui entrent ou sortent de sa lumière, contrôlant ainsi la composition de son fluide séminal. Le liquide en provenance des testicules perd jusqu'à 90% de son eau dans les canicules efférentes et les portions proximales de l'épididyme, où il y a un fort processus de réabsorption d'eau. Outre la réabsorption d'eau et de certains composés, la sécrétion de protéines et d'autres molécules organiques vient aussi modifier la composition du fluide séminal (Hinton et Palladino, 1995).

2.4.2 La barrière hémato-épididymaire

C'est la barrière hémato-épididymaire qui se forme entre les cellules principales de l'épithélium qui est responsable de l'environnement luminal unique de l'épididyme. Cette barrière permet de maintenir une différence entre la composition du plasma sanguin et celle du fluide séminal, comme le fait la barrière hémato-testiculaire au niveau des cellules de Sertoli du testicule.

La barrière hémato-épididymaire a été pour la première fois évoquée (1972) par Friend et Gilula dans une étude portant sur les jonctions serrées dans divers tissus. Ils démontrèrent alors que l'épithélium de l'épididyme présente un réseau de jonctions serrées extrêmement développé et que ces jonctions empêchent le transfert vers la lumière de l'organe de traceurs introduits dans la circulation sanguine (Friend et Gilula, 1972). L'évidence morphologique de cette barrière fût démontrée quelques années plus tard par Hoffer et Hinton (1984). Ceux-ci établirent alors la localisation précise de cette barrière, près de la surface bordant la lumière du tubule, et confirmèrent l'implication des jonctions serrées formées entre les cellules principales de l'épididyme comme étant les seules responsables de l'étanchéité de la barrière (Hoffer et Hinton, 1984).

Le développement de la barrière hémato-épididymaire est progressif. Contrairement à la barrière hémato-cervicale, celle de l'épididyme, tout comme celle du testicule, n'est pas étanche dès la naissance. Au jour huit postnatal, la barrière est largement perméable, et ce dans toutes les sections de l'épididyme, même si quelques jonctions serrées sont déjà présentes. Dès le jour quatorze, le nombre de jonctions étanches augmente et 75% de celles présentes dans la tête de l'organe sont imperméables. Au jour dix-huit, il y a toujours quelques fuites vers la lumière du tubule, plus importantes au niveau du corps et de la queue de l'épididyme, puis la barrière devient complètement fonctionnelle au jour 21 (Agarwal et Hoffer, 1989). Ainsi, la complétion de la barrière hémato-épididymaire a lieu vers la même période que son homologue testiculaire, démontrée comme acquérant son imperméabilité entre les jours seize et dix-neuf. Contrairement à l'épididyme toutefois, la présence des jonctions serrées dans le testicule n'est observée que lorsque la barrière commence à se former (Vitale, Fawcett et Dym 1973).

La barrière hémato-épididymaire est donc formée en bas âge chez le rat et permet dès lors le maintien d'un micro-environnement spécifique. L'intégrité de la barrière n'est toutefois pas maintenue durant toute la vie de l'animal. Une étude réalisée chez des rats Brown Norway a permis de démontrer qu'il y a une diminution avec l'âge de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la barrière, causé par des modifications au niveau des différentes protéines jonctionnelles. Cette diminution varie selon les segments et est

maximale dans le corps de l'épididyme (Levy et Robaire, 1999). Une perte d'intégrité a aussi été observé au niveau de la barrière hémato-testiculaire (Levy *et al.*, 1999).

Outre son implication dans le maintien d'un environnement favorable à la maturation des spermatozoïdes, la barrière joue aussi un rôle protecteur pour les gamètes puisqu'elle permet une séparation efficace entre les spermatozoïdes antigéniques et le système immunitaire. De plus, il est très probable que la barrière empêche l'entrée dans la lumière du tubule de métabolites ou d'agents toxiques (Hinton, 1985).

3.0 La communication cellulaire

La formation de la barrière hémato-épididymaire résulte de la présence de jonctions serrées entre les cellules principales de l'épithélium. Toutefois, les interactions cellulaires au niveau de cet organe sont beaucoup plus complexes (Fig. 2). Plusieurs études ont démontré la présence de jonctions serrées (Friend et Gilula, 1972 ; Cyr *et al.*, 1999 ; Gregory *et al.*, 2001), de jonctions d'adhérence (Cyr *et al.*, 1992 ; Andersson, Edvardsen et Skakkebaek, 1994), de jonctions lacunaires (Friend et Gilula, 1972 ; Cyr, Hermo et Laird, 1996) et de desmosomes (Friend et Gilula, 1972) entre les cellules principales de l'épididyme. Des jonctions lacunaires entre les cellules principales et les cellules basales de l'épithélium ont aussi été démontré par Cyr *et al.* (1996). Une bonne connaissance de la régulation et de la fonction de ces différentes interactions cellulaires est cruciale à la compréhension de la physiologie épididymaire. Les études réalisées dans le cadre de cette maîtrise se sont limitées aux trois premiers types de jonctions.

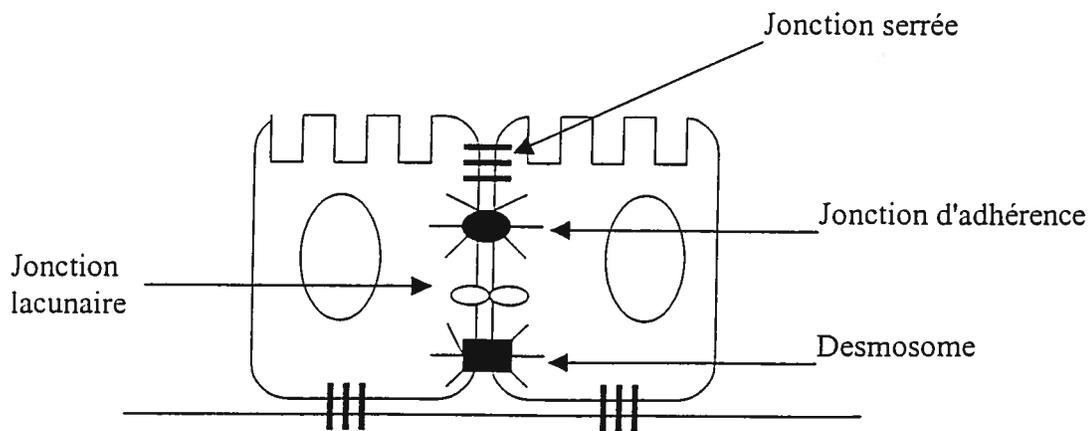


Figure 2 : Représentation schématique du complexe jonctionnel

3.1 La jonction d'adhérence

L'adhésion cellulaire est un processus clé dans la morphogenèse et dans la formation des tissus (Gumbiner, 1996). Les jonctions d'adhérence (Fig. 3) ont donc un rôle structural et sont aussi impliquées dans différentes voies de signalisation (Gumbiner, 1996 ; Vleminckx et Kemler, 1999). Les molécules d'adhésion cellulaire sont généralement des molécules transmembranaires de la famille des intégrines, cadhérines, immunoglobuline, etc. Parmi ces groupes de protéines, les cadhérines serviraient les interactions intercellulaires uniquement (Geiger et Ayalon, 1992 ; Vleminckx et Kemler, 1999). Ce sont ces dernières qui ont retenu notre attention.

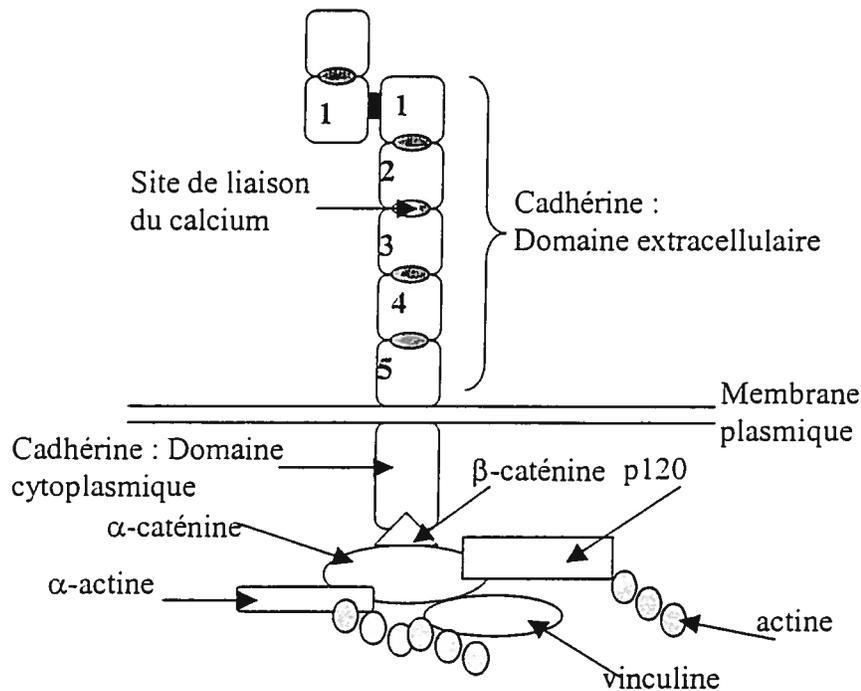


Figure 3 : Représentation schématique de la jonction d'adhérence. (Adaptée de Cyr et al., 2001)

3.1.1 Cadhérines

Les cadhérines sont les principales molécules d'adhésion impliquées dans le développement et le maintien des tissus. Elles appartiennent à une large famille de glycoprotéines transmembranaires formant des interactions homotypiques entre deux cellules et dont l'action est possible grâce au Ca^{2+} . Les cadhérines sont rattachées au

cytosquelette via les caténines, un groupe de protéines cytoplasmiques (Geiger et Ayalon, 1992).

La première cadhérine qui a été découverte est la cadhérine épithéliale, communément appelée E-cadhérine (E-cad). Peu après il y eut N-cadhérine (N-cad) et P-cadhérine (P-cad), aussi nommée en fonction du tissu où elles furent découvertes, soient le tissu neural et le placenta, respectivement. Depuis, plus de 30 cadhérines sont connues chez l'humain, classées parmi la famille des cadhérines classiques ou encore dans l'un des neuf autres sous-groupes. Des cadhérines ont aussi été identifiées chez plusieurs autres espèces : rat, poule, grenouille, mouche, nématode... Ces protéines ont un rôle important à jouer dans la reconnaissance et la sélection des cellules durant le développement, de même que dans le maintien de l'intégrité des tissus adultes (Gumbiner, 1996 ; Pötter, Bergwitz et Brabant, 1999).

3.1.1.1 Structure

Les cadhérines classiques I sont caractérisées par cinq domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et deux domaines cytoplasmiques. Le premier domaine extracellulaire contient une séquence CAR (cell adhesion recognition) caractérisée par une suite d'acides aminés HAV, alors que tous ces domaines possèdent des sites de liaison pour le Ca^{2+} . La portion cytoplasmique des cadhérines interagit avec diverses protéines (caténines, actinine et ZO-1) qui les relient au cytosquelette ou encore les impliquent dans diverses voies de signalisation. Le domaine cytoplasmique des cadhérines est hautement conservé. (Pötter, Bergwitz et Brabant, 1999 ; Cyr *et al.*, 2000).

3.1.1.2 Formation de la jonction

Les cadhérines classiques sont localisées aux domaines membranaires des jonctions d'adhérence. L'interaction entre les molécules d'adhésion de deux cellules adjacentes est nécessaire à la formation de jonctions intercellulaires. Les cadhérines agissent comme molécules d'adhésion cellulaire et leur liaison aux caténines est essentielle à la promotion de cette adhésion. Ce complexe jonctionnel nécessite

l'interaction de β -caténine (β -cat) ou de γ -caténine (γ -cat ou plakoglobine) avec le domaine cytoplasmique des cadhérines, interaction qui prend naissance au niveau du réticulum endoplasmique lors de la synthèse des cadhérines. Une autre caténine, p120^{cas}, est aussi liée au domaine cytoplasmique des cadhérines. Toutefois, celle-ci n'implique aucune liaison avec le cytosquelette et c'est plutôt son niveau de phosphorylation qui influence l'adhésion cellulaire. L' α -caténine (α -cat) est intégrée au complexe lors de l'insertion de celui à la membrane plasmique et est reliée à β -cat ou γ -cat, selon la structure pré-existante. Le complexe d'adhésion est complété par l'interaction directe, ou via l' α -actinine, de l' α -cat aux microfilaments du cytosquelette. L' α -cat est aussi reliée à la vinculine, qui permet l'organisation des jonctions adhésives, et à Zonula occludens-1 (ZO-1), une composante de la jonction serrée. La jonction d'adhérence est formée par un regroupement de plusieurs de ces complexes jonctionnels (Pötter, Bergwitz et Brabant, 1999 ; Cyr *et al.*, 2000 ; Rowlands *et al.*, 2000). E-cad a un rôle régulateur à jouer dans la formation de ce complexe cadhérine/caténine. Dans des embryons de souris déficients en E-cad, il y a une forte réduction de l'expression de α - et β -cat, de même qu'une modification de la localisation de ces protéines, de ZO-1 et des filaments d'actines (Ohsugi *et al.*, 1997). De plus, le taux de renouvellement rapide des cadhérine (entre 5 et 10 heures dans des cultures confluentes de cellules épithéliales) suggère une forte régulation de ce système (Shore et Nelson, 1991 ; Gumbiner, 2000).

3.1.1.3 Fonctions des cadhérines

Les cadhérines sont impliquées dans la jonction d'adhérence et permettent ainsi l'adhésion entre deux cellules adjacentes. L'établissement des jonctions adhérentes est aussi essentiel à la formation des autres types de jonctions. E-cad, par exemple, joue un rôle crucial dans la formation des jonctions serrées, puisqu'en bloquant l'expression de la protéine ces dernières ne sont plus formées. La présence des jonctions d'adhérence est donc nécessaire à la localisation des protéines de jonctions serrées occludine et ZO-1 (Gumbiner, Stevenson et Grimaldi, 1988 ; Balda *et al.*, 1993 ; Sheth *et al.*, 2000). La formation des jonctions lacunaires (gap) nécessite aussi l'adhésion des cellules (Meyer *et*

al., 1992). En particulier, E-cad régule la transcription de la protéine de jonction gap connexine43 (Cx43) (Jongen *et al.*, 1991).

Les cadhérines ont aussi d'autres fonctions. Celles-ci permettent, entre autres, la sélection de cellules de même type dans le but de former des agrégats, étape essentielle au développement d'un embryon et à la morphogenèse. E-cad est essentielle à l'embryogenèse. Des embryons déficients en E-cad sont en mesure de traverser l'étape de compaction (stade 8 cellules) grâce à la contribution maternelle de la protéine, mais ils sont incapables de former un épithélium trophoctoderme et les embryons meurent avant l'implantation (Larue *et al.*, 1994). N-cad est requise pour la sélection des cellules lors de la morphogenèse et joue un rôle crucial durant la formation de tissus tel le coeur. Les embryons de souris déficientes pour cette cadhérine meurent des suites d'une mauvaise formation du tube neural et du myocardium lors des premiers stades de l'embryogenèse (Rowlands *et al.*, 2000). Contrairement aux précédentes cadhérines, la présence de P-cad n'est pas essentielle à la survie des embryons, qui donneront lieu à des souris viables et fertiles. Toutefois, l'observation de souris déficientes en P-cad a permis de démontrer l'implication importante de cette protéine dans le développement des glandes mammaires (Radice *et al.*, 1997).

L'expression des cadhérines est aussi reliée au maintien de l'intégrité des tissus. L'implication de P-cad dans l'intégrité de la structure des glandes mammaires en est un bon exemple. Cette cadhérine inhibe la croissance de ces glandes. De plus, la formation de tumeurs est fréquemment reliée à une baisse ou une absence de certaines cadhérines. E-cad, élément essentiel au maintien du stade épithélial différencié, est un supresseur de tumeur important, limitant la progression et la formation de métastases (Rowlands *et al.*, 2000).

Les cadhérines ont donc un rôle essentiel à jouer dans les interactions physiques entre les cellules. Toutefois, les cadhérines sont aussi impliquées diverses voies de signalisation importantes dans la différenciation, la prolifération, la migration et l'apoptose des cellules, de même que dans la régulation de certains gènes. La liaison des cadhérines avec β -cat les implique dans un long processus de développement des

embryons par l'intermédiaire du patron de signalisation WNT (Gumbiner, 1996 ; Cyr *et al.*, 2000 ; Gumbiner, 2000).

3.1.1.4 Les cadhérines dans le testicule et l'épididyme

L'expression des cadhérines et la formation de jonctions adhérentes sont donc essentielles à divers niveaux de la morphogenèse et du maintien de l'intégrité des tissus différenciés, incluant le testicule et l'épididyme, organes qui expriment plusieurs cadhérines.

3.1.1.4.1 Le testicule

Les premières études portant sur la présence des cadhérines dans le testicule de rat ont pu identifier la présence du messager de P- et N-cad, alors que celui de E-cad est absent (Cyr, Blaschuk et Robaire, 1992). D'autres recherches ont par la suite démontré que le testicule de rat exprime, toutes familles de cadhérines confondues, l'ARNm de 24 cadhérines différentes (Johnson, Patel et Boekelheide, 2000). Ces messagers, de même que ceux de quatre autres cadhérines classiques ont aussi été identifiés chez la souris (Munro et Blaschuk, 1996). Le tableau 1 présente une synthèse des informations à ce sujet.

Tableau 1- Cadhérines dans le testicule

Protéine de jonction	Présence du messager	Présence de la protéine	Localisation de la protéine	Références
N-cad (prédominante)	A tout âge ; augmentation au jour 21	Apparition au jour 21	Entre les cellules de Sertoli et entre les spermatozoïdes	Cyr et al, 1995 ; Munro et al, 1996
P-cad	De la naissance au jour 14 (max. à jour 7)	-	Cellules de Sertoli et cellules péritubulaires	Cyr et al, 1992 ; Munro et al, 1996
E-cad	Du jour 15 de la gestation au jour postnatal 7	Du jour 15 de la gestation au jour postnatal 3	-	Wu et al, 1993 ; Byers et al, 1994 ; Cyr et al, 1995 Munro et al, 1996
	A tout âges	-	-	Johnson et al, 2000

Dans le testicule, N-cad semble être la cadhérine prédominante, alors que P-cad semble être présente pendant une période plus restreinte. La présence de E-cad dans le testicule est quant à elle plus controversée. E-cad est présente dans presque toutes les cellules épithéliales étudiées. Le testicule fait toutefois exception à la règle, puisque la majorité des études ont démontré que le messenger de cette cadhérine n'est pas présent chez l'adulte (Cyr, Blaschuk et Robaire, 1992 ; Byers *et al.*, 1994 ; Munro et Blaschuk, 1996). Une étude exhaustive par RT-PCR des cadhérines présentes dans le testicule de rat aurait permis de détecter le messenger à tous les stades du développement, incluant l'âge adulte (Johnson, Patel et Boekelheide, 2000). Toutefois, cette étude est en contradiction avec d'autres (Munro et Blaschuk, 1996), et la taille relativement petite du fragment amplifié par le premier groupe laisse une forte place à une amplification non spécifique.

Les messagers de d'autres cadhérines ont aussi été identifiées dans le testicule. De plus, la présence des autres composantes principales de la jonction d'adhérence, α -cat et β -cat, ont aussi été localisées par immunohistochimie dans le tissu interstitiel et les tubules séminifères du testicule. Chez le rat et la souris, les complexes jonctionnels des cellules de Sertoli s'établissent entre les jours dix et vingt (Byers *et al.*, 1994).

3.1.1.4.2 L'épididyme

À ce jour, seulement quelques cadhérines ont été identifiées dans l'épididyme. Les études publiées ont porté sur la présence des messagers et des protéines de N-, P- et E-cad. Cadhérine prédominante dans l'épididyme, N-cad est absente dans l'épididyme de rat et d'humain (Cyr *et al.*, 1992 ; Andersson, Edvardsen et Skakkebaek, 1994). Dans cet organe, E-cad semble être prédominante (Cyr et Robaire, 1991 ; Cyr *et al.*, 1992 ; Cyr, Hermo et Robaire, 1993). Toutefois, la présence de P-cad et K-cad a aussi été démontré (Cyr et Robaire, 1991 ; Amini et Cyr, non publié). L'expression différentielle des cadhérines dans l'épididyme suggère des rôles distincts pour chacune d'elles. De plus, la présence de E-cad dans le cytoplasme suggère une synthèse de la protéine dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et son transport dans des vésicules vers la membrane plasmique, où il pourra y avoir formation des jonctions. Le tableau 2 présente

un résumé des informations concernant la présence des cadhérines et autres protéines du complexe de jonction adhérente dans l'épididyme.

Plusieurs cadhérines sont donc présentes dans l'épididyme. Des études ont aussi permis de démontrer que le complexe cadhérines-caténines est présent dans l'organe et qu'il est en tout point semblable à celui existant dans d'autres tissus (DeBellefeuille, Hermo et Cyr, 1999). Des études d'immunoprécipitations ont aussi démontré la formation du complexe cadhérines-caténines dans l'épididyme (DeBellefeuille et Cyr, non publié).

Tableau 2- Cadhérines dans l'épididyme

Protéine de jonction	Présence du messager	Présence de la protéine	Localisation de la protéine	Références
N-cad	Absent (rat et humain)	Absente (rat et humain)	-	Cyr et al, 1992 ; Andersson et al, 1994
E-cad	À tout âge (max. jour 42) CT=CS < IS =CA (5fois supérieur)	Niveaux (IS<CT<CS) >CA	Cytoplasme des cellules principales	Cyr et al, 1991 ; 1992 ; 1993 ; 1995
P-cad	À tout âge (max. jour 7 à 14) IS=CT=CS=CA	-	-	Cyr et al, 1991
K-cad	-	IS<CT<CS<CA	Cytoplasme des cellules principales	Amini et al, non publié
a-caténine et b-caténine	-	À partir du jour 7 dans IS, CT et CA À partir du jour 28 dans CA	Le long de la membrane plasmique entre les cellules principales adjacentes et entre les cellules principales et les cellules basales et claires	DeBellefeuille et al, 1999

Des études ont aussi démontré la régulation du messager de E-cad par les niveaux d'androgènes circulants et plus particulièrement par la testostérone. Chez des animaux ayant subi une orchidectomie bilatérale, les niveaux d'ARNm de E-cad dans la tête et la

queue de l'épididyme sont diminués de 75%, alors que dans le corps de l'organe cette diminution est de 90%. L'exposition des animaux orchidectomisés à différentes doses de testostérone permet le rétablissement partiel concentration-dépendante des niveaux du messager. Dans la tête et la queue de l'épididyme, de faibles doses de testostérone permettent un rétablissement partiel (75%) des niveaux de E-cad, alors que dans le corps des doses supérieures sont nécessaires. Des études d'orchidectomie unilatérale ont aussi permis de démontrer que les niveaux d'androgènes circulants sont suffisants pour maintenir les niveaux d'ARNm de E-cad dans l'épididyme (Cyr *et al.*, 1992).

La présence de K-cad serait aussi dépendante des androgènes testiculaires. Des études d'orchidectomie ont démontré une disparition complète de K-cad, alors que l'administration de testostérone permet la réexpression de celle-ci (Amini et Cyr, non publié).

3.2 La jonction lacunaire (gap)

L'adhésion cellulaire est essentielle à la morphogenèse et à l'organogenèse. De plus, la présence de la jonction d'adhérence permet la formation des autres types de jonctions, dont la jonction lacunaire. Les jonctions lacunaires, aussi appelées jonctions gap, sont des canaux transmembranaires qui permettent le passage direct, mais de façon sélective, de petites molécules, ions, métabolites et seconds messagers d'un poids inférieur à 1000 daltons, d'une cellule à une autre (Bruzzone, White et Paul, 1996 ; Simon et Goodenough, 1998). Pour former les canaux transmembranaires, deux connexons, un de chacune des cellules, doivent être liés. La liaison de deux connexons permet la formation d'un canal hydrophile traversant les deux membranes lipidiques et plusieurs de ces canaux sont nécessaires à la formation de la jonction gap. Ce sont ces canaux qui permettent la communication directe entre les cytoplasmes des deux cellules adjacentes (Bruzzone, White et Paul, 1996 ; Munari-Silem et Rousset, 1996 ; Lo, 1999). Ces connexons sont des structures hexamériques, formées par l'oligomérisation de six protéines structurales (Fig. 4). Chez les invertébrés, ces protéines sont de la famille des innexines, alors que chez les vertébrés, la grande famille des connexines est impliquée (Simon et Goodenough, 1998 ; Lo, 1999).

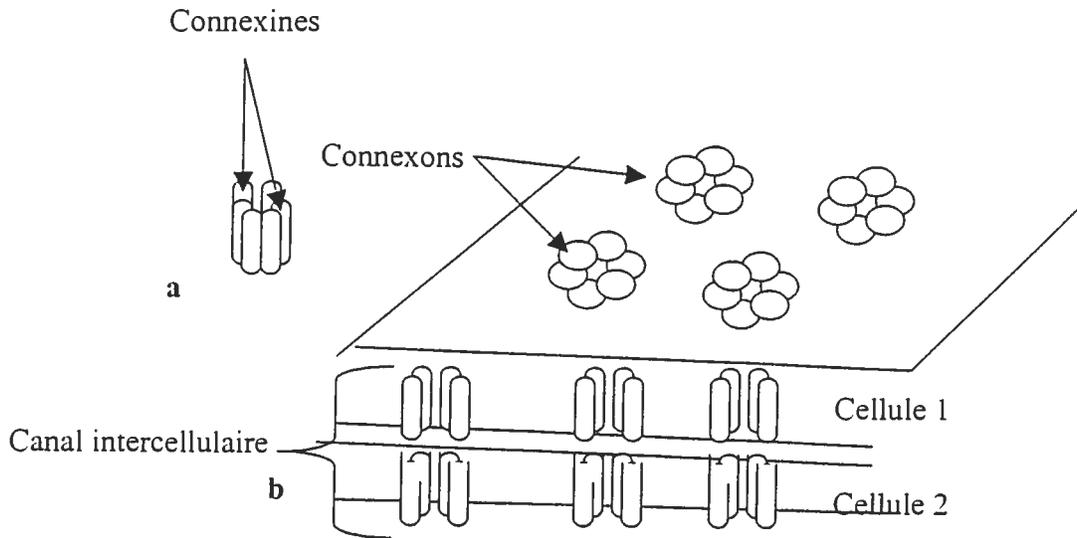


Figure 4 : Représentation schématique de la jonction serrée.
 (a) connexon (b) plaque jonctionnelle formée de plusieurs connexons

3.2.1 Connexines

Le terme connexine a été introduit en 1974 par Goodenough pour identifier les protéines intégrales formant les jonctions gap. La nomenclature utilisée auparavant consistait à associer ce terme à l'organe d'origine de même qu'à la masse moléculaire de la protéine (Enders, 1993). Plusieurs études ont par la suite démontré que différentes connexines sont présentes dans un même organe et depuis la nomenclature se limite à la masse moléculaire (ex. Cx43) (Lo, 1999).

Le clonage de la première connexine fut réalisé en 1986. Deux équipes avaient alors cloné une protéine de 32 kD présente au niveau des jonctions gap du foie chez l'humain et le rat (Enders, 1993). Depuis, plus de quatorze connexines différentes ont été identifiées chez le rat et la souris et d'autres études laissent présager que le nombre de connexines existantes pourrait être supérieur à vingt (Simon et Goodenough, 1998 ; Spray, 1998). Les différentes connexines présentent une très forte homologie dans leurs domaines extracellulaires (50-80%), leur différence étant principalement située au niveau des parties cytoplasmiques (Goodenough, Goliger et Paul, 1996). Chez les mammifères, pratiquement tous les types cellulaires, à un stade ou un autre du développement, expriment une ou plusieurs connexines (Evans, 1994 ; Bruzzone, White et Paul, 1996). La majorité des tissus expriment au moins deux connexines différentes. Toutefois,

certains types cellulaires différenciés font exception. En effet, les connexines sont absentes de quelques neurones, de la majorité des cellules sanguines, des spermatozoïdes et des myocytes (Bruzzone, White et Paul, 1996). De plus, une même connexine peut se retrouver dans plusieurs types de cellules ou organes, telle la Cx43 qui est ubiquiste. La Cx43 a été identifiée dans presque tous les tissus, accompagnée d'une autre connexine. Toutefois, certaines connexines ont une distribution plus limitée (Bruzzone, White et Paul, 1996 ; Munari-Silem et Rousset, 1996).

3.2.1.1 Structure

Les connexines sont membres d'une famille de protéines intégrales très bien conservée et partagent une même séquence de motifs structuraux. Chaque connexine possède quatre domaines transmembranaires, deux domaines extracellulaires et trois régions cytoplasmiques, incluant les extrémités N- et C-terminales. Les deux domaines extracellulaires sont très conservés. La très courte portion N-terminale et les domaines transmembranaires le sont aussi, alors que le domaine cytoplasmique et la partie carboxy-terminale, cible pour les modifications post-traduction ainsi que pour la phosphorylation, varient largement en séquence et en longueur selon la connexine étudiée (Enders, 1993 ; Bruzzone, White et Paul, 1996 ; Goodenough, Goliger et Paul, 1996 ; Simon et Goodenough, 1998).

3.2.1.2 Formation de la jonction

Les connexines représentent donc l'unité structurale des connexons. La jonction lacunaire est quant à elle formée par un rassemblement de canaux transmembranaires. Les mécanismes de formation de ces canaux ne sont pas encore bien connus. Il semblerait toutefois que les connexines nouvellement synthétisées demeurent sous forme de structures monomères au début de leur voyage le long de la route de sécrétion. L'oligomérisation des connexines prend place dans la partie proximale de la transition ER-Golgi (Evans, 1994 ; Bruzzone, White et Paul, 1996 ; Munari-Silem et Rousset, 1996 ; Spray, 1998).

Les connexons sont donc formés avant leur transfert vers la membrane plasmique. Ainsi, six connexines seront oligomérisées de façon à ce que leur troisième domaine transmembranaire se retrouve du côté de la lumière du connexon (Spray, 1998). L'arrangement de six connexines de même type donne lieu à un connexon homomérique alors que l'assemblage de connexines multiples forme un connexon hétéromérique. La différence de perméabilité des connexons est liée aux type des connexines le formant (Bruzzone, White et Paul, 1996 ; Simon et Goodenough, 1998). Les connexons sont transportés de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique à l'aide de vésicules (Munari-Silem et Rousset, 1996).

La formation d'un connexon n'est toutefois pas l'étape finale menant à la formation de jonctions lacunaires. La création d'un canal intercellulaire nécessite la liaison entre les connexons de deux cellules adjacentes. Suite à leur transfert vers la membrane plasmique, la reconnaissance entre les connexons de cellules voisines est rapide et la formation d'un canal jonctionnel réalisée dans les secondes ou minutes suivantes. Cela se produit grâce à des interactions non-covalentes des domaines extracellulaires des connexines en provenance de chacun des connexons (Munari-Silem et Rousset, 1996). Pour que les canaux soient fonctionnels, il devra y avoir ouverture des deux connexons, phénomène influencé à la fois par des facteurs intrinsèques et extrinsèques, tels des molécules d'adhésion, lectines, lipides, etc. Ainsi, la présence de connexines n'est pas suffisante pour induire la communication entre deux cellules. Certaines molécules d'adhésion cellulaire sont aussi requises (Bruzzone, White et Paul, 1996). La possibilité de communication par l'intermédiaire des jonctions gap n'est donc pas automatiquement corrélée aux niveaux de connexines présents (Lo, 1999).

La très courte demi-vie des connexines, une à deux heures pour la Cx43 et entre cinq et dix heures pour les connexines du foie, laisse présager un renouvellement total des protéines formant les jonctions gap plusieurs fois par jour. Il y a donc un turnover extrêmement rapide des connexines (Enders, 1993 ; Evans, 1994 ; Spray, 1998). Les mécanismes par lesquels les connexines sont retirées de la membrane plasmique et dégradées ne sont pas totalement connus. Des anneaux de jonctions lacunaires ont été observés à l'intérieur de cellules, représentant des jonctions gap internalisées qui sont sur

la voie de la dégradation. Une cellule serait en mesure de dégrader son propre connexon de même que celui de la cellule adjacente, après phagocytose de celui-ci. Il y a aussi ubiquitination des connexines (Munari-Silem et Rousset, 1996 ; Spray, 1998).

3.2.1.3 Fonctions des connexines

La localisation de jonctions gap à presque tous les niveaux de l'organisme chez les mammifères suggère leur implication dans la régulation de diverses fonctions. Ces jonctions régulent la croissance et la différenciation cellulaire en permettant le passage des molécules de signalisation d'une cellule à l'autre. Une perte de la communication via les jonctions gap mène à une croissance incontrôlée des cellules (Lo, 1999). Ces canaux intercellulaires permettent aussi la régulation des contractions cardiaques et celles des muscles lisses, la transmission des synapses électriques, les sécrétions hormonales du pancréas, de même que plusieurs autres fonctions. De plus, les jonctions lacunaires sont impliquées dans le processus de morphogenèse (Bruzzone, White et Paul, 1996 ; Munari-Silem et Rousset, 1996).

La multitude de connexines existantes et leurs localisations très variées rendent difficile l'étude de leurs fonctions respectives. Toutefois, l'utilisation de souris transgéniques a permis de déterminer l'implication de quelques-unes de ces connexines à divers niveaux du développement des animaux. Le tableau 3 présente diverses informations à ce sujet.

3.2.1.4 Les connexines dans le testicule et l'épididyme

Les jonctions lacunaires sont présentes à presque tous les niveaux de l'organisme, incluant les tissus du système reproducteur mâle. Quelques études ont déjà démontré la présence de plusieurs connexines dans le testicule des rongeurs et de quelques-unes dans l'épididyme.

Tableau 3- Phénotypes des souris knock-out pour certaines connexines

Connexine	Distribution	Knock-out
Cx50	crystallin	Développement de cataractes
Cx46	crystallin	Développement de cataractes
Cx43	ubiquiste	Homozygote : mort postnatale rapide ; malformation du cœur (région du cône) qui bloque la circulation ventriculaire et empêche la bonne oxygénation du sang * fœtus prélevés par césariennes : diminution des cellules germinales dans les gonades
Cx40	-	Viables et fertiles ; conduction ventriculaire diminuée et arythmies plus fréquentes
Cx37	-	Femelles infertiles ; mauvais développement des follicules ovariens et absence d'ovulation
Cx32	-	Souris viables et fertiles ; augmentation des tumeurs hépatiques ; anomalie du métabolisme du glucose hépatique ; diminution de la Cx26 ; aucune neuropathologie avant 4 mois * Chez l'humain, la maladie de Charcot-Marie-tooth est causée par des mutations sur le gène de la Cx32 ; neuropathologie causée par une dégénérescence progressive des nerfs périphériques
Cx26	-	Souris non viables ; mort au jour embryonnaire 11 des suites d'un transfert plus lent du glucose non métabolisé à travers le placenta * Chez l'humain, des mutations sur le gène de la Cx26 sont responsables de la surdit�e autosomale dominante ou récessive.
Références : Guerrero et al, 1997 ; Simon et al, 1998 ; Junega et al, 1999 ; Willecke et al, 1999		

3.2.1.4.1 Le testicule

La première observation de jonctions gap entre les cellules de Sertoli adjacentes a été réalisée en 1970 (Enders, 1993). Depuis, plusieurs connexines ont été identifiées dans le testicule. Une étude récente a permis de démontrer par RT-PCR la présence de l'ARNm de neuf connexines dans les cellules germinales, huit dans les cellules de Sertoli

et cinq dans les cellules péritubulaires de rat. Ainsi, les tubules séminifères présentent un profil d'expression de connexines assez complexe. Les messagers des Cx26, -31, -32, -33, -37, -40, -43, -45 et -50 sont largement amplifiés, alors que ceux codant pour les Cx31.1 et -46 sont plus rares. En tout, l'ARNm de onze connexines est présent dans le testicule et certaines études suggèrent que dix d'entre eux pourraient être traduits en protéines (Zhang et Nicholson, 1989 ; Hoh, John et Revel, 1991 ; Haefliger *et al.*, 1992 ; Hennemann *et al.*, 1992 ; Risley *et al.*, 1992 ; Dahl *et al.*, 1996). Des études de transfert de colorant (dye coupling) ont démontré la présence de jonctions lacunaires fonctionnelles dans le testicule chez le rat et la souris (Risley *et al.*, 1992 ; Batias *et al.*, 2000). Le tableau 4 décrit les connexines présentes dans le testicule

Tableau 4- Connexines dans le testicule

Connexine	Présence	Localisation de la protéine	Références
Cx43 (rat, souris, homme)	Dès le jour postnatal 5	Cellules de Leydig et de Sertoli, aussi à la surface des cellules péritubulaires et dans le cytoplasme des spermatoocytes et spermatogonies * Dépendante du type cellulaire, de la maturation du testicule et de l'âge de l'animal et du stade du tubule ;	Risley et al, 1992 ; Tan et al, 1996; Steger et al, 1999; Batias et al, 2000
Cx37	absente	* cette protéine est localisée dans l'endothélium des vaisseaux sanguins présents dans le tissu interstitiel	Tan et al, 1996
Cx33	Dès le jour postnatal 11	Colocalise avec la Cx43 au niveau basal des cellules de Sertoli de même que dans la portion adluminale des tubules	Tan et al, 1996
Cx32	adulte	Région apicale des tubules séminifères	Tan et al, 1996
Cx26	adulte	Région apicale des tubules séminifères	Tan et al, 1996

3.2.1.4.2 L' pididyme

Le testicule présente donc un assemblage complexe de plusieurs connexines. Dans l'épididyme, la présence des jonctions gap au niveau de la partie apicale et latérale entre deux cellules principales adjacentes fut d'abord décrite par Friend et Gilula en 1972. Malgré tout, très peu d'études ont porté sur la présence des connexines dans l'épididyme.

La Cx43 est présent dans l'épididyme de rat adulte, mais contrairement à ce que Friend et Gilula (1972) ont démontré pour les jonctions gap, celle-ci ne se localise pas entre les cellules adjacentes principales, mais plutôt entre les cellules principales et les cellules basales de l'organe. La Cx43 dans l'épididyme de rat adulte est régulée par les androgènes dans le segment initial de même qu'au niveau des cellules myoïdes (Cyr, Hermo et Laird, 1996).

La localisation de la Cx43 entre les cellules basales et principales de l'épididyme suggère la présence de jonctions gap entre deux types cellulaires différents. Cela laisse aussi supposer que d'autres connexines sont présentes dans l'épididyme, connexines qui sont responsables de l'observation de jonctions gap entre les cellules principales adjacentes. Une étude menée par Dufresne et Cyr a permis d'identifier la présence des messagers d'au moins cinq connexines différentes (Cx26, -30.3, -31.1, -32, et -43) dans l'épididyme de rat (Dufresne *et al.*, 2002). Le tableau 5 résume la situation des connexines dans l'épididyme.

Tableau 5- Connexines dans l'épididyme

Connexine	Présence du messageur	Présence de la protéine
Cx26	IS, CT, CS : niveaux élevés jusqu'à jour 35 puis diminution CA : Niveaux très faibles, non détectables par analyse Northern, mais amplifiable par RT-PCR	Présente entre jour 21 et 91 à des niveaux similaires Jeunes animaux : localisée à la membrane plasmique entre les cellules principales adjacentes Adultes : marquage plus clairsemé et visible seulement entre quelques cellules principales
Cx30.3	Niveaux très faibles, non détectables par analyse Northern, mais amplifiable par RT-PCR	-
Cx31.1	Niveaux faibles au jour 7 ; maximum au jour 28	-
Cx32	Niveaux non détectables au jour 7 ; maximum au jour 63	Présente entre les cellules principales adjacentes ; absente dans la portion distale de la queue
Cx43	-	Présente entre les cellules principales et les cellules basales ; aussi présente dans les cellules myoïdes
Références : Cyr et al, 1996 ; Dufresne et al, 2002		

3.3 La jonction serrée

L'adhésion et la communication cellulaires sont des éléments clés dans la croissance et le développement de cellules et tissus. Toutefois, outre les jonctions adhérentes et lacunaires, un autre type d'interaction cellulaire est crucial à la croissance et à la différenciation des cellules : la jonction serrée (Balda et Matter, 1998).

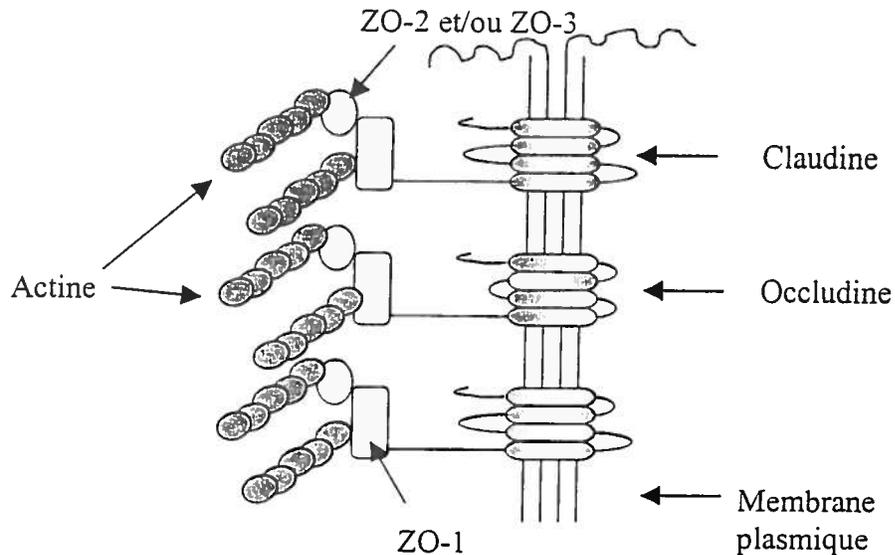


Figure 5. Représentation schématique d'une jonction serrée

La jonction serrée se localise généralement dans la portion apicale supérieure du complexe jonctionnel. Ces jonctions forment un anneau étanche encerclant la cellule à l'extrémité apicale des membranes latérales (Fig. 5). Elles agissent comme une barrière semi-perméable, limitant le passage des molécules par l'espace interstitiel (Balda et Matter, 1998 ; Goodenough, 1999). Des jonctions imperméables bloquent le transfert de colorant de la face extracellulaire vers la lumière

(Friend et Gilula, 1972 ; Bryant, 1997 ; Goodenough, 1999). La composition exacte de ce type de jonction n'est pas connue et semble varier selon les tissus et le type de jonction serrée. Toutefois, plusieurs protéines ont été identifiées comme étant impliquées dans la formation des jonction serrées (Tsukita, Furuse et Itoh, 1999 ; Cyr *et al.*, 2000).

3.3.1 Les protéines de jonction serrée

La première protéine identifiée au niveau de la jonction serrée fut Zonula occludens-1, communément appelée ZO-1 (Balda et Matter, 1998 ; Citi, 1993). Cette protéine, membre de la famille des MAGUKs (Membrane-Associated Guanylate Kinases), s'associe directement aux filaments d'actine de même qu'à occludine, une autre composante de la jonction serrée (Fanning *et al.*, 1998). Toutefois, ZO-1 est aussi présente au niveau des jonctions d'adhérence (Tsukita, Furuse et Itoh, 1999). D'autres protéines MAGUK ont aussi été identifiées dans les jonctions serrées soient ZO-2 et ZO-3. ZO-2 relie occludine au cytosquelette d'actine tout en formant un hétérodimère avec ZO-1 (Tsukita, Furuse et Itoh, 1999). Des expériences ont démontré l'interaction de ZO-3 avec occludine et ZO-1 (Haskins, 1998). Outre ces protéines périphériques membranaires, trois autres protéines sont concentrées au niveau des jonctions serrées. Il s'agit de cinguline, de l'antigène 7H6 et de symplekine. Cependant, très peu de données sont disponibles au sujet de ces protéines et de leur structure. Quelques molécules de signalisation sont aussi localisées à proximité des jonctions serrées. Toutefois, l'implication réelle de ces protéines dans le fonctionnement des jonctions serrées demeure inconnue (Balda et Matter, 1998 ; Tsukita, Furuse et Itoh, 1999).

La première protéine transmembranaire identifiée au niveau de la jonction serrée fut occludine. Occludine est une protéine intégrale localisée exclusivement dans les jonctions serrées. La formation des filaments associés aux jonctions serrées lors de la transfection d'occludine dans des cellules ne possédant pas de telles jonctions a permis de démontrer qu'occludine est une composante fonctionnelle de ce type d'interaction cellulaire (Furuse *et al.*, 1993 ; Tsukita et Furuse, 1998). Cependant, la découverte de cellules souches embryonnaires déficientes en occludine capables de se différencier et de former un épithélium polarisé possédant des jonctions serrées a soulevé un doute concernant l'exclusivité de cette protéine intégrale (Saitou *et al.*, 1998). De plus, la création de souris knock-out pour le gène d'occludine a permis de confirmer le fait qu'occludine n'est pas la seule protéine intégrale des jonctions serrées (Saitou *et al.*, 2000).

La découverte de claudine-1 et -2 (Furuse *et al.*, 1998), et de plusieurs autres membres dans la famille des claudines (Morita *et al.*, 1999a) comme étant des protéines membranaires intégrales des jonctions serrées, fut très importante (Anderson et Van Itallie, 1999). À ce jour, vingt claudines ont été identifiées, dont certaines présentent un patron de distribution limité alors que d'autres sont largement présentes (Rahner, Mitic et Anderson, 2001). De plus, il semble que les claudines ne sont pas localisées exclusivement au niveau des jonctions serrées (Gregory *et al.*, 2001 ; Rahner, Mitic et Anderson, 2001). Des études ont démontré que ces protéines sont colocalisées avec occludine. Toutefois, l'absence de cette dernière n'empêche pas la formation des filaments de jonctions serrées par les claudines (Cyr, 2001).

3.3.1.1 La structure des protéines de la jonction serrée

Plusieurs composantes de la jonction serrée étant encore mal caractérisées, cette section se limitera à la description des protéines membranaires intégrales, occludine et claudine.

Occludine est une phosphoprotéine de 65 kDa possédant quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires. La courte extrémité N-terminale et la longue chaîne C-terminale sont localisées dans le cytoplasme (Furuse *et al.*, 1993). Sa liaison avec ZO-1 se fait par l'intermédiaire de son domaine cytoplasmique C-terminal. Le clonage d'occludine chez plusieurs espèces a démontré une forte conservation de certaines régions alors que d'autres ne le sont que très faiblement (Balda et Matter, 1998).

Les claudines ne possèdent aucune séquence similaire à occludine, malgré le fait que ces petites protéines (20 à 25 kDa) possèdent aussi quatre domaines transmembranaires de même que leurs extrémités N- et C-terminales du côté cytoplasmique (Furuse *et al.*, 1998 ; Morita *et al.*, 1999a). Malgré une structure semblable, certaines claudines possèdent très peu d'homologie dans leur séquence en acides aminés (Rahner, Mitic et Anderson, 2001). La distribution des différentes claudines est très variée. Tous les membres de la famille des claudines sont cependant impliqués dans la formation des jonctions serrées (Tsukita et Furuse. 2000a ; 2000b ; Rahner, Mitic et Anderson, 2001).

3.3.1.2 Formation de la jonction

La jonction serrée est formée d'un co-polymère de claudines et d'occludine. Cette dernière est reliée aux filaments d'actine par ZO-1 et ZO-2. Ces protéines périphériques interagissent entre elles ainsi qu'avec ZO-3, mais il est fort probable qu'elles se lient aussi aux claudines (Tsukita, Furuse et Itoh, 1999). Les boucles extracellulaires des claudines ou d'occludine de deux cellules adjacentes sont liées pour former la jonction serrée (Goodenough, 1999). Des études ont démontré la possibilité pour des claudines différentes d'adhérer l'une à l'autre de façon hétérophilique (Tsukita et Furuse, 2000b).

L'assemblage des jonctions serrées est un processus hautement contrôlé. Sa régulation implique plusieurs voies de signalisation incluant les protéines-G, les phospholipases C, les protéines kinases C, ainsi que la calmoduline. La protéine d'adhésion cellulaire E-cad semble être un élément clé dans la formation et la dissociation de la jonction serrée (Balda et al., 1993 ; Balda et Matter, 1998). En ce qui concerne occludine, sa portion C-terminale est nécessaire à son ciblage vers les jonctions serrées. De plus, la membrane basolatérale est impliquée dans le transport de cette protéine vers la jonction (Balda et Matter, 1998).

3.3.1.3 Fonction de la jonction serrée

Les jonctions serrées sont les principales composantes des diverses barrières présentes dans l'organisme : barrière hémato-cervicale, -testiculaire, -épididymaire... Leur rôle à ce niveau est crucial, contrôlant le passage des molécules et des fluides dans l'espace paracellulaire, permettant ainsi le maintien d'un micro-environnement spécifique qui diffère largement de la composition sanguine et/ou extra-luminale. Cette différence dans la composition des fluides de chacun des compartiments est essentielle au bon développement et au maintien des organismes multicellulaires. Occludine et les différentes claudines sont impliquées dans cette fonction "barrière" des jonctions serrées (Tsukita, Furuse et Itoh, 1999 ; Tsukita et Furuse, 2000a ; 2000b). Cette barrière n'est toutefois pas absolue. Des études ont démontré la présence de pores aqueux au sein des

jonctions serrées. Ces pores, possiblement formés par les claudines, alterneraient entre des stades ouverts et fermés (Tsukita et Furuse, 2000a ; 2000b).

Les jonctions serrées servent aussi de frontière pour la distribution des lipides dans les feuillettes externes entre la partie apicale des cellules et leur membrane plasmique basolatérale. Cette fonction "clôture" des jonctions serrées est responsable de la création et du maintien de la polarité cellulaire. La composante de la jonction principalement impliquée dans cette fonction n'est pas connue (Balda et Matter, 1998 ; Tsukita, Furuse et Itoh, 1999).

Certains modèles de souris knock-out et des mutations de gènes permettent aussi d'évaluer l'implication des protéines intégrales de la jonction serrée dans le développement des animaux. Des mutations, ou la surexpression, d'occludine dans des cellules affectent la perméabilité et la résistance électrique (Mitic, Van Itallie et Anderson, 2000). Malgré tout, des souris déficientes en occludine sont nées sans présenter de phénotypes apparents. La morphologie des jonctions ne semble pas affectée. Cependant, ces animaux présentent des anomalies histologiques importantes : calcification du cerveau, atrophie testiculaire, etc. (Saitou *et al.*, 2000). Les fonctions reliées à occludine semblent complexes.

Les claudines possèdent aussi des fonctions diverses. Des mutations du gène codant pour la Cl-16, localisée exclusivement dans la boucle ascendante de l'anse de Henlé, suggère un rôle pour la Cl-16 dans la formation de canaux permettant au magnésium de diffuser à travers les jonctions serrées du système rénal (Mitic, Van Itallie et Anderson, 2000). Des souris déficientes en Cl-11 sont dépourvues des filaments caractéristiques des jonctions serrées dans le cerveau et les testicules, principaux lieux d'expression de cette claudine. De plus, il y a une diminution considérable de la conduction nerveuse au niveau du système nerveux centrale et les mâles sont infertiles (Gow *et al.*, 1999).

3.3.1.4 La jonction serrée dans le testicule et l'épididyme

La section précédente a permis de démontrer l'implication d'occludine et d'au moins claudine-11 dans la fonction reproductrice masculine. Cela implique donc leur présence et possiblement celle d'autres protéines dans ce système.

3.3.1.4.1 Le testicule

Dès 1976, Gilula et al. ont démontré la présence des jonctions serrées dans le testicule (Gilula, Fawcett et Aoki, 1976). À cette époque, les protéines intégrales composant ces jonctions n'étaient pas connues. Depuis, la présence d'occludine et de certaines claudines dans le testicule a été démontrée (Tableau 6).

Tableau 6- Protéines de jonctions serrées dans le testicule

Protéine	Période	Localisation	Références
Occludine	Embryon	Cytoplasme	Moroi et al, 1998 ; Cyr et al, 1999
	Entre les jours postnataux 5 et 7	Périphérie des cellules de Sertoli (chez rat et souris)	
	À partir du jour 14	Marquage plus intense localisé à la base du tubule * apparition d'une barrière fonctionnelle	
	À partir du jour 23	Similaire au patron adulte de bandes intenses discontinues et localisées à la base du tubule	
Claudine 11	-	Colocalise avec occludine entre les membranes latérales des cellules de Sertoli adjacentes * localisée uniquement dans les jonctions serrées très développées	Morita et al, 1999b
Claudines 1 à 8	-	**Très faibles quantités de messagers détectés	Furuse et al, 1998 ; Morita et al, 1999a

3.3.1.4.2 L'épididyme

Les études de Friend et Gilula réalisées en 1972 ont démontré que l'épididyme possède l'un des réseaux de jonctions serrées les plus complexes (Friend et Gilula, 1972). Chez la souris, les jonctions serrées dans l'épididyme se forment au jour douze de la

période embryonnaire (Cyr, 2001). Contrairement à ce qui a été remarqué dans le testicule, les jonctions serrées de l'épididyme se développent beaucoup plus rapidement, ce qui suggère une régulation différente de cette protéine au niveau des deux tissus (Cyr *et al.*, 1999). Cependant, malgré la présence hâtive des jonctions serrées dans l'épididyme, la barrière hémato-épididymaire n'est totalement fonctionnelle qu'au jour 21 postnatal (Argawal et Hoffer, 1989), ce qui suggère que plusieurs facteurs soient impliqués dans la formation de cette dernière. Le tableau 7 résume les connaissances sur les jonctions serrées dans l'épididyme.

À noter que dans l'épididyme, la Cl-1 dans n'est pas exclusivement située aux jonctions serrées se trouvant à l'apex de cellules principales adjacentes, mais plutôt à divers niveaux entre les cellules, suggérant un rôle possible de celles-ci dans d'autres types d'interactions cellulaires. De plus, des études d'orchidectomie ont démontré la régulation partielle de la Cl-1 par les androgènes dans le segment initial (Gregory *et al.*, 2001).

3.4 Régulation des jonctions

Les jonctions cellulaires, autant au sein des organes du système reproducteur mâle que des autres tissus, exercent des rôles essentiels pour assurer le bon développement et fonctionnement de l'organisme à divers niveaux. Les facteurs responsables de la régulation des jonctions cellulaires sont multiples.

3.4.1 Interactions entre les différents types de jonctions cellulaires

La régulation des jonctions s'effectue à divers niveaux, incluant la régulation par les autres types de jonctions. Ainsi, l'adhésion cellulaire, amorcée par E-cad, semble être un préalable pour l'établissement du complexe jonctionnel (Gumbiner, Stevenson et Grimaldi, 1988). D'autres études ont aussi démontré l'importance de E-cad dans la formation des jonction serrées (Balda *et al.*, 1993 ; Sheth *et al.*, 2000 ; Troxell *et al.*, 2000) et des jonctions lacunaires (Jongen *et al.*, 1991 ; Meyer *et al.*, 1992 ; Yingjian et Rose, 1997). La régulation des autres types de jonctions par E-cad est à la fois positive et négative, selon le cas à l'étude, et toutes les protéines de jonctions ne sont pas affectées de la même façon. De plus, même si E-cad est nécessaire à la formation des jonctions gap, il semble que ces dernières sont nécessaires à la formation et à la stabilité des jonctions

adhérentes (Goodenough, Goliger et Paul, 1996). D'autres études ont démontré l'interaction directe de la Cx43 avec ZO-1 (Giepmans et Moolenaar, 1998 ; Toyofuku *et al.*, 1998). De plus, il semble que l'expression d'occludine dans certaines cultures cellulaires soit intimement liée à l'expression de la Cx32 (Kojima *et al.*, 1999).

Tableau 7- Protéines de jonctions serrées dans l'épididyme

Protéine de jonction	Présence du message	Présence de la protéine	Localisation de la protéine	Références
Cl-1	Dès le jour postnatal 7 (2 transcrits)	Dès le jour postnatal 7	À la membrane plasmique latérale des cellules indifférenciées (incluant l'apex)	Gregory et al, 2001
		À partir du jour postnatal 21	À la membrane plasmique latérale (incluant l'apex) des cellules principales adjacentes, entre les cellules basales et principales et le long de la membrane basale	
Cl-2	Absent	-	-	Gregory et al, 2001
Cl-7, Cl-8, Cl-9, Cl-11	*Des études préliminaires ont démontré la présence de ces messages	-	-	Cyr, 2001
Occludine	-	Dès le jour embryonnaire 13.5	Présente dans le cytoplasme des cellules épithéliales du tubule	Cyr et al, 1999
		À partir du jour embryonnaire 16.5	Expression de la protéine localisée graduellement vers les membranes plasmiques latérales	
		À partir du jour embryonnaire 18.5	Marquage ponctuel localisé dans la portion apicale des cellules *suggère la présence de jonctions serrées	
		Adulte	Marquage ponctuel apical ponctuel entre les cellules principales adjacentes de CT, CS et CA Associé aux cellules étroites seulement dans IS	
ZO-1	-	*Présente dans l'épididyme de même que dans les cultures primaires	-	Byers et al, 1992

3.4.2 Régulation des jonctions par d'autres facteurs

Les différentes jonctions ont donc une influence les unes sur les autres. Cependant la complexité de l'expression des protéines de jonction laisse présager une régulation par plusieurs facteurs encore inconnus. La régulation par les androgènes de E-cad, de la Cx43, d'occludine et de Cl-1 dans l'épididyme a été décrite précédemment. La testostérone est donc un facteur de régulation important, à tout le moins dans l'épididyme (Cyr *et al.*, 1992 ; Cyr, Hermo et Laird, 1996 ; Cyr *et al.*, 1999 ; Gregory *et al.*, 2001).

La connaissance des facteurs de régulation des jonctions dans le testicule et l'épididyme est passablement limitée. D'autres facteurs ont toutefois été identifiés dans des organes divers. Ainsi, les jonctions serrées dans les cellules épithéliales mammaires sont contrôlées par les glucocorticoïdes et par TGF- β (Zettl *et al.*, 1992 ; Woo *et al.*, 1996). L'estradiol contrôle, entre autres, les niveaux de E-cad dans l'épithélium des ovaires (MacCalman, Farookhi et Blaschuk, 1994) et des messagers des Cx32 et -43 dans le noyau suprachiasmatique des rates (Shinohara *et al.*, 2000). Les estrogènes ont aussi un impact au niveau de l'ARNm de N-cad dans des cultures de cellules de Sertoli (MacCalman *et al.*, 1997). Dans les tubules séminifères du testicule, la Cx43 est influencée par les rétinoïdes : des animaux déficients pour le récepteur β des rétinoïdes présentent des niveaux de cette connexine largement diminués (Batias *et al.*, 2000). Certains neurotransmetteurs, telle l'acétylcholine, favorisent l'adhésion cellulaire via E-cad (Williams *et al.*, 1993). La formation des jonctions serrées et de la jonction d'adhérence est aussi modulée par la vitamine D3 dans le foie (Luegmayer *et al.*, 2000).

Quelques études ont traité de la régulation des protéines de jonctions cellulaires par les hormones de la thyroïde. La communication via les jonctions lacunaires de Cx43 dans des cellules épithéliales de foie est augmentée par l'exposition aux hormones thyroïdiennes (Stock, Sies et Stahl, 1998). Ceci résulte d'une liaison entre les récepteurs de ces hormones avec un élément du promoteur de cette connexine (Stock et Sies, 2000). De plus, la communication intercellulaire via les jonctions gap dans les follicules thyroïdiens chez des rats mâles traités au PTU est inhibée (Kolaja, Petrick et Klaassen, 2000). Les mêmes résultats ont été obtenus avec des animaux atteints d'une maladie thyroïdienne autoimmune (Green *et al.*, 1996 ; 1997). L'impact des hormones de la

thyroïde sur les jonctions adhérentes semble être différent et dépendant de la molécule d'adhésion à l'étude. Ainsi, l'expression et la localisation de N-cam et de N-cad sont diminuées suite à l'exposition à la triiodothyronine (T_3), alors que la cadhérine-11 n'est aucunement affectée (Laslett *et al.*, 2000 ; Luegmayr *et al.*, 2000). Ces effets sur N-cam et N-cad ont été observés dans des cellules ostéoblastiques et les cellules de Sertoli respectivement. Aucune donnée n'est disponible concernant le rôle des hormones de la thyroïde dans le développement et la régulation des jonctions cellulaires dans l'épididyme.

4.0 Les hormones thyroïdiennes

4.1 Hormones synthétisées

Les hormones thyroïdiennes sont des acides aminés iodés. Ces hormones ont une structure semblable et leur différence réside dans le nombre d'atomes d'iode qui y sont rattachés : quatre pour la thyroxine (T_4) et trois pour la triiodothyronine (T_3). Avant la sécrétion, une certaine portion de la thyroxine (T_4) est convertie en triiodothyronine (T_3) (Lissitzky, 1990 ; Larsen, Davies et Hay, 1998 ; Taurog, 2000).

4.2 Fonctions des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes agissent sur les cellules de presque tous les tissus de l'organisme adulte. De plus, elles sont essentielles à la différenciation et à la maturation des tissus fœtaux et au développement normal et à la croissance postnatale. Elles sont particulièrement impliquées dans le développement du système nerveux central. Ces hormones sont aussi impliquées dans le métabolisme des protéines, des sucres, de l'eau, des ions minéraux et de l'azote. Par oxydation du glucose, elles augmentent la consommation d'oxygène et la production de chaleur. Au niveau des systèmes reproducteurs mâles et femelles, elles permettent le bon fonctionnement des organes génitaux de même que la lactation chez la femelle. Des effets sont aussi reliés à l'hypo- et l'hypersécrétion de T_3 et T_4 , tels le goitre et le crétinisme, ou encore la thyrotoxicosis (Lissitzky, 1990 ; Marieb, 1993).

4.3 Mode d'action des hormones de la thyroïde

L'action des hormones thyroïdiennes est initiée par l'interaction de celles-ci, particulièrement T_3 , avec des récepteurs nucléaires (TR). Par la suite, il y a liaison du récepteur avec une séquence régulatrice TRE (Thyroid hormone Response Element) localisée sur certains gènes, ce qui active ou réprime la transcription de ces gènes. Les complexes protéiques formés dans le noyau régulent ainsi l'expression de plusieurs gènes cibles. La régulation de ces gènes est réalisée par une cascade d'événements moléculaires prenant place dans le noyau. Il existe toutefois plusieurs groupes de recherche impliqués dans l'identification d'un mode d'action des hormones thyroïdiennes qui n'est pas situé au niveau nucléaire. Les hormones agissent donc à divers niveaux et par divers mécanismes (Anderson, Mariash et Oppenheimer, 2000).

4.3.1 Les récepteurs

Les récepteurs d'hormones thyroïdiennes sont des membres d'une superfamille de récepteurs incluant entre autres ceux pour les hormones stéroïdiennes, la vitamine D et l'acide rétinoïque. Toutes les protéines de cette famille de récepteur comprennent un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine de liaison pour le ligand (LBD) situés sur la portion C-terminale de la protéine (Anderson, Mariash et Oppenheimer, 2000).

L'identification de récepteurs pour les hormones de la thyroïde a été réalisée en 1986. À cette époque, deux cDNAs distincts furent clonés ayant des poids moléculaires respectifs de 50 à 55 kDa. Ainsi, deux formes de récepteurs, TR- α et TR- β , sont présentes dans divers tissus. De plus, il existe deux isoformes de chacun des récepteurs TR- α_1 , TR- α_2 , et TR- β_1 , et TR- β_2 . TR- α_1 , TR- β_1 et TR- β_2 sont des vrais récepteurs puisqu'ils sont en mesure de se lier avec des hormones thyroïdiennes. TR- α_2 possède une structure homologue à TR- α_1 , mais une séquence de 40 acides aminés est manquante au niveau de la portion carboxy-terminale, séquence qui est présente chez TR- β_1 et TR- β_2 et qui est responsable de la liaison avec T_3 . La fonction de cette variante n'est cependant pas connue (Anderson, Mariash et Oppenheimer, 2000).

4.4 Inhibition de la production d'hormones thyroïdiennes

Plusieurs substances peuvent inhiber la synthèse des hormones par la thyroïde. L'une des ces substances antithyroïdiennes bien connue est le propylthiouracil (PTU) et elle est hautement efficace chez le rat (Fig. 6). Le PTU réduit la conversion de T_4 en T_3 tout en inhibant la synthèse de ces hormones par la glande thyroïde (Chopra et Sabatino, 2000). Le PTU agit comme inhibiteur de peroxydase limitant l'iodination des molécules, processus catalysé par une TPO (thyroïde peroxydase). Ce processus est toutefois réversible et l'arrêt du traitement permet le retour à la normale (Taurog, 2000).

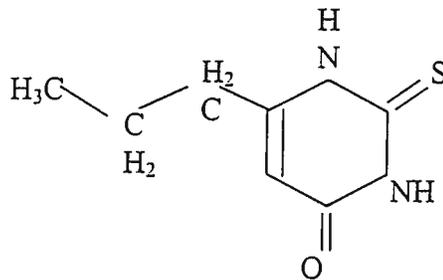


Figure 6 : Structure chimique du propylthiouracil (PTU)

4.5 Les hormones thyroïdiennes et le système reproducteur mâle

Pendant plusieurs années, le testicule adulte, tout comme le cerveau, fut considéré comme un organe ne répondant pas aux hormones thyroïdiennes, parce qu'aucun effet métabolique n'y était observé (Jannini et al., 1990 ; Canale et al., 2001). Il en est cependant tout autrement. En fait, des études récentes ont démontré la présence de certaines formes du récepteur dans cet organe autant chez l'adulte qu'au cours du développement. Ainsi, le messager et la protéine de $TR-\alpha_1$ sont présents dans les cellules de Sertoli du testicule tout au long de la vie de l'animal, y compris l'âge adulte, même si les niveaux y sont beaucoup moins élevés (Bruzzard *et al.*, 2000 ; Canale *et al.*, 2001).

Les études portant sur la présence des récepteurs à hormones thyroïdiennes dans l'épididyme ne sont pas très nombreuses. Pourtant, il est probable que les hormones de la thyroïde exercent un effet direct sur l'épididyme, puisqu'il y aurait une forte liaison entre T_3 et les noyaux des cellules épидидymaires (Del Rio *et al.*, 2000).

Outre la présence des récepteurs au niveau de ces organes, quelques études ont déjà démontré l'implication directe des hormones thyroïdiennes dans le développement du testicule. Quelques rares études ont aussi porté leur attention sur les impacts dans l'épididyme. La glande thyroïde fœtale commence à fonctionner vers la même période que les gonades. Toutefois, alors que chez les poissons et les amphibiens, les hormones de la thyroïde jouent un rôle dans la différenciation sexuelle, cela ne semble pas être le cas chez les mammifères. Le développement du système reproducteur normal ne repose pas sur la présence des hormones sécrétées par la glande thyroïde (Longcope, 2000). Cependant, plusieurs études ont démontré que le développement postnatal du testicule est largement dépendant de la présence de ces hormones.

Le PTU a été utilisée par l'équipe de Cooke pour simuler chez des rats mâles en développement un hypothyroïdisme néonatal transient. L'exposition de jeunes rats au PTU via la lactation, de la naissance jusqu'au sevrage au jour 25 postnatal, provoque l'hypothyroïdisme chez ces animaux. Avec l'arrêt du traitement, ces animaux retrouvent un statut euthyroïde (Cooke, 1991). Chez les rats hypothyroïdes durant la période postnatale, les effets sur le testicule se font ressentir jusqu'à l'âge adulte. Ainsi, ces animaux ont, malgré leur poids plus faible que les animaux témoins, des testicules 40% plus gros que ces derniers à l'âge de 90 jours, pourcentage qui atteint 80% chez ceux de 160 jours (Cooke et Mesami, 1991). L'hypothyroïdisme néonatal cause aussi une augmentation de la production de sperme journalière et de la réserve épидидymaire. Toutefois, il n'y a pas de modifications dans la concentration et la motilité des spermatozoïdes et ces rats sont fertiles (Cooke et al., 1991). L'augmentation du diamètre des tubules est aussi accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules de Sertoli et de cellules germinales (Hess et al., 1993). Les cellules de Leydig sont aussi affectées. Celles-ci sont plus nombreuses chez les animaux ayant reçu du PTU, mais leur fonction stéroïdogénique est diminuée, ce qui explique le fait qu'il n'y a pas de variations des niveaux de testostérone chez les animaux traités (Hardy et al., 1993 ; 1996). Au niveau des autres organes du système reproducteur, il y a aussi augmentation du poids, mais celle-ci est beaucoup moins importante et s'observe plus tardivement (Cooke et Mesami, 1991).

Ainsi, ces divers changements observés dans le système reproducteur ne sont pas associés à une modification des niveaux de testostérone puisqu'ils demeurent inchangés chez les animaux ayant souffert d'hypothyroïdisme jusqu'au jour 25 (Cooke et Mesami, 1991). La diminution du niveau d'hormones thyroïdiennes chez de jeunes animaux provoque un retardement dans la maturation des cellules de Sertoli. Les cellules immatures non différenciées continuent à se diviser, ce qui explique l'augmentation de leur nombre (Van Haaster, 1992 ; De França et al., 1995). Ces différentes observations ont été réalisées chez le rat et la souris (Cooke et Meisami, 1991 ; Joyce, Porcelli et Cooke, 1993). Chez l'homme, une déficience en hormone thyroïdienne durant la période prépubère provoque un retardement dans la maturation sexuelle (Longcope, 2000).

L'importance des hormones de la thyroïde dans certains aspects du développement testiculaire a donc été largement étudiée. Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a porté sur l'impact d'un hypothyroïdisme néonatal transient sur l'épididyme adulte. Toutefois, des études où des animaux ont subi une thyroïdectomie ont permis de réaliser qu'un hypofonctionnement de la glande est associé à une diminution des mitoses, une vascularisation insuffisante, à une diminution de la taille des noyaux et à une décondensation de la chromatine (Del Rio, Valdez Toledo et Quinos, 1979). De plus, l'étude de la queue de l'épididyme par microscopie électronique à balayage a permis de démontrer que celle-ci est affectée par l'absence d'hormones thyroïdiennes. Chez les animaux affectés, il y a des changements morphologiques et physiologiques au niveau de cette portion de l'organe : aplatissement du tubule, perte des stéréocils, cellules épithéliales dénudées... (Del Rio, Palaro et Blanco, 2001). Il y a aussi une réduction considérable de l'efficacité de la motilité des spermatozoïdes chez des animaux partiellement hypothyroïdes (Del Rio et Quiros, 1983).

Toutes ces études ont pu démontrer les effets d'une déficience en hormones thyroïdiennes sur ces deux organes de l'appareil reproducteur mâle. Un fait intéressant ressort de ces études : il semble que les hormones de la glande thyroïde affecte divers processus cellulaires dont la différenciation. Dans le testicule et l'épididyme, de même que dans un bon nombre d'organes, ces processus sont aussi reliés à la communication cellulaire et aux différentes jonctions. Certaines études, telles que mentionnées

précédemment, ont déjà démontré la régulation de certaines protéines de jonction cellulaire par les hormones de la thyroïde. Rien de tel n'a encore été réalisé au niveau du système reproducteur mâle. C'est donc à cet aspect de l'interaction entre testicules, épидидymes et hormones thyroïdiennes que nous avons porté notre attention.

5.0 Outils pour l'étude de la régulation des jonctions cellulaires dans l'épididyme par les hormones thyroïdiennes

La régulation hormonale des fonctions de certains organes est parfois complexe et l'étude de celle-ci peut être difficile. Depuis plusieurs années toutefois, divers outils ont été mis au point. L'utilisation d'animaux ou encore l'élaboration d'animaux transgéniques sont des pratiques courantes. Ces modèles permettent l'étude *in vivo* et sont généralement très représentatifs. L'utilisation de ces modèles ne permet toutefois pas d'agir à un niveau précis ou de contrôler certains paramètres. Les modèles *in vitro* permettent de contourner ce problème.

L'isolation de cellules à partir de tissus animaux frais et leur mise en culture permet l'obtention de cultures cellulaires primaires. Ces cultures permettent l'étude *in vitro*. Ces modèles peuvent être très efficaces pour élucider les processus et mécanismes cellulaires menant à une certaine réponse de l'organisme. Plusieurs méthodes d'isolation de cellules et de culture sont déjà connues. Ces modèles *in vitro* peuvent se révéler une source d'informations inestimable. Toutefois, l'utilisation de cultures primaires comporte aussi quelques limitations, dont la durée de vie parfois très courte des cellules avant que celles-ci ne se différencient ou ne meurent (Lewin B, 1999). De plus, les cultures primaires nécessitent souvent l'utilisation d'un milieu auquel de nombreux suppléments sont ajoutés et sont aussi plus sujettes à la contamination.

5.1 Les lignées cellulaires

Afin de passer outre ces limitations, plusieurs laboratoires utilisent des lignées cellulaires. Les lignées cellulaires originent de cellules immortalisées et présentent plusieurs avantages sur les cultures primaires, dont la longévité des cellules. De

nombreuses lignées cellulaires sont commercialisées. L'immortalisation décrit la propriété de croissance illimitée des cellules, sans toutefois qu'il n'y ait nécessairement d'autres changements (Lewin B, 1999). Il existe plusieurs méthodes d'immortalisation des cellules : traitement avec des substances chimiques carcinogènes, γ -irradiation, introduction de l'ADN du papilloma virus humain ou encore de l'antigène grand-T du virus simien 40 (SV40). L'immortalisation spontanée serait un phénomène plutôt rare et même inexistant chez plusieurs espèces (Swisshelm K, 1999).

5.1.1 L'antigène grand-T de SV40

L'une des méthodes largement utilisée dans la formation de lignées cellulaires est l'immortalisation avec l'antigène grand-T du virus simien 40 (SV40). Le génome de SV40 est un ADN double brin circulaire qui code pour cinq protéines virales, dont grand-T, protéine importante dans le processus d'immortalisation (Bryan TM et RR Reddel, 1994). Les mécanismes permettant l'immortalisation ne sont pas encore bien connus. L'antigène grand-T affecterait toutefois certains facteurs de transcription généraux et co-activerait la transcription de l'ARN ribosomal (Ozer HL, 1994). Il peut aussi se lier à l'ADN, à l'ATP et à l'ADN polymérase- α . Il se localise dans le noyau, possède une activité hélicase et se lie à RB, p107 et p53 (Bryan TM et RR Reddel, 1994). Dans le processus d'immortalisation, la liaison de cette protéine virale à certains gènes serait reliée au maintien du phénotype immortel. Les gènes RB (rétinoblastome) et p53 font partis de la classe des suppresseurs de tumeurs. L'interaction de l'antigène grand-T avec ces gènes les rendrait inactifs, permettant ainsi la prolifération cellulaire. Le processus utilisé ne serait toutefois pas le même dans tous les types cellulaires (Bryan TM et RR Reddel, 1994). L'antigène grand-T agirait aussi par l'altération de la méthylation de l'ADN en augmentant les niveaux d'ADN méthyltransférase. Cette fonction serait elle aussi associée à l'augmentation de la longévité des cellules (Bryan TM et RR Reddel, 1994 ; Slack A et al., 1999). Plusieurs types cellulaires ont pu être immortalisés avec cet antigène.

5.1.2 Lignée cellulaire épидидymaire

L'une des grandes limitations dans l'étude des fonctions de l'épididyme est le manque d'une lignée cellulaire épидидymaire. À ce jour un tel outil n'est pas encore disponible pour les chercheurs. La seule information publiée à ce sujet rapporte l'immortalisation de cellules d'épididyme de fœtus normaux et porteurs de la fibrose kystique par transfections d'un plasmide Ori- de l'antigène grand-T de SV40 (Coleman L et A Harris, 1991). Ces cellules fœtales sont immatures et non différenciées. Elles ne constituent donc pas un bon modèle pour l'étude des fonctions de l'organe de jeunes individus ou d'individus matures. Il est donc important de poursuivre les tentatives pour la création d'une telle lignée.

SECONDE PARTIE : LES ARTICLES SCIENTIFIQUES

MA CONTRIBUTION - PREMIER ARTICLE

Le premier article est à auteurs multiples. Toutefois, ma contribution me place au premier rang. J'ai joué un rôle majeur dans la rédaction de l'article, qui a par la suite été corrigé par mon directeur de recherche, le Dr Daniel G. Cyr. De plus, plusieurs résultats présentés dans cet article sont issus de mes travaux de recherche.

Le protocole de traitement des animaux ainsi que l'échantillonnage ont été réalisés majoritairement par Andrew A. Rooney, qui a planifié l'expérience à d'autres fins. Au départ, les premières manipulations pour l'acquisition de données ont été réalisées par Julie Dufresne, aidée par Liana Falcone, une étudiante d'été. Elles ont isolé l'ARN des tissus et préparé, ainsi qu'hybridé pour analyse Northern, trois membranes avec la connexine 43. Liana a aussi marqué la Cx43 en immunohistochimie sur quelques lames.

Pour ma part, j'ai complété les analyses Northern. J'ai isolé de l'ARN afin de préparer des nouvelles membranes pour compléter les analyses Northern de la Cx43. J'ai aussi effectué toutes les analyses statistiques. J'ai effectué les expériences pour les analyses Northern avec la E-cadhérine. En ce qui concerne l'immunohistochimie de la Cx43, la distribution des âges n'étant pas complète, j'ai dû refaire certaines lames. De plus, j'ai aussi fait le marquage immunohistochimique de l'occludine. J'ai aussi pris en charge toutes les étapes ayant mené aux analyses Western du récepteur des hormones thyroïdiennes.

RÉSUMÉ DU PREMIER ARTICLE

Les interactions cellulaires dans le testicule et l'épididyme sont essentielles au développement et à la maturation des spermatozoïdes. Le complexe jonctionnel de ces deux organes est très développé et comprend des jonctions serrées, d'adhérence, lacunaires (gap) de même que des desmosomes. Les jonctions gap contrôlent la croissance et la différenciation des tissus dans plusieurs organes, et la communication cellulaire dans les testicules et épидидymes est cruciale pour la spermatogenèse et la maturation des gamètes. Les connexines sont des protéines transmembranaires qui s'oligomérisent pour former le pore jonctionnel. La Cx43 a déjà été identifiée dans le testicule et l'épididyme de rat, de souris et d'homme. Le rôle des hormones de la thyroïde dans la régulation de la croissance testiculaire a déjà été étudié. L'hypothyroïdisme néonatal chez le rat cause une augmentation de la taille du testicule chez les animaux adultes, augmentation causée par un retardement dans la différenciation des cellules de Leydig et de Sertoli et par une augmentation des mitoses ce qui augmente le nombre de cellules. L'objectif de cette étude était de démontrer les effets d'un hypothyroïdisme néonatal transitoire induit par le PTU (propylthiouracil) sur la Cx43 dans le testicule et l'épididyme. Les animaux furent échantillonnés aux jours 14, 18, 22, 26, 30 et 91. La présence du récepteur pour les hormones thyroïdiennes dans l'épididyme a d'abord été vérifiée par une analyse western. Dans le testicule, des analyses Western avaient déjà permis de démontrer la présence du récepteur par d'autres auteurs. Par la suite, les résultats obtenus ont démontré que la taille des tubules séminifères des testicules est plus petite chez les animaux traités jusqu'au jour 30 et que la formation de la lumière des tubules est

retardée. Des analyses Northern n'ont toutefois démontré aucun changement dans les niveaux de messenger de la Cx43 dans le testicule. Dans le testicule en développement, la Cx43 se localise le long de la membrane plasmique de cellules de Sertoli adjacentes et dans le cytoplasme de ces cellules jusqu'au jour 22. Au jour 30, l'expression de la protéine se localise le long de la membrane plasmique des cellules de Sertoli, mais à la base des tubules séminifères. Chez les animaux traités au PTU, la Cx43 ne se localise pas le long de la membrane plasmique et de la coloration dans le cytoplasme est encore observé au jour 30. L'occludine est une protéine de jonction serrée qui forme la barrière hémato-testiculaire. Des études ont déjà démontré que celle-ci est co-localisée avec la Cx43 dans le testicule. La distribution de la Cx43 étant affectée et l'absence de lumière nous ont amené à vérifier si la localisation de l'occludine est aussi affectée et si cela pourrait expliquer les changements observés pour la Cx43. L'immunolocalisation d'occludine a permis de démontrer la présence de la protéine chez les animaux traités, mais celle-ci ne se retrouve pas dans la région de la barrière hémato-testiculaire, comme c'est le cas chez les animaux contrôles. Dans la région proximale de l'épididyme, les niveaux d'ARNm de la Cx43 sont significativement plus faibles que chez les rats traités au PTU aux jours 14, 18 et 22, alors qu'il n'y a aucun changement dans la partie caudale de l'organe. Dans l'épididyme de rats de 22 et 30 jours, la Cx43 se localise le long de la membrane plasmique entre les cellules principales et les cellules basales. Chez les rats de 22 jours traités au PTU, la Cx43 est absente dans le segment initial, la tête et la région proximale du corps de l'épididyme, alors qu'il n'y a pas de changements dans la région distale du corps et la queue. La Cx43 est contrôlée par d'autres types de jonctions. Certaines études ont démontré que E-cadhérine (E-cad), une protéine de jonction

adhérente, module la transcription de la Cx43 dans certains tissus. Afin de vérifier si les hormones thyroïdiennes agissent directement sur la Cx43 ou via les jonctions d'adhérence, le profil de développement du messenger de E-cadhérine a été étudié. Des analyses Northern ont démontré que les niveaux de E-cad ne sont pas altérés dans l'un ou l'autre des segments à l'exception du jour quatorze. Les résultats obtenus suggèrent donc que la régulation de la Cx43 par les hormones de la thyroïde est complexe et varie selon les organes.

PREMIER ARTICLE

**Transient Neonatal Hypothyroidism Alters The Gap Junctional Protein
Connexin43 Localization In The Testis and mRNA Levels In The Epididymis Of
The Rat**

Nancy St-Pierre, Julie Dufresne, Andrew A. Rooney¹, Louis Hermo and Daniel G. Cyr

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

¹ Present address US EPA, Raleigh, North Carolina

Running title : Regulation of Cx43 by thyroid hormones

Key words : Thyroid hormones, male reproductive tract, cellular targeting, occludin, E-cadherin

Corresponding author: Dr. Daniel G. Cyr
INRS-Institut Armand-Frappier
Université du Québec
245 boul Hymus,
Pointe-Claire, QC, H9R 1G6
Canada
Tel ; (514) 630-8833
Fax : (514) 630-8850
E-mail : daniel.cyr@inrs-sante.quebec.ca

ABSTRACT

Gap junctions coordinate tissue growth and differentiation in many organs by allowing direct communication between adjacent cells. Gap junctions are composed of connexins. Thyroid hormones are implicated in the differentiation of Sertoli cells. The objectives of this study were to determine the effects of propylthiouracil (PTU)-induced neonatal hypothyroidism on Cx43 in rat testis and epididymis. Rats were administered PTU (0.02%) via lactation beginning 24 hrs after birth. Two groups of rats were used: control and PTU-treated rats. Rats were sampled at 14, 18, 22, 26, 30 and 91 days of age. Northern blot analyses with testicular RNA indicated no differences in Cx43 mRNA levels between control and PTU-treated rats at all ages tested. The seminiferous tubules of PTU-treated animals were smaller until day 30 and lumen formation was delayed. In the developing testis, Cx43 was localized along the plasma membrane between adjacent Sertoli cells and in the cytoplasm of those cells until day 22. At day 30, the immunostaining was localized along the plasma membrane of Sertoli cells at the base of the seminiferous tubules. In PTU-treated rats, Cx43 did not appear to localize to the plasma membrane and a more pronounced Cx43 cytoplasmic immunostaining was still present in Sertoli cells at 30 days of age. Cx43 has been previously shown to colocalize with the tight junctional protein occludin between adjacent Sertoli cells. Immunolocalization of occludin showed that the protein is present in tubules of treated rats but the immunostaining does not localize to the area of blood-testis barrier in 30-day old rats, as in control animals. Alterations in testicular tight junctions may explain why Cx43 does not localize to the basal region of the seminiferous tubule between adjacent Sertoli cells in PTU-treated rats. In the proximal epididymis (initial segment, caput, corpus), Cx43 mRNA levels were significantly lower in PTU-treated rats at 14, 18 and 22 days of age, but no changes were observed between control and PTU-treated rats in the distal (cauda) epididymis at these ages. In the epididymis of 22- and 30-day old rats, Cx43 was localized along the plasma membrane between principal and basal cells throughout the epididymis. In PTU-treated rats, Cx43 was not detectable by immunocytochemistry in initial segment, caput and corpus epididymis. In the cauda region of the epididymis, however, Cx43 immunostaining in PTU-treated rats was similar

to that of controls. Since previous studies have suggested that cadherin-mediated cell adhesion may alter the formation of gap junctions, we studied whether or not neonatal hypothyroidism could alter epithelial cadherin (E-Cad) mRNA levels. Northern blot analyses indicated that E-Cad mRNA levels were not altered either in the proximal or distal segment of the epididymis in PTU-treated rats, except in 14-day old rats. Together, these data suggest that thyroid hormones regulate Cx43-dependent gap junctional communication in both the testis and epididymis of the rat. However, the mechanism responsible for this regulation appears to be complex and organ-specific.

INTRODUCTION

Intercellular communication in the testis and epididymis plays a crucial role in spermatogenesis and sperm maturation (Steger et al, 1999 ; Roscoe et al, 2001 ; Cyr et al, 2002). Gap junctions are responsible for direct communication between cells and are composed of pores between adjacent cells that allow the passage of small molecules. These cellular pores are composed of hexameric connexons from each cell and are themselves formed by the oligomerization of connexins. Connexins are a family of 15 different proteins. Some connexins are widely distributed among different tissues, while the distribution of others is much more specific (Bruzzone et al, 1996 ; Simon and Goodenough, 1998). Connexin43 (Cx43), for example, is a ubiquitous connexin present in many tissues, including the testis (Risley et al, 1992 ; Batias et al, 2000 ; Perez-Armendariz et al, 2001) and epididymis (Cyr et al, 1996).

In the testis, Cx43 is localized between adjacent Sertoli cells, Sertoli cells and germ cells and also between Leydig cells (Tan et al, 1996). Other connexins have also been identified in the testis. These include Cx26 and Cx32, which are present between Sertoli cells in the apical region of the seminiferous tubules (Risley, 2000). Cx33 is also present between Sertoli cells but is localized towards the basal region of the seminiferous tubules and colocalizes with Cx43 (Tan et al, 1996), while the expression of Cx50 is limited to germ cells (Risley, 2000). Transcripts for Cx31, Cx37, Cx40 and Cx45 have also been identified in the testis (Risley, 2000), but their localization remains to be established. Cyr *et al* (1996) have reported that Cx43 colocalizes with the tight junction protein occludin at the base of the seminiferous epithelium in the area of the blood-testis barrier.

In the epididymis, Cx43 is localized along the plasma membrane between principal and basal cells and its localization in the initial segment of the epididymis is androgen-dependent (Cyr et al, 1996). It has recently been shown that other connexins are also present in the epididymis. Using a combination of RT-PCR and restriction enzyme mapping, the Cx26, Cx30.3, Cx31.1 and Cx32 have been identified. The expression of

these connexins is segment-specific and age- dependent, and their localization varies (Dufresne et al, 2002).

Thyroid hormones are implicated in the differentiation and maturation of a variety of foetal tissues including the testis (Lissitzky, 1990 ; Cooke *et al* 1991). Cooke *et al* (1991) reported that transient neonatal hypothyroidism alters testicular weight. A lack of thyroid hormones during the neonatal development causes a 40% increase in the testicular weight of adult rats and increases daily sperm production (Cooke and Meisami, 1991). This increase in testis size is caused by a delay in differentiation of Sertoli cells, resulting in an increased number of Sertoli cells, as well an increased number of Leydig cells (Hess et al, 1993 ; Hardy et al, 1993). Studies have shown that hypothyroidism in adult rats causes morphological changes in the caput and corpus epididymidis and is associated with a decrease in the number of epithelial cells (Del Rio et al, 1979). However, neonatal hypothyroidism causes an increase in adult epididymal weight (Cooke and Meisami, 1991). Thyroid hormone receptors are present in the rat testis throughout postnatal development (Benbrook and Pfahl, 1987 ; Bruzzard et al, 2000 ; Canale et al, 2001). Furthermore, both type 1 and type 2 iodothyronine deiodinases, which are responsible for the conversion of L-thyroxine to its active metabolite 3,5,3'-triiodo-L-thyronine, are present in the testis but their activity is higher in 12- and 22-day old rats as compared to adults (Bates et al, 1999). In the epididymis, Del Rio et al (2000) reported high affinity, low capacity binding sites of T₃ in the nuclei of the epididymis, suggesting that TH can act directly on the epididymis.

An important role of gap junctions is their implication in the regulation of cell growth and differentiation by controlling the direct passage of small molecules (<1kDa) between adjacent cells (Bruzzone et al, 1996). Thyroid hormones also regulate cellular differentiation but few studies have focussed on the effects of thyroid hormones on intercellular junctions. In rat liver epithelial cells, thyroid hormones can modulate Cx43 levels in a dose-dependent manner (Stock et al, 1998). This regulation appears to be via a direct action of the thyroid hormone receptor on the Cx43 promoter, which contains a thyroid response element (Stock and Sies, 2000). There are no studies on the regulation of gap junctions in the testis and epididymis by thyroid hormones.

The objectives of the present study were to investigate the effects of propylthiouracil (PTU)-induced neonatal hypothyroidism on Cx43 mRNA levels and immunolocalization of Cx43 protein in the testis and epididymis of rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Timed-gestation Sprague-Dawley female rats were purchased 1 week prior to parturition from Charles River Canada, Inc. (St-Constant, Qc). Pups were removed from their mothers within 12h of birth, sexed, and randomly re-assigned to a lactating dam. There were 11 male pups per female. Rats were maintained on a photoperiod of 12h light : 12h darkness throughout the experiment and food and water were available *ad libitum*. To determine the presence of thyroid hormone receptors in the epididymis, 26-day and 91-day male Sprague-Dawley rats were also purchased and housed in the same conditions. All the procedures used on animals in this study were approved by the University Animal Care Committee.

Experimental protocol

The experimental protocol used in this study was based on previous experiments in which PTU in the drinking water of lactating dams induced neonatal hypothyroidism in rat pups that recovered normal circulating concentrations of thyroid hormones shortly after PTU treatment was ceased at weaning (Kirby et al, 1997). Two experimental groups were used : control and PTU-treated. In the PTU-treated group, lactating dams were given drinking water containing 0.02% PTU (Sigma Chemicals, Mississauga, ON) w/v and 1% Cherry-flavoured Kool-Aid®. In the control group, the pups were from mothers given drinking water containing 1% Cherry-flavoured Kool-Aid® alone. Cherry-flavoured Kool-Aid® was added to the water to increase palatability and encourage drinking of PTU (R. Hess personal communication). PTU treatment started at birth and

was stopped on day 24 ; thereafter, clean water was provided. Pups were weaned on day 28. Animals were weighed and euthanized by asphyxiation with CO₂. Rats were sampled at 14, 18, 22, 26, 30 and 91 days of age. These time-points were chosen in relation to the formation of the blood-testis barrier, which occurs between day 15 and 19 (Vitale et al, 1973) and the blood-epididymal barrier, which is formed between day 18 and 21 (Agarwal and Hoffer, 1989). Time-points were selected before, during and after these barriers are formed. Day 26 was chosen because it was shortly after the PTU treatment ceased, and day 30 was selected because it was shortly after weaning. Rats were considered adults at 91 days of age. At the time of sampling, the testes were removed and rapidly frozen in liquid nitrogen. Epididymides were divided into the caput-corporis (initial segment, caput and corpus epididymidis) and cauda epididymidis prior to being frozen in liquid nitrogen. Testes and epididymal segments were subsequently stored at -86°C. Some of the testes and epididymides were fixed for histological examination by immersion in Bouin's fixative.

Western blot analysis

Frozen epididymides of 26- and 91-day old rats were homogenized in buffer (0.23 M sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 100 µg/ml phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF), 1 µg/ml pepstatin, 2 µg/ml antipain (Sigma Chemicals, Mississauga, ON). The cellular debris was removed by centrifugation for 10 minutes at 10 000g. A 100 µg aliquot of supernatant was diluted in loading buffer (Laemmli buffer), boiled for 10 minutes and cooled on ice. The samples were loaded onto a 10% polyacrylamide gel with a 4% stacking gel (Sambrooke et al, 1989). Electrophoresis was done at 120V for 1.5 hours until the dye front reached the end of the gel. The proteins on the gel were then transferred onto a nitrocellulose membrane using a Bio-Rad Transblot apparatus (BioRad Laboratories, Inc., Mississauga, ON) at 120V for 1 h at 4°C. The transfer of coloured molecular weight markers was used to assess the efficiency of transfer. The presence of the thyroid hormone receptor was determined using the TRα1 antibody which recognizes both the TRα1 and TRβ1 thyroid hormone

receptor subunits (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). The presence of the thyroid hormone receptor was detected with a streptavidin-alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (Blotting Detection Kit, BioRad Laboratories, Inc., Mississauga, ON). Adult rat testis was used as a positive control.

Northern blot analyses

Total cellular RNA from four distinct pools of frozen tissues was used for Northern blot analyses. Total cellular RNA from testis, caput-corporis and cauda epididymidis was isolated using the guanidium isothiocyanate method (Chomczynski and Sacchi, 1987). A 10µg aliquot of total RNA from each sample was then separated by electrophoresis in a 1.2% agarose-formaldehyde gel and transferred onto a charged nylon membrane (GeneScreen Plus, Dupont Chemicals, Mississauga, ON) as described by Viger and Robaire (1991).

The Cx43 cDNA probe was obtained as a gift from Dr. E. Beyer (University of Chicago, Chicago, IL ; Beyer et al, 1987). The epithelial-cadherin (E-Cad) cDNA was amplified by RT-PCR using the following specific primers : forward 5'-TGCCCCAGTATCGTCCCCGT-3', reverse 5'-CGGTTGCCCATTCGTTTCAGATAA-3' (Johnson et al, 2000). Total RNA (500 ng) was reverse transcribed using an oligo d(T)₁₆ primer. The cDNA was amplified using 30 cycles of denaturation at 94°C (60 sec), annealing at 55.6°C (60 sec) and elongation at 72°C (60 sec). The PCR product was separated on an agarose gel and the 230-bp product was isolated from the gel using the Qiaex II extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) and cloned into the T/A cloning site of the pCR 2.1 plasmid (Invitrogen, Palo Alto, CA). The plasmid was then used to transform competent bacteria, and positive clones were color selected. The insert was isolated by restriction enzyme digest, agarose gel electrophoresis and was purified using the Qiaex II extraction kit. Rat E-Cad was sequenced and its identity was confirmed by sequence homology using Blast search (GenBank, NCBI, Washington, DC).

Both the Cx43 and E-Cad cDNA probes were labelled by random priming with [³²P]-dCTP (Oligonucleotide Labelling kit, Amersham-Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe,

QC). The membranes were standardized for RNA loading by hybridizing the membranes with an end-labelled 18S rRNA oligonucleotide probe (Cyr et al, 1992). The resulting unsaturated phosphorus screens were scanned using a PhosphorImage analyser (Amersham-Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe, QC) and quantified using ImageQuant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). The integrated area under the curve for the cDNA probe was standardized against the signal for 18S rRNA to determine the relative levels of Cx43 and E-Cad mRNA.

Immunocytochemistry

Bouin's-fixed tissues were dehydrated and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) were subsequently treated as previously described (Cyr et al, 1992). For occludin immunostaining, prior to blocking free aldehyde with glycine, antigen retrieval was done by boiling the sections in a citrate solution (0.02M citric acid, 0.01M sodium citrate) for 10 minutes in a microwave oven.

Immunocytochemical localization of Cx43 and occludin in the testis and epididymidis were done using affinity-purified polyclonal rabbit antisera (Cx43 : 100 μ g/ml - Santa Cruz Biotech; occludin : 10 μ g/ml, Zymed laboratories, South San Francisco, CA). Antibody binding to Cx43 and occludin were detected using the horseradish peroxidase method as previously described (Cyr et al, 1992). Slides incubated with normal rabbit antiserum were used as negative controls because immunoabsorption was not possible due to a lack of Cx43 and occludin antigen.

Statistical analyses

One Way Analysis of Variance (ANOVA) was done on the data from Northern blots for statistical analyses. Results from control and PTU-treated groups were compared for each age. Levels at each sampling time were also compared one to another within each group. All analyses were performed using SigmaStat computer software (Jandel Scientific Software).

RESULTS

Body and tissue weights

Body weights of the treated animals were lower than those of the control rats during PTU administration. At the end of the treatment, the PTU-treated rats weighed approximately 59% lower than controls. Once the treatment was stopped, the growth rate of PTU-treated pups increased. However, the weights of the treated adult rats (day 91) were still significantly lower than those of control rats (Table 1). The mean adult testis weight in the treated group was 35% greater than that of controls, despite the lower body weights. Epididymal weights of adult rats were not significantly altered by PTU treatment.

Presence of thyroid hormone receptor in the epididymis

Western blot analysis using total protein was done to determine the presence of the thyroid hormone receptor (TR) in the epididymis. Results indicate a single band of 52.5 kDa in the epididymis of both the 21- and 91-day old rats. This corresponds to the molecular weight of TR predicted by the manufacturer (Santa Cruz, Inc., Santa Cruz, CA). A slightly higher molecular weight protein of 53 kDa was present in the testis (Fig. 1). This corresponds to the testicular thyroid hormone receptor which has been reported to have a slightly higher molecular weight in the testis (Benbrook and Pfahl, 1987).

Effects of PTU on Cx43 in the testis

The developmental pattern of Cx43 mRNA levels in control rat testis indicate that levels were low until 22 days of age, increased 1.5 fold at day 26, and remained constant thereafter. However the differences between the ages were not statistically significant. The pattern is the same for PTU-treated rats. There were no significant differences in

Cx43 mRNA levels between controls and PTU-treated rat testis at any of the ages tested (Fig. 2).

Morphologically, the seminiferous tubules of PTU-treated rats (Fig. 3-B, D, F) were smaller than controls (Fig. 3-A, C, E) from day 14 until day 30. In the seminiferous tubules of PTU-treated rats, there was no lumen in 18-, 22- and 26-day old rats, and few tubules had a clearly defined lumen by 30 days of age (Fig. 3-B,D,F). This is in sharp contrast to control rats, which displayed a well-defined lumen by 18 days of age.

Testes of 14, 18, 22, and 30 days were used for immunolocalization of Cx43. In young animals (day 14-18) Cx43 immunostaining was located at the apical and lateral margins of Sertoli cells. However the staining was still diffuse throughout the seminiferous tubules and there were no differences between controls and PTU-treated rats (data not shown). In testes from 22-day old rats, Cx43 immunostaining was still mainly localized along the lateral plasma membrane of Sertoli cells, but there was a more intense reaction in the basal region of seminiferous tubules (Fig. 3-A, C). In testes from PTU-treated rats, Cx43 immunostaining along the plasma membrane was much weaker than in control rats (Fig. 3-B, D). In 30-day old rats, the difference in Cx43 localization between control and PTU-treated rats was more pronounced. In controls, Cx43 was localized mainly at the base of the tubules between Sertoli cells, as discrete ribbon-like strands (Fig. 3-E). In testes from PTU-treated rats, there was an intense cytoplasmic immunostaining for Cx43 with little immunostaining along the lateral plasma membrane of Sertoli cells (Fig. 3-F). In testes from 22- and 30-day old rats, some tubules stained more intensely than others. The levels of Cx43 are known to be related to the stage of the seminiferous tubules. In all cases, there was no staining observed in sections incubated with normal rabbit serum, which was used as a negative control (data not shown).

In adult rats, occludin has been shown to localize to tight junctions between Sertoli cells that form the blood-testis barrier. Previous studies from our lab have shown that Cx43 co-localizes with occludin in the seminiferous tubules of adult mice (Cyr et al, 2001). Given the fact that Cx43 localization was disrupted in PTU-treated rats, and since the seminiferous tubules of PTU-treated rats have no lumen by 22 days of age, we wanted to know whether or not occludin localization was also altered by PTU-treatment, and if

this could explain why Cx43 does not localize to the basal region of the seminiferous tubules between adjacent Sertoli cells. In testes from 22-day old control rats, occludin was already located mainly at the base of the tubules between Sertoli cells and also between some germ cells (Fig. 4-A). In PTU-treated rats, occludin immunostaining was more diffuse throughout Sertoli cells (Fig. 4-B). In 30-day old control rats, occludin was localized to the base of the seminiferous tubules between adjacent Sertoli cells (Fig. 4-C), but in testes from PTU-treated rats, the staining in most of the tubules was still localized throughout the tubules, although some tubules showed a similar pattern of occludin immunostaining as in control rats (Fig. 4-D). Sections treated with normal rabbit serum were unreactive (data not shown).

Effects of PTU on Cx43 in the epididymis

Cx43 mRNA levels were measured in the caput-corporis and cauda regions of the epididymis from control and PTU-treated rats. In the caput-corporis epididymis of control rats, Cx43 mRNA levels were already high at d14 and increased to peak levels by 22 days of age. Cx43 mRNA levels subsequently decreased from days 30 to 91 by almost 70% (Fig. 5-A). Levels at day 91 were significantly different from all other timepoints in both control and PTU-treated rats. In the cauda epididymis, Cx43 mRNA levels were constant throughout the postnatal development and peaked at adulthood (91d) (Fig. 5-B ; Dufresne et al, 2002). In the caput-corporis epididymis, Northern blot analyses indicated a significant decrease in the levels of Cx43 mRNA in PTU-treated rats as compared to controls at 14, 18 and 22 days of age. While Cx43 mRNA levels were also lower at 26, 30 and 91 days of age, these differences were not statistically significant (Fig. 5-A). There were no significant differences between control and PTU-treated Cx43 mRNA levels in the cauda epididymis at any of the ages sampled (Fig. 5-B).

The immunolocalization of the Cx43 was done on epididymis of control and PTU-treated rats of 14, 18, 22 and 30 days of age. There was no Cx43 immunostaining in epididymis of 14 and 18 days of age. In 22-day old rats, a Cx43 immunoperoxidase reaction was localized in the basal region of the epididymal lumen between principal and

basal cells in all segments of the epididymides (Fig. 6-A, C, E, G). In epididymides of PTU-treated rats, Cx43 was either absent or present at very low levels in the initial segment (Fig. 6-B), the caput (Fig. 6-D) and the corpus epididymidis Fig. 6-F). In contrast, Cx43 immunostaining in the cauda epididymidis was similar to control rats, as Cx43 was localized between basal and principal cells (Fig. 6-H).

Effects of PTU on E-Cadherin in the epididymis

Unlike in the testis, Cx43 in the epididymis is not localized to epididymal tight junctions present in the apical region of the epididymal tubules between adjacent principal cells. Previous studies have suggested that in certain epithelial cells, adhering junctions can regulate the formation of gap junctions (Jongen et al, 1991). We therefore wanted to establish whether E-Cad, a protein associated with adhering junctions, was also regulated by PTU. Northern blot analyses of E-Cad mRNA levels in the epididymis indicated that PTU treatment had no effect on E-Cad mRNA levels at all ages tested, except at 14 days of age in both proximal and distal segments of the epididymis. However, the effects of PTU on E-Cad mRNA levels in the caput-corporis and cauda epididymidis are markedly different. In the caput-corporis epididymidis, PTU treatment resulted in a significant decrease in E-Cad mRNA levels (Fig. 7-A) while in the cauda epididymidis E-Cad mRNA levels were significantly increased (Fig. 7-B). There were no significant differences found within a group when comparing levels for at each ages. These data however, suggest that PTU-induced lower Cx43 mRNA levels are not related to alterations in E-Cad.

DISCUSSION

Testicular intercellular communication mediated by Cx43 gap junctions is thought to represent an essential process for spermatogenesis (Roscoe et al, 2001). The relatively large number of different connexins and their localization in the testis is suggestive of the

importance of intercellular gap junctional communication in testicular functions (Tan et al, 1996 ; Cyr et al, 1996 ; Batias et al, 2000 ; Risley et al, 2000). There is limited information on the factors that regulate Cx43, and other connexins, in the testis. The proliferation of Sertoli cells in the first three weeks postnatally is regulated in part by thyroid hormones (TH). TH appear to regulate the differentiation of Sertoli cells from immature to mature cells during the first 3 weeks postnatally. This differentiation of cells within a complex syncytium of cells such as the seminiferous tubule is likely to involve the formation of new cellular interactions and communication processes between cells. Our results indicate that PTU-induced neonatal hypothyroidism appears to modulate the cellular localization of Cx43 in the developing seminiferous tubule. While PTU treatment does not alter testicular Cx43 mRNA levels, the cellular targeting of Cx43 to the lateral plasma membranes of Sertoli cells appears to be altered by neonatal hypothyroidism. In control rats we observed a pronounced Cx43 cytoplasmic immunostaining in both 14- and 18-day old rats. The cytoplasmic immunostaining disappeared in older rats, as Cx43 appeared to localize exclusively to the lateral plasma membranes of Sertoli cells. In PTU-treated rats the Cx43 cytoplasmic immunostaining was still present in the testis of 30-day old rats. The intracellular targeting of Cx43 occurs primarily through a Golgi-mediated pathway, where connexins oligomerize into connexons and are subsequently targeted to the plasma membrane (Bruzzone et al, 1996 ; Munari-Silem et al, 1996 ; Spray, 1998).

Previous studies from our laboratory have demonstrated that Cx43 in the Sertoli cells of the testis co-localize with occludin in the adult testis (Cyr et al, 1999). Other studies have also reported that Cx43 gap junctions can co-localize to tight junctions (Giepmans and Moolenaar, 1998 ; Toyofuku et al, 1998 ; Kojima et al, 1999). Since the formation of the lumen in the seminiferous tubule of PTU-treated rats was delayed, and since lumen formation requires the presence of tight junctions and the resulting vectorial transport across the epithelium towards the lumen, we hypothesized that the increased cytoplasmic Cx43 immunostaining may be the result of a delay in the formation of tight junctions between adjacent Sertoli cells. In the rat, tight junctions in Sertoli cells are formed at the base of the seminiferous tubule at approximately 14 days of age resulting in

the formation of the blood-testis barrier (Vitale et al, 1973). The resulting lumen of seminiferous tubules is first apparent by approximately 16 days of age in the rat (Van Haaster et al, 1993). In the present experiment, the lumen of the seminiferous tubules of control rats is apparent by 18 days of age. In contrast, seminiferous tubules of PTU treated rats only became evident in 30 day old rats. This suggests that thyroid hormones may be necessary for the formation of tight junctions between Sertoli cells. Previous studies by Van Haaster *et al* (1993) reported that T₃-administration can accelerate testicular lumen formation in the rat.

Testicular tight junctions are composed of several different transmembrane proteins including occluding and several claudins (Furuse et al, 1998 ; Moroi et al, 1998 ; Cyr et al, 1999 ; Gow et al, 1999). It has been reported that Cx43 and occludin can co-localize within intercellular junctional complexes including the testis (Cyr et al, 1999 ; Kojima et al, 1999). This co-localization may be related to the binding of both of these proteins to cytosolic tight junctional scaffolding proteins such as zona occludens-1 (ZO-1) (Giepmans and Moolenaar, 1998 ; Toyofuku et al, 1998). The interaction between Cx43 and tight junctional proteins such as occludin and ZO-1 suggests that the effects of thyroid hormones on Cx43 localization could be indirect and may result from alterations in the formation of tight junctions between adjacent Sertoli cells.

The pattern of occludin immunostaining was similar to that which has previously reported (Moroi et al, 1998 ; Cyr et al, 1999). Our results indicate that at 22 and 30 days of age in PTU-treated rats, occludin is not yet localized to the base of the tubule between adjacent Sertoli cells, as observed in control rats (Fig 4-A,C). Alterations in the localization of occludin between Sertoli cells in PTU-treated rats suggest that hypothyroidism delays the formation of tight junctions between Sertoli cells. In fact the absence of specific occluding localization in the area of Sertoli-Sertoli tight junctions is similar to the organization of seminiferous tubules present in younger animals prior to the formation of the blood-testis barrier (Moroi et al, 1998 ; Cyr et al, 1999). Despite the fact that thyroid hormones are known to act directly on Cx43 to regulate its expression (Green et al, 1996 ; Green et al, 1997 ; Stock et al, 1998 ; Stock and Sies, 2000), the results obtained in this study suggest that the effects seen in the localization of this protein, and

of occludin, as well as the effects seen on lumen formation, may be related to a general delay in testicular development. This observation is in agreement with previous report of altered testicular development (Kirby et al, 1992).

In both control and PTU-treated rats, some tubules displayed a more intense Cx43 immunoreaction than others. Previous studies have shown that Cx43 immunostaining is dependent on the stage of the tubule (Risley et al, 1992 ; Tan et al, 1996 ; Batias et al, 2000). Interestingly, this differential expression of Cx43 between different tubules also occurs in immature animals and is not regulated by thyroid hormones.

Northern blot analyses indicate that there are no differences Cx43 mRNA levels, between control and PTU treated rats suggesting that thyroid hormones do not affect the levels of Cx43 but rather the intercellular targeting of Cx43 in the testis.

In the epididymis, our results indicate that neonatal hypothyroidism results in a reduction in Cx43 mRNA levels in the caput-corpus region of the epididymis during PTU treatment, but that this effect does not occur in the cauda epididymidis. Thyroid hormones are known to affect the morphology of the epididymis (Del Rio et al, 2001). However, little is known regarding the regulation of cellular interactions by thyroid hormones. Some studies have shown that thyroid hormones enhance gap junctional communication and Cx43 expression *in vitro* in rat hepatocytes (Stock et al, 1998). Autoimmune thyroid disease, causing hypothyroidism, is associated with a reduction in cell-cell communication and the formation of Cx43 gap junctions in thyroid tissues (Green et al, 1996; Green et al, 1997). Stock and Sies (2000) have recently reported that the thyroid hormone receptor binds to a response element in the Cx43 promoter, which stimulates Cx43 transcription in rat hepatocytes, thereby increasing gap junctional communication (Stock and Sies, 2000). These studies suggest that the decrease in Cx43 mRNA and protein levels in the epididymis of PTU-treated rats results from a lack of thyroid hormones.

In the present experiment, the PTU-treatment was stopped on day 24 and the mRNA levels for Cx43 returned to control levels by 26 days of age, while protein levels, as determined immunocytochemically, returned to control levels by 30 day of age. The transient effect and rapid return to normal can be explained by the short half-life of Cx43

(approximately 1.3 hours ; Spray, 1998). It has also been shown by Kirby *et al* (1992) that thyroid hormones levels were back to normal quickly (within 15 days) after the end of the treatment. Interestingly, Cx43 levels are not regulated by thyroid hormones in the cauda epididymidis. This suggests that thyroid hormones are not the only factors regulating Cx43 and that other factors are likely involved in its regulation. This is not the first demonstration of a differential regulation of mRNA or protein levels along the epididymis. Cyr *et al* (1996) have even shown that the localization of Cx43 in the epididymis was only regulated by androgens in the initial segment of the organ (Cyr et al, 1996). Gregory *et al* (2001) have also demonstrated that androgens regulate claudin-1 expression exclusively in the initial segment. Other genes like CRES, 5 α -reductase and GGT are also regulated by testicular factors in the initial segment only (Hinton et al, 1998). Likewise SGP-2 mRNA levels are androgen repressed only in the distal corpus and cauda epididymidis (Cyr and Robaire, 1992). Whether or not thyroid hormones preferentially regulate specific regions of the epididymis remains to be established.

Unlike in the testis, Cx43 does not co-localize with tight junctional proteins in the epididymis (Cyr, unpublished). The cell adhesion protein E-Cad is also known to modulate the formation of gap junctions in certain epithelial cells (Jongen et al, 1991 ; Meyer et al, 1992 ; Wang and Rose, 1997). Results from the present study indicate that PTU treatment did not result in significant differences in E-Cad mRNA when compared to control rats. It is therefore unlikely that the regulation of Cx43 by PTU involves alteration in E-Cad mediated cell adhesion. The differential regulation of E-cad in the proximal and distal regions of the epididymis is unknown but is unlikely due to a direct regulation by thyroid hormones, since the effect occurred only in 14-day old rats and was not maintained throughout the treatment period.

We assumed throughout the study that the differences observed between control and experimental rats were the result of the hypothyroidism. Although other explanations could maybe be possible, here are the bases of our assumptions. In a study published in 1991, Cooke and Meisami ruled out the possibility of a direct effect of the PTU itself. They have shown that neonatal rats treated with PTU from birth to day 25 via lactation, but also given T₄ and T₃ replacement during that period showed normal testis size. This

also helped to exclude the possibility that the effects seen were the result of the quantity or quality of the milk produced by the hypothyroid lactating dam. However, the PTU-induced hypothyroidism has also been shown to alter other hormonal profiles including LH, FSH and TSH (Kirby et al, 1992). However, only TSH levels have been shown to be elevated during the period of hypothyroidism and although TSH can stimulate proliferation of Sertoli cells, the levels are quickly back to normal after the removal of PTU and testicular growth in those animals is significantly reduced during and immediately after PTU treatment. On the other side, the epididymis, which does not possess receptors for LH, FSH and TSH, is not a target of these hormones. Although this does not allow us to totally exclude that PTU could exert an extrathyroidal effect on the end-points measured, the hypotheses stated are highly plausible.

In summary, our results have shown that neonatal hypothyroidism can regulate the cellular targeting of Cx43 in Sertoli cells of the developing rat. Whether or not this effect is the result of a delay in the differentiation of Sertoli cells remains to be established. Unlike in the testes, in the proximal region of the epididymis Cx43 mRNA levels appear to be thyroid hormone-dependent. These results suggest that thyroid hormones may play an important role in the development of intercellular communication in both the testis and epididymis.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank Dr. Rex Hess (University of Illinois) for his helpful suggestions. Dr. E. Beyer (University of Chicago) is thanked for his generous gift of Cx43 cDNA. S. DeBellefeuille, L. Falcone, M. Gregory and Dr. K. Finnson are thanked for their assistance. This study was supported by the Toxic Substances Research Initiative (Health Canada).

REFERENCES

- Agarwal A, Hoffer AP. Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rat. *J Androl.* 1989;10:425-431.
- Bates JM, St Germain DL, Galton VA. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology.* 1999;440:844-851.
- Batias C, Siffroi JP, Fénichel P, Pointis G, Segretain D. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem.* 2000;48:793-805.
- Benbrook D, Pfahl M. A novel thyroid hormone receptor encoded by a cDNA clone from a human testis library. *Science.* 1987;238:788-791.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin 43 : a protin from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol.* 1987;105:2621-2629.
- Bruzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod.* 2000;62:664-669.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins : the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem.* 1996;238:1-27.
- Canale D, Agostini M, Giorgilli G, Caglieresi C, Scartabelli G, Nardini V, Jannini EA, Martino E, Pinchera A, Macchia E. Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. *J Androl.* 2001;22:284-288.
- Chomczynski P, Sacchi. N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem.* 1987;162:156-159.

Cooke PS. Thyroid hormones and testis development : a model system for increasing testis growth and sperm production. *Ann NY Acad Sci.* 1991;637:122-132.

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

Cyr DG, Hermo L, Blaschuk OW, Robaire B. Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. *Endocrinology.* 1992;130:353-363.

Cyr DG, Robaire B. Regulation of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) messenger ribonucleic acid in the rat epididymis. *Endocrinology.* 2002;130:2160-2166.

Cyr DG, Hermo L, Laird DW. Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. *Endocrinology.* 1996;137:1474-1484.

Cyr DG, Hermo L, Egenberger N, Mertineit C, Trasler JM, Laird DW. Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis". *Endocrinology.* 1999;140:3815-3825.

Cyr DG. Understanding cell-cell interactions in the epididymis : key determinants for structural integrity and spermatozoal maturation. *Nat J And.* 2001;7:351-357.

Cyr DG, Finson K, Dufresne J, Gregory M. Cellular interactions and the blood-epididymal barrier. In Robaire B, Hinton B, eds. *The epididymis : from molecules to clinical practice.* Plenum Publishers. 2002:103-118

Del Rio AG, Valdez CL, Quiros MC. Thyroid gland and epididymal function in rats -

Histological study. Arch Androl. 1979;3:19-22.

Del Rio AG, Blanco AM, Pignataro O, Niepomniszcz H, Juvenal G, Pisarev MA. High-affinity binding of T₃ to epididymis nuclei. Arch Androl. 2000;44:187-191.

Del Rio AG, Palaoro LA, Blanco AM. Epididymal scanning electron microscopy study in hypothyroid rats. Arch Androl. 2001;46:73-77.

Dufresne J, Finnon KW, Gregory M, Cyr DG. Developmental changes in the expression of multiples connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. 2002, (submitted).

Giepmans BNG, Moolenaar WH. The gap junction protein connexin 43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. Curr Biol. 1998;8:931-934.

Hardy MP, Kirby JD, Hess RA, Cooke PS. Leydig cells increases their number numbers but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism. Endocrinology. 1993;132:2417-2420.

Green LM, LaBue M, Lazarus JP, Jennings JC. Reduced cell-cell communication in experimentally induced autoimmune thyroid disease. Endocrinology. 1996;137:2823-2832.

Green LM, Lazarus JP, Song X, Stagg RB, LaBue M, Hilliker S. Elevation of protein kinase C in thymocytes isolated from a Lewis rat model of autoimmune thyroiditis prevents assembly of immunodetectable connexin43 gap junctions and reduces intercellular communication. Thyroid. 1997;7:13-21.

Gregory M, Dufresne J, Hermo L, Cyr DG. Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. Endocrinology. 2001;142:854-863.

- Hess RA, Cooke PS, Bunick D, Kirby JD. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology*. 1993;1993:2607-2613.
- Hinton BT, Lan ZJ, Rudolph DB, Labus JC, Lye RJ. Testicular regulation of epididymal gene expression. *J Reprod and Fertil supp*. 1998;53:47-57.
- Johnson KJ, Patel SR, Boekelheide K. Multiple cadherin superfamily members with unique expression profiles are produced in rat testis. *Endocrinology*. 2000;141:675-683.
- Jongen WMF, Fitzgerald DJ, Asamoto M, Piccoli C, Slaga TJ, Gros D, Takeichi M, Yamasaki H. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by CA2+ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol*. 1991;114:545-555.
- Kirby JD, Jetton AE, Cooke PS, Hess RA, Bunick D, Ackland JF, Turek FW, Schwartz NB. Developmental hormone profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. *Endocrinology*, 1992;131:559-565.
- Kirby JD, Arambepola N, Porkka-Heiskanen T, Kirby YK, Ohoads ML, Nitta H, Jetton AE, Iwamoto G, Jackson GL, Turek FW, Cooke PS. Neonatal hypothyroidism permanently alters follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone production in the male rat. *Endocrinology*. 1997;138:2713-2721.
- Kojima T, Sawada N, Chiba H, Kokai Y, Yamamoto M, Urban M, Lee GH, Hertzberg EL, Mochizuki Y, Spray DC. Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes : connexin 32 interacts with occludin. *Biochem Biophys Res Comm*. 1999;266:222-229.

Lissitzky S. Thyroid hormones. In Baulieu EE, Kelly PA, eds. *Hormones*. New York : Hermann Publishers in arts and science, 1990:341-374.

Meyer RA, Laird DW, Revel JP, Johnson RG. Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J Cell Biol.* 1992;119:179-189.

Moiroi S, Saitou M, Fujimoto K, Sakakibara A, Furuse M, Yoshida O, Tsukita SH. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/ guinea pig Sertoli cells in testes. *Ame J Physiol.* 1998;274:C1708-C1717.

Munari-Silem Y, Rousset B. Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands – molecular and functional aspects : a review. *Eur J Endocrin.* 1996;135:251-264.

Perez-Armendariz EM, Lamoyi E, Mason JL, Cisneros-Armas D, Luu-The V, Bravo Monero JF. Developmental regulation of connexin 43 expression in fetal mouse testicular cells. *Anat Rec.* 2001;264:237-246.

Risley MS, Tan IP, Roy C, Sáez JC. Cell-, age and stage-dependent distribution of connexin 43 gap junctions in testes. *J Cell Sci.* 1992;103:81-96.

Risley MS. Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod.* 2000;62:748-754.

Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerante DK, Kidder GM. Failure of spermatogenesis in mice lacking Cx43. *Biol Repr.* 2001;65:829-838.

Sambrooke J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning : A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 1991.

Simon AM, Goodenough DA. Diverse function of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* 1998;8:477-483.

Spray DC. Gap junction proteins. Where they live and how they die. *Circul Res.* 1998;83:679-681.

Steger K, Tetens F, Bergmann M. Expression of connexin 43 in human testis. *Histochem Cell Biol.* 1999;112:215-220.

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

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

Tan IP, Roy C, Sáez JC, SáezCG, Paul DL, Risley MS. Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biol of Reprod.* 1996;54:1300-1310.

Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M. Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chemis.* 1998;273:12725-12731.

Van Haaster LH, De Jong FH, Docter R, De Rooij DG. 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.* 1993;133:755-760.

Viger RS, Robaire B. Differential regulation of steady state 4-ene steroid 5 α -reductase

messenger ribonucleic acid levels along the rat epididymis. *Endocrinology*. 1991;128:2407-2414.

Vitale R, Fawcett DW, Dym M. The normal development of the blood-testis barrier and the effects of Clomiphene and estrogen treatment. *Anat Rec*. 1973;176:333-344.

Wang Y, Rose B. An inhibition of gap junctional communication by cadherins. *J Cell Sci*. 1997;110:301-309.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Western blot of thyroid hormone receptor α in the epididymis. Total protein extract from epididymides of 26 and 91 days and 91d testes were separated on SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with thyroid hormone antibody (TR1), and the protein was detected using a streptavidine-alkaline phosphatase-conjugated antibody. Adult testis was used as a positive control. E, epididymis ; TE, testis ; MW, molecular weights.

Figure 2. Northern blot analyses of Cx43 levels in rat testis during postnatal development. Total cellular RNA was isolated from testes of 14, 18, 22, 26, 30 and 91 day old rats. A single band of approximately 3.0 kb was detected. The intensity of the bands at different ages was determined by densitometry. The blot was then reprobbed with a 18S rRNA probe to standardize for RNA loading. To allow blot to blot comparisons, data were normalized relative to data from 14-day-old control rat. The data were expressed as the mean \pm SEM from four separate pools of testicular tissue.

Figure 3. Immunolocalization of Cx43 in testis of control (A, C, E) and PTU-treated rats (B, D, F) of 22 (A, B, C, D) and 30 (E, F) days of age rats immunostained with anti-Cx43 antibody. At both ages, the seminiferous tubules of PTU-treated rats are smaller than those of control animals. Moreover, the lumen is absent in testis of 22 days old rats and begins to form in of 30 day old rats, while in control it is already open at 22 day of age. In testes of control (A, C) and treated 22 day old rats (B, D), the staining is present along the lateral margins of plasma membranes of Sertoli cells (arrows). In treated rats however, the reaction product is more cytoplasmic (thin arrows). In control testes of 30 days , the immunostaining is localized at the base of the tubule between Sertoli cells and forms discontinuous wavy reactive bands (arrows) and there is also some punctate staining higher in the tubules (arrowheads) (E). In treated sections, the staining is still lateral and once again does is more cytoplasmic (thin arrows) (F). IT, interstitial space ; L, Leydig

cells ; Lu, lumen ; g, germ cells ; rs, round spermatids ; s, Sertoli cells. Magnification : A, B - X-400 ; C, D, E, F- X-640. n=4.

Figure 4. Light micrographs of the immunolocalization of occludin in the testis of 22 (A, B) and 30 (C, D) days rats. In control rats of both ages, occludin immunostaining (arrows) appears at the base of the seminiferous tubules where tight junctions form the blood-testis barrier (A, C). In 22 day old rats treated with PTU, there is no lumen and the staining (arrowheads) is found throughout the tubules (B). By day 30, the lumen begins to open and the immunolocalization of occludin is localized at the base of some tubules (not shown), however in most tubules, the staining is still disorganized (arrowheads) (D). In all cases, some tubules stained stronger than others. L, Leydig cells ; Lu, lumen ; g, germ cells ; rs, round spermatids ; s, Sertoli cells . Magnification : X640. n=4.

Figure 5. Northern blot analyses of Cx43 mRNA levels in rat epididymides during postnatal development. Total cellular RNA was isolated from either the proximal (A) or distal (B) segments. A single 3.0 kb band was obtained. The blots were standardized using a 18S rRNA probe. The intensity of the bands was determined by densitometry. Data were normalized to data from the 14-day-old control rat. Data are expressed as mean \pm SEM (n=4). The asterisks indicate a significant difference between control and PTU-treated rats ($P < 0.005$). The Δ indicate a significant difference between Cx43 mRNA levels at this age when compared to other ages ($P < 0.005$).

Figure 6. Light micrographs of the initial segment (A, B), caput (C, D), corpus (E, F) and cauda (G, H) epididymides of control (A, C, E, G) and PTU-treated (B, D, F, H) rats of 22 days of ages. In tissue sections from control animals, the immunoperoxidase reaction is located at the basal region between principal and basal cells (arrows). In the sections from treated animals, the same staining is found in the cauda but is almost absent in the three other regions. At day 30 (data not shown), there are no difference between control and treated animals. b, basal cells ; p, principal cells ; c, clear cell ; IT, interstitial space ; L, lumen . Magnification : X640. n=4.

Figure 7. Northern blot analyses of E-cadherin mRNA levels in rat proximal (A) and distal (B) epididymides. A single band of 4.7 kb was obtained. RNA loading was standardized using a 18S rRNA probe. Densitometry was used to determine intensity of the bands. Data are expressed as a percentage of 14 day old control rats \pm SEM (n=4). The asterisks indicate a significant difference between control and PTU-treated rats ($P < 0.005$).

Table 1.

**Mean body weights \pm SEM of control and PTU-treated rats
sampled on day 14, 18, 22, 26, 30 and 91.**

Ages	Weights (g)	
	Controls	PTU-treated
14 (n=12)	27.43 \pm 0.857	24.17 \pm 0.456
18 (n=12)	37.98 \pm 0.960	28.63 \pm 0.726
22 (n=10)	50.93 \pm 1.38	32.55 \pm 0.894
26 (n=6)	73.48 \pm 1.56	35.98 \pm 2.44
30 (n=6)	96.08 \pm 4.73	39.30 \pm 0.413
91 (n=5- Ctrl / n=8- PTU)	484.16 \pm 24.03	403.51 \pm 15.27

FIGURE 1

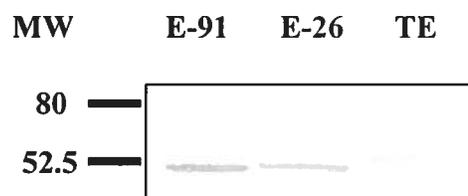


FIGURE 2

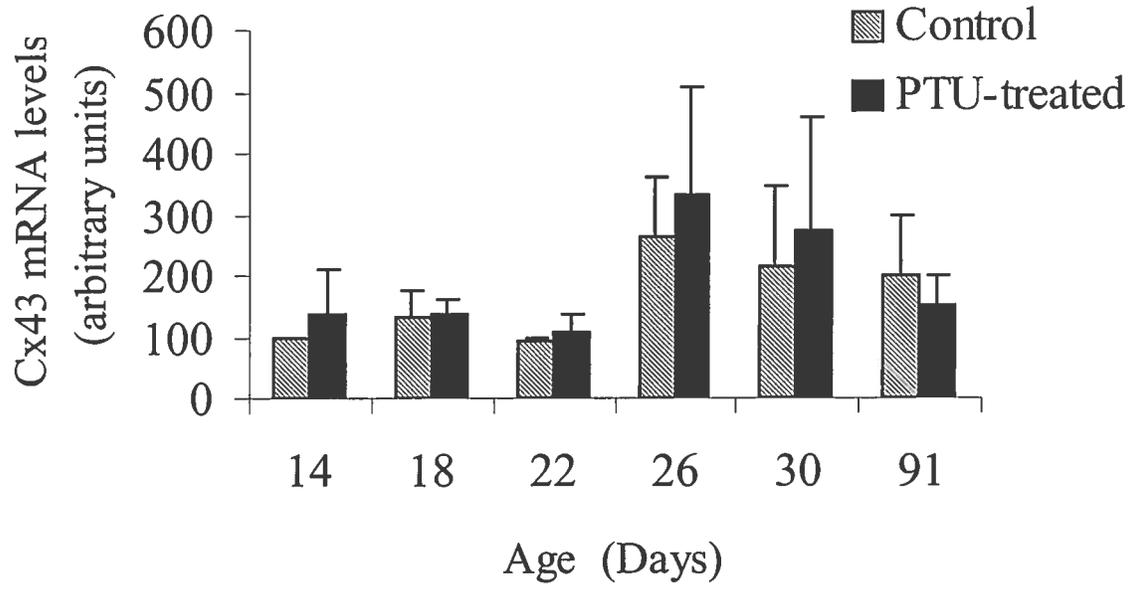


FIGURE 3

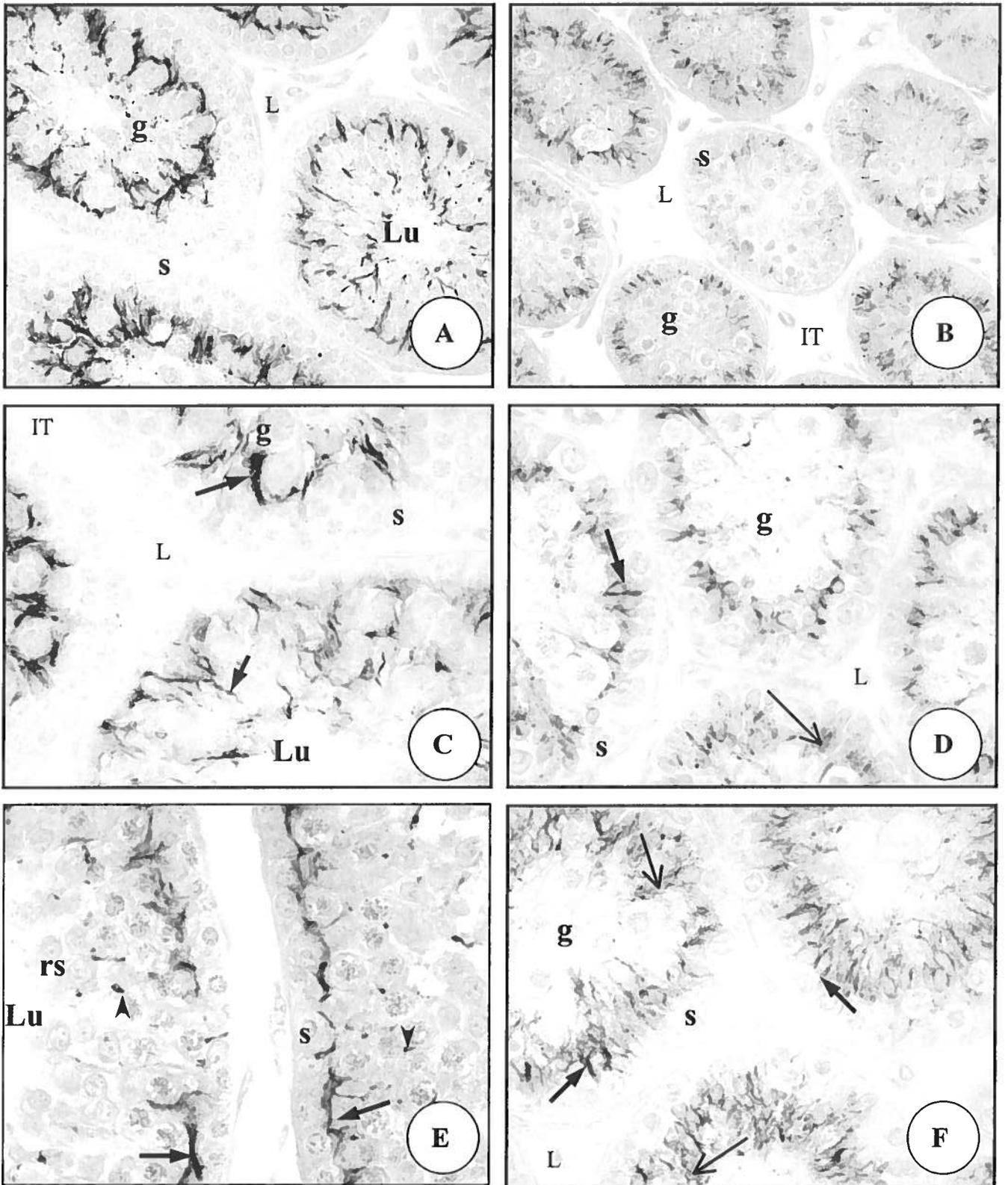


FIGURE 4

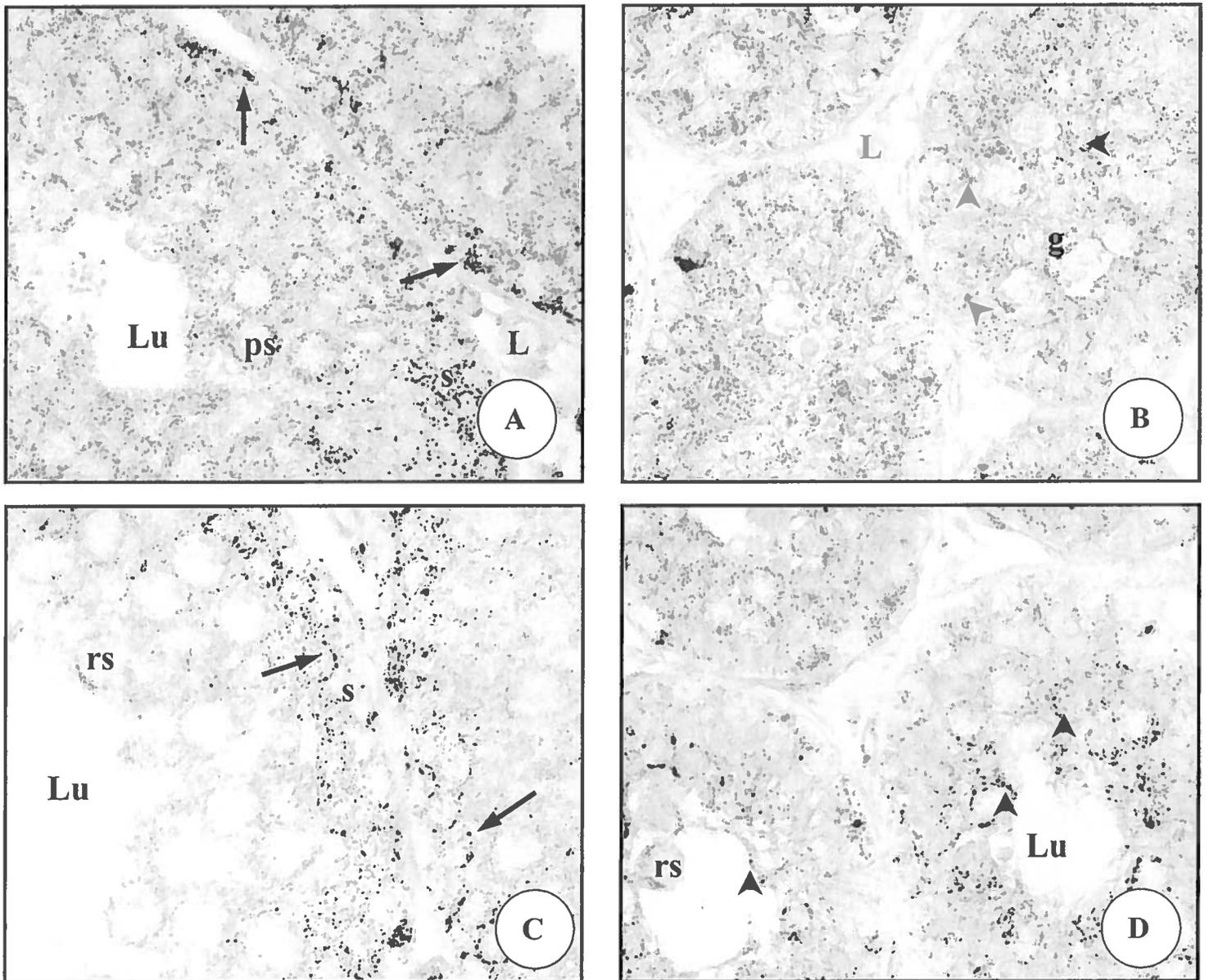


FIGURE 5

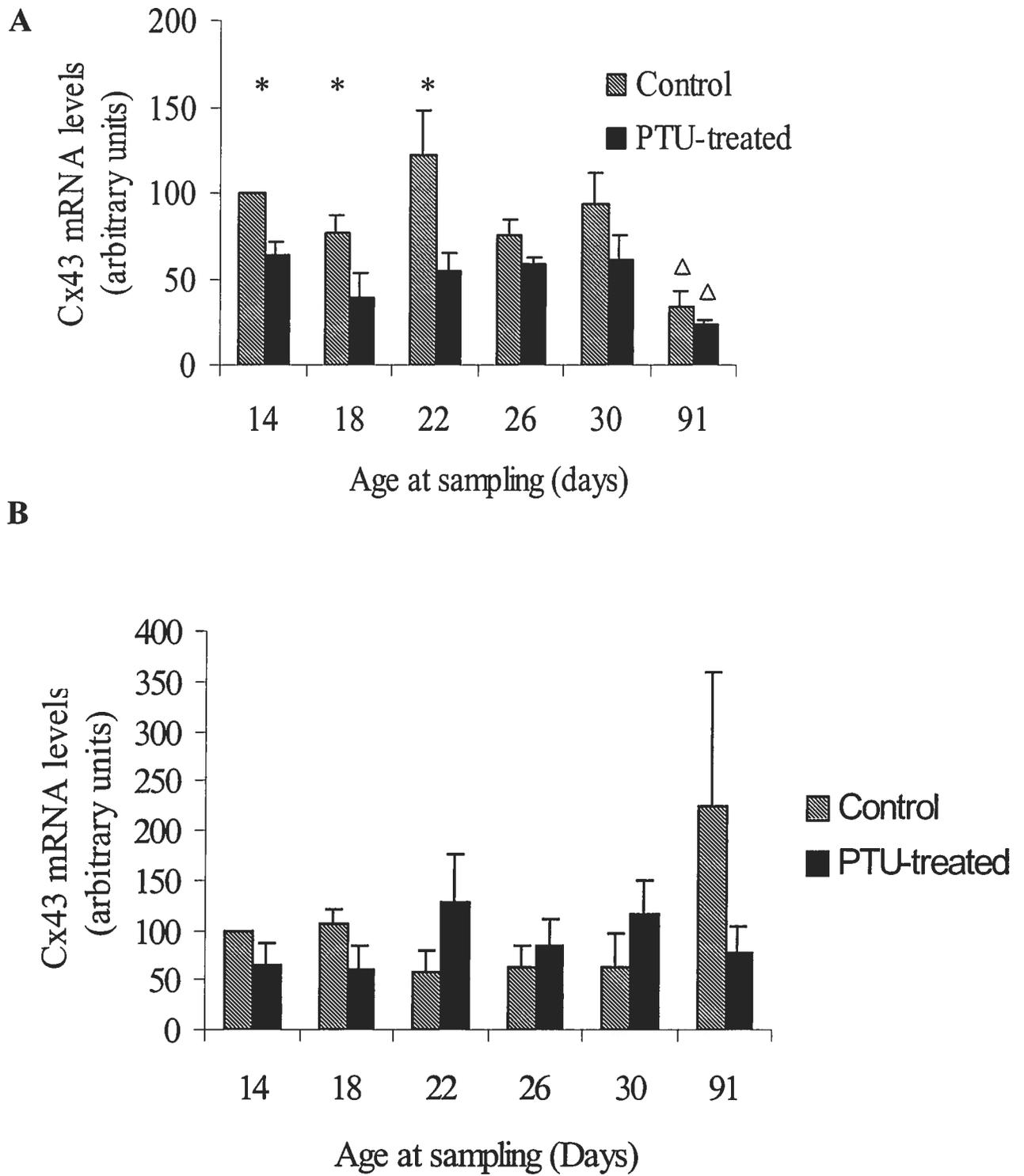


FIGURE 6

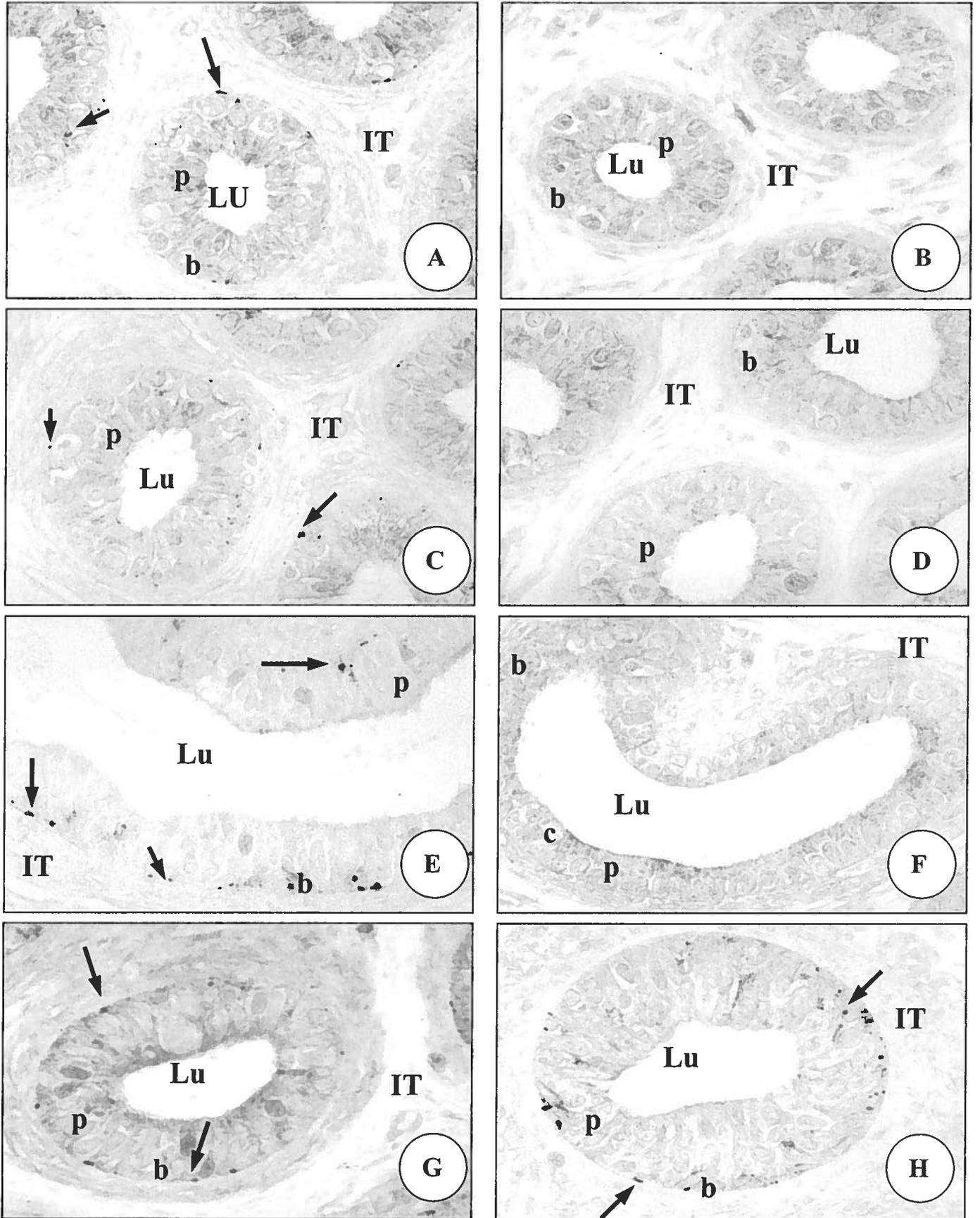
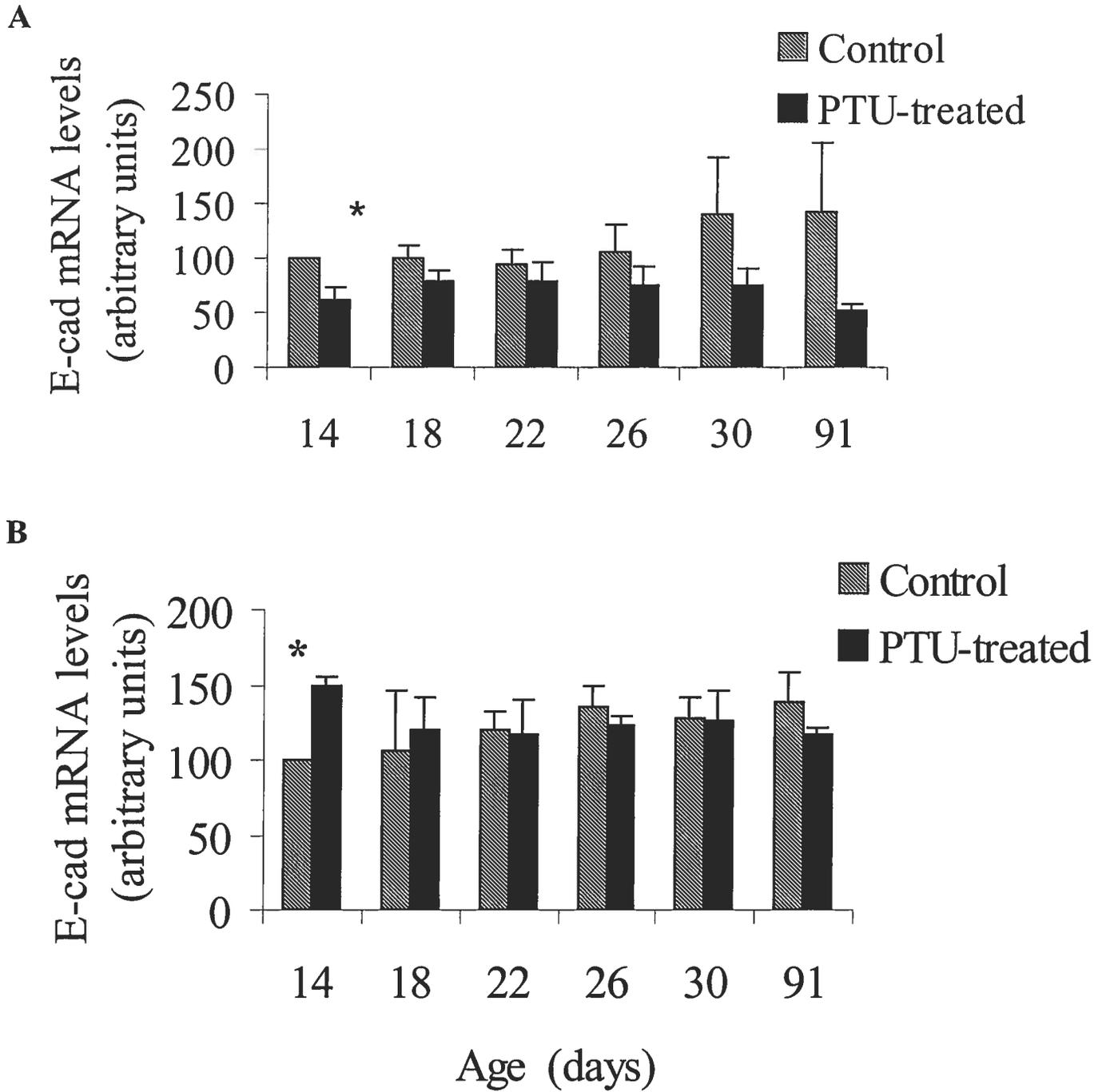


FIGURE 7



MA CONTRIBUTION - SECOND ARTICLE

Ma contribution dans ce deuxième article est majoritaire. La rédaction de l'article ainsi que la majeure partie des manipulations ont été réalisées par moi. En fait, la seule contribution externe concerne la microscopie électronique qui a été réalisée par Daniel G. Cyr.

SECOND ARTICLE

**Création d'une lignée cellulaire de l'épididyme
par immortalisation avec l'antigène grand-T**

Nancy St-Pierre et Daniel G. Cyr

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, QC, Canada

RÉSUMÉ

L'épididyme est un organe qui joue un rôle crucial dans la maturation des spermatozoïdes. Toutefois, la régulation de ses fonctions est complexe. Des jonctions serrées, lacunaires et adhérentes sont présentes dans l'épididyme et celles-ci sont essentielles pour que les fonctions de l'organe soient accomplies. Diverses hormones contrôlent ces jonctions. Cela rend donc difficile l'étude de la physiologie et des différentes fonctions de l'épididyme *in vivo*. Des méthodes d'isolation des cellules épithéliales principales de l'épididyme sont bien connues. Toutefois, de nombreux facteurs limitent l'utilisation de ces cultures pour étudier la régulation et les fonctions des cellules épидидymaires. La création d'une lignée cellulaire épидидymaire permettrait de faciliter ces recherches. Ce projet avait pour objectifs de sélectionner une méthode de culture primaire de cellules principales de l'épididyme, de vérifier la présence de protéines de jonctions cellulaires et de créer une lignée de cellules épithéliales principales de l'épididyme par immortalisation avec l'antigène grand-T du virus simien 40 (SV40). La méthode utilisée pour isoler les cellules épithéliales de l'épididyme permet d'obtenir une culture pure à environ 85-90%. De plus, les cellules forment des jonctions serrées et d'adhérence, tel que démontré par la présence de E-Cad, occludine et claudine-1 par immunohistochimie. Afin d'obtenir une lignée cellulaire de l'épididyme, les cellules épithéliales isolées ont été transfectées par précipitation au phosphate de calcium avec un plasmide contenant l'antigène grand-T et une résistance pour la néomycine (G-418). Les cellules transfectées ont été sélectionnées par exposition au G418, puis caractérisées. Ainsi, les cellules du clone ne contiennent pas de cytokératine. Toutefois, elles expriment CRISP-1, un marqueur épидидymaire, le récepteur à androgènes et claudine-1 (Cl-1). La morphologie des cellules, telle qu'observée en microscopie électronique, indique que ce sont des cellules épithéliales épидидymaires. Cependant, les cultures contiennent trois types cellulaires, soit des cellules principales, apicales et claires. De plus, les cellules obtenues croissent extrêmement lentement ce qui limite grandement l'utilisation de la lignée. La lignée n'a donc pas pu être utilisée aux fins souhaitées, soit l'étude de la régulation des jonctions cellulaires dans l'épididyme par les hormones thyroïdiennes. Malgré tout, avec quelques modifications des conditions de cultures, cette lignée pourrait éventuellement être utilisée.

INTRODUCTION

Afin de poursuivre l'étude de l'impact des hormones thyroïdiennes sur les jonctions cellulaires, nous avons décidé de mettre au point une lignée cellulaire de l'épididyme.

L'implication de l'épididyme dans la maturation des spermatozoïdes est connue depuis de nombreuses années (Orgebin-Crist, Danzo et Davies, 1975). Lors de leur transit épидидymaire, les spermatozoïdes interagissent avec certaines protéines sécrétées par les cellules épithéliales de l'épididyme et sont aussi exposés à des concentrations changeantes de différents ions et molécules (Bedford, 1975 ; Hamilton, 1975). Cet environnement luminal spécifique est créé par la barrière hémato-épididymaire formée par la présence de jonctions serrées à la partie apicale entre les cellules principales (Hinton, 1985). Outre ces jonctions serrées, des jonctions d'adhérence et lacunaires ont aussi été identifiées dans l'épididyme (Friend et Gilula, 1972 ; Cyr et Robaire, 1991 ; Cyr *et al.*, 1996). Ainsi, le réseau de communication intercellulaire de l'épididyme est complexe et plusieurs facteurs de régulation sont possiblement impliqués. Parmi ceux-ci, les hormones thyroïdiennes, tel que démontré dans la section précédente. Cette deuxième partie de l'étude consistait à mettre au point un modèle *in vitro* pouvant permettre de poursuivre l'étude de la régulation des jonctions épидидymaires par les hormones de la thyroïde.

Les modèles *in vivo* utilisant des cultures primaires sont très utiles pour élucider les processus et mécanismes cellulaires menant à une certaine réponse de l'organe ou de l'organisme. Ils permettent aussi d'étudier un type cellulaire précis et d'agir sur certaines molécules. Plusieurs méthodes de culture primaire des cellules épидидymaires sont connues (Orgebin-Crist et Tichenor, 1972 ; Klinefelter, Anann et Mammstedt, 1982 ; Pera, Ivell et Kirchhoff, 1996 ; Chen *et al.*, 1998 ; Kirchhoff *et al.*, 2000). L'utilisation des cultures primaires comporte aussi des limitations (Lewin, 1999 ; Wadhwa, Kaul et Mitsui, 1999). Dans le cas des cellules épидидymaire, leur taux de division est extrêmement lent (Olson *et al.*, 1983). L'utilisation d'une lignée cellulaire permet de surmonter ces inconvénients, puisque les cellules peuvent être conservées pour un nombre presque illimité de passages (Wadhwa, Kaul et Mitsui, 1999) et que ces cellules ont souvent une

croissance plus rapide. L'une des grandes limitations dans l'étude des fonctions et de la physiologie de l'épididyme, de même que dans l'étude de la communication cellulaire dans cet organe, est l'absence d'une lignée cellulaire épидидymaire

L'une des méthodes largement utilisée pour la formation de lignée cellulaire est l'immortalisation avec l'antigène grand-T de SV40. Malgré l'incertitude qui règne encore quant au mécanisme exact entourant l'immortalisation par l'antigène grand-T, la méthode n'en demeure pas moins très efficace. Ainsi, plusieurs types cellulaires ont pu être immortalisés avec cet antigène. Des lignées cellulaires de tissus épithéliaux de diverses origines ont été créées à l'aide de l'antigène grand-T (Almazan et McKay, 1992 ; Vidal *et al.*, 1993 ; Den Besten *et al.*, 1999), dont une lignée de cellules épидидymaires de fœtus (Coleman et Harris, 1991). Différentes techniques peuvent être utilisées pour introduire l'antigène dans les cellules : infections rétrovirales (Almazan et McKay, 1992), transfection simple ou d'un plasmide manquant l'origine de réplication (Ori- Origin-of-replication defective ; Coleman et Harris, 1991 ; Den Besten *et al.*, 1999), ou encore l'utilisation de cellules provenant d'animaux transgéniques pour l'antigène grand-T de SV40 (Obinata, 1997).

L'objectif de cette étude était donc de mettre au point une lignée cellulaire de l'épididyme pouvant, en premier lieu, nous permettre de poursuivre l'étude de l'impact des hormones thyroïdiennes sur les jonctions de l'épididyme et éventuellement servir à d'autres aspects de l'étude de l'organe. La première étape fut donc de choisir et mettre au point une méthode d'isolation de cellules et de culture primaire et de déterminer si les cellules forment des jonctions cellulaires dans les conditions de culture choisies. Par la suite, nous avons mis au point une lignée de cellules principales du segment proximal (segment initial et tête) de l'épididyme par immortalisation avec l'antigène grand-T de SV40. Un clone cellulaire a été isolé et caractérisé au niveau de sa morphologie, de sa structure ainsi que pour l'expression de certains marqueurs épithéliaux épидидymaires. Toutefois, le taux de croissance très lent des cellules de cette lignée limite largement son utilisation

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Cultures primaires

Des cultures primaires de cellules épithéliales principales du segment initial et de la tête de l'épididyme de rat Sprague-Dawley d'environ 40 jours (151-175 g ; Charles River, St Constant, Qc) ont été établies en modifiant légèrement la méthode utilisée par Kirchhoff et al. (2000). Des rats de 40 jours ont été utilisés afin d'éviter la présence de spermatozoïdes dans l'épididyme. Cette méthode consiste à désagréger les tissus par digestions enzymatiques et mécaniques, puis à mettre en culture des amas de cellules ou fragments d'épithélium.

Les rats juvéniles sont d'abord asphyxiés au dioxyde de carbone (CO₂), puis tués par dislocation cervicale. L'abdomen des rats est alors incisé et les épидидymes, nettoyés de leur gras, retirés aseptiquement. Seul le segment initial et la tête de l'épididyme sont conservés dans du milieu de culture (DMEM/HAM F12 ; Sigma Chemicals, Mississauga, ON) contenant uniquement de l'antibiotique (50 U/ml pénicilline et 50 mg/ml streptomycine ; Sigma Chemicals, Mississauga, ON). Les épидидymes de quatre animaux sont retirés du milieu et coupés finement avec des ciseaux. Les fragments de tissus (2-3 mm) obtenus sont placés dans du milieu contenant les antibiotiques, de même que 2 mg/ml de collagénase à hépatocytes (Gibco BRL, Invitrogen, Burlington, ON) et 20 mg/ml de DNase (Promega, Madison, WI) et sont par la suite digérés pour trois périodes de 50 minutes chacune, dans un bain agitateur à 37°C. Après la première digestion, le milieu de digestion contenant les fragments d'épididyme est aspiré à cinq ou six reprises dans une pipette de 10 ml pour permettre de défaire légèrement les morceaux de tissus. La solution est ensuite laissée sans mouvement pour 5 minutes afin de sédimenter les fragments, puis le milieu aspiré et remplacé par une nouvelle solution contenant les mêmes enzymes. Après la deuxième digestion, les cellules sont sédimentées, puis le milieu changé. La troisième étape de digestion est suivie d'une étape d'aspiration avec la pipette. Les agrégats de cellules sont par la suite récupérés par une centrifugation lente (34xg) de 3 minutes. Le culot de cellules est ensuite resuspendu dans du milieu complet (50 U/ml pénicilline, 50 mg/ml streptomycine, 2 mM de L-glutamine, 10 µg/ml d'insuline et de transférine, 80 ng/ml d'hydrocortisone, 1 µg/ml de rétinol, 10 ng/ml d'EGF de

d'AMPc et 1% de sérum de veau fœtal (FBS) (Sigma Chemicals, Mississauga, ON). Les petits agrégats de cellules sont par la suite mis en culture dans des plaques de 24 puits en plastique dans un incubateur humidifié à 32° C et 5% CO₂. Le milieu de culture est changé 24 heures après l'isolation, puis ensuite chaque deux jours. Dans ces conditions, les cellules ont pu être conservées jusqu'à trente jours.

Immunofluorescence

Après cinq jours en culture primaire, quelques cellules furent d'abord marquées en immunofluorescence directe avec un anticorps permettant de détecter la cytokératine. L'expression de cette protéine des filaments intermédiaires des cellules épithéliales devait nous permettre de s'assurer de la nature épithéliale des cellules isolées. Pour ce faire, les cellules étaient d'abord lavées pour trois fois cinq minutes à la température de la pièce avant d'être perméabilisées avec une solution de 0,1% Triton-100X dans du PBS (phosphate-buffered saline) pour une période de 20 minutes sur la glace. Par la suite, les cellules sont lavées à nouveau (3 fois 5 minutes), puis fixées pour 15 minutes à -20°C avec une solution de 70% éthanol dans du PBS. Après lavage avec le PBS, les sections sont bloquées avec une solution contenant 11% de FBS dans un mélange de PBS- 0,1% Na₃N- 1% BSA pour 30 minutes à 37°C avec agitation, suivi de trois lavages avec du PBS. Il y a ensuite incubation de 90 minutes avec l'anticorps pan-cytokeratine conjugué au FITC (dilution 1/100 ; Sigma Chemicals, Mississauga, ON) à 37°C avec agitation et protégé de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées au PBS puis recouvertes d'une solution de montage (Vector Laboratories, Burlington, CA) contenant de l'iodure de propidium (pour colorer les noyaux), puis observées en microscopie de fluorescence.

L'immunofluorescence indirecte, avec un protocole de marquage similaire, a été utilisée pour marquer les protéines de jonctions cadhérine épithéliale (E-Cad, 1/100 ; BD company, Mississauga, ON), connexine-43 (Cx-43, 100µg/ml ; Santa Cruz Biotech, CA), occludine (10 µg/ml ; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) et claudine-1 (Cl-1, 1/100 ; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA). Dans ce cas toutefois, l'incubation avec le premier anticorps, non conjugué, est suivie d'une incubation de 30 minutes avec un anticorps secondaire conjugué au FITC (1/500 ; Sigma Chemicals, Mississauga, ON) à

37°C en agitation. Dans les deux cas, des sections incubées avec du FBS ont été utilisées comme contrôle négatif.

Transfections

Des essais pour mettre au point le protocole de transfections ont d'abord été réalisés avec le plasmide RSV-luc et la lignée cellulaire CV-1 (cellules de rein de Singe vert d'Afrique), en comparaison avec les cultures primaires épидидymaires. Le protocole utilisé est celui optimisé pour les cellules CV-1 par le Dr. R. Viger (Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval). Les cellules sont conservées à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5% CO₂. Au jour 1, environ 25 000 à 50 000 cellules (CV-1) sontensemencées dans des plaques de cultures de 24 puits. Au matin du jour 2, le milieu (DMEM, Gibco BRL, Invitrogen, Burlington, ON) est changé et une évaluation de la confluence est réalisée. Des essais antérieurs ont démontré qu'une confluence entre 30-40 % permettait une plus grande efficacité de transfection. En après-midi du jour 2, les cellules sont transfectées par la méthode de précipitation au phosphate de calcium (CaCl₂). À un aliquot de 2,5 µg d'ADN total dilué dans du TE (entre 0 et 400 ng de plasmide RSV-luc à compléter avec un vecteur de clonage standard Sp64) de l'eau nanopure filtrée est ajoutée jusqu'à un volume de 25 µl. Sous une hotte à flux laminaire stérile, un volume (25 µl) de 4X CaCl₂ (40 µl EDTA 0.2mM, 400 µl Tris-HCl 2mM, 1,47 g CaCl₂-H₂O ; pH 7.9 ; à température pièce) est ajouté au mélange H₂O/ADN. Dans un tube transparent contenant 50 µl de 2X HBS (0,24 g d'Hepes, 0,33 g NaCl, 8,04 mg Na₂HPO₄-7H₂O ; pH 7,1 ; température pièce) le mélange H₂O/ADN/CaCl₂ est ajouté goutte à goutte, puis la réaction est catalysée en faisant des bulles. Par la suite, le tout est laissé 30 minutes au repos sous la hotte ; cela permet au précipité de se former. Le mélange est ensuite ajouté goutte à goutte dans deux puits de cellules (45 µl chacun pour former un duplicata). Le matin du jour 3, le milieu est changé. À ce moment, l'observation des cellules au microscope permet de visualiser le précipité. Au jour 4 en après-midi, les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées avec 100 µl de tampon de lyse (940 µl H₂O, 5 µl 1M DTT, 50 µ Tris 2M pH8.0, 5 µl IGEPAL). Après 30 minutes, 80 µl de lysat est récupéré et exposé à 70 µl de tampon luciférine 1X (solution stock 10X : 27,6 ml H₂O,

3,14 ml 1M MgCl₂, 628 µl 100mM lithium CoA, 942 mg ATP et 100 mg luciférine ; Sigma Chemicals, Mississauga, ON) et une lecture en RLU (Relative Light Units) de 10 secondes est prise dans un luminomètre (MLX Microtiter Plate Luminometer, Dynex Technologies, Franklin, MA).

Le protocole utilisé afin de transfecter les cellules épидидymaires est identique, sauf en ce qui concerne le nombre de cellules mises en culture. Dans ce cas, six jours après l'isolation des cellules, le milieu ayant été changé le jour précédant, nous procédions aux transfections, sans toutefois se soucier du nombre de cellules. Comme la méthode d'isolation consiste à ensemercer des fragments de tissus et non des cellules isolées, il s'avère difficile de compter le nombre de cellules. Cependant, après six jours de culture, l'évaluation de la confluence se trouve autour de 30 à 40 %. Afin d'optimiser au maximum l'efficacité des transfections avec les cellules épидидymaires, nous avons aussi utilisé la méthode de transfection par lipofectamine selon les recommandations du fabricant (Gibco BRL, Invitrogen, Burlington, ON).

En ce qui concerne les transfections des cultures primaires avec l'antigène grand-T de SV40, le protocole suivi est le même, sauf pour le plasmide utilisé (antigène grand-T au lieu de RSV-luc). Le plasmide nous a été généreusement fourni par le Dr. David Silverside. La figure 1 présente le schéma de la construction du plasmide. 0 à 200 ng du plasmide ont été transfectés lors de l'immortalisation. Cependant, au lieu de lyser les cellules au jour 4 post-transfections, nous avons débuté la sélection.

Sélection des cellules contenant les plasmides

Le plasmide utilisé pour les transfections de l'antigène grand-T possède à la fois l'antigène grand-T de SV-40 et une résistance pour la néomycine. Afin de sélectionner les cellules ayant incorporé efficacement le plasmide, nous avons procédé à la sélection en les exposant à leur milieu habituel mais contenant 200 µg/ml de G418 (Gibco BRL, Invitrogen, Burlington, ON) pendant deux semaines. Après cette période, les clones résistants ont été isolés par dilution limite, puis laissées à croître dans du milieu sans antibiotique. Un seul clone a ainsi pu être sélectionné.

Caractérisation du clone

Le clone obtenu fut caractérisé en immunofluorescence, par PCR avec transcription inverse (RT-PCR) et en microscopie électronique. Afin d'évaluer la sensibilité des cellules à la testostérone, certaines furent cultivées dans du milieu contenant tous les suppléments ainsi que 10 ng/ml de testostérone. Des cellules provenant des deux milieux de culture ont ensuite été caractérisées afin d'en préciser la nature.

Afin de déterminer la nature épithéliale des cellules, celles-ci furent marquées en immunofluorescence pour la cytokératine. En bref, le même protocole mentionné précédemment a été utilisé. Toutefois, les cellules n'adhérant pas aussi fermement, il y a d'abord eu récupération de celles-ci puis centrifugation sur une lame avant d'être marquées. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous n'avons pas effectué le marquage des protéines de jonctions.

Nous avons donc décidé de déterminer les niveaux d'ARNm des protéines de jonctions par RT-PCR. L'ARN total des cellules fut isolé à l'aide de la trousse Rneasy (Quiagen, Mississauga, ON) selon les instructions du fabricant, puis traité à la DNase (Gibco BRL, Invitrogen, Burlington, ON). L'ADNc fut synthétisé à partir de 500 ng d'ARN total en utilisant une amorce oligo(déoxythymidine)₁₆. Des amorces pour CRISP-1 furent désignées pour amplifier un fragment de 600 pb. Les amorces de C1-1 (Furuse *et al.*, 1998), de E-Cad (Johnson, Patel et Boekelheide, 2000) et pour le récepteur à androgène (Singh *et al.*, 2000) ont aussi été utilisées. Les conditions d'amplification et les séquences des amorces sont décrites dans le tableau 1. Les produits de PCR ont ensuite été migrés sur un gel d'agarose à 1% préparé dans du TBE 0,5X (Tris-borate : 0,045 M Tris-borate et 0,001 M EDTA) et contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml).

Afin de confirmer la nature des cellules obtenues, celles-ci furent observées en microscopie électronique. Ainsi, quelques cellules sont d'abord récupérées des puits par trypsinisation et centrifugées brièvement pour obtenir un culot de cellules. Celui-ci est ensuite resuspendu dans une solution de paraformaldéhyde (4%) et glutaraldéhyde (0,1%)

et laissées pour être fixées toute la nuit. Par la suite, les cellules sont lavées pour trois périodes de dix minutes dans une solution 0,1 M cacodylate, puis laissées deux heures dans une solution de 1% de tétraoxyde d'osmium à 4°C. Les cellules sont lavées à nouveau dans la solution de 0,1 M cacodylate, déshydratées et préparées dans l'EPON. Les sections ont ensuite été observées en microscopie électronique.

RÉSULTATS

Cultures primaires de cellules épithéliales

Les agrégats de cellules adhèrent au fond des puits dans les 24 heures suivant la mise en culture. Par la suite, les cellules s'étalent autour de cet agrégat et forment une monocouche. Lorsqu'elles adhèrent, les cellules prennent une forme allongée (Fig. 2). Le marquage en immunofluorescence de la cytokératine a permis de démontrer la nature épithéliale des cellules isolées. En effet, entre 85-90% des cellules sont positives pour cette protéine des filaments intermédiaires des cellules épithéliales (Fig. 3).

Marquage des protéines de jonctions

Le marquage en immunofluorescence de la protéine de jonction d'adhérence E-Cad a permis de démontrer la formation d'une monocouche, possiblement polarisée, par les cellules mises en culture. En effet, E-Cad est présente et se localise en bordure de cellules adjacentes, indiquant la présence de jonctions adhérentes (Fig. 4a). Les protéines de jonctions serrées occludine (Fig. 4b) et Cl-1 (Fig. 4c) se localisent aussi à la périphérie des cellules entre celles-ci. Aucun marquage n'a pu être observé dans les sections marquées avec la Cx43. Il n'y a aucun marquage dans les cellules incubées avec le FBS (témoin négatif) (Fig. 4d).

Essais de transfection avec RSV-luc

Les résultats obtenus lors des essais de transfection avec RSV-luc ont démontré la possibilité de transférer des cellules épithéliales de l'épididyme par la méthode de

précipité au phosphate de calcium (CaCl_2). La comparaison avec les transfections de la lignée CV-1 démontre toutefois que l'efficacité est moins grande. De plus, même une augmentation de la quantité d'ADN transfectée ne s'est pas révélée une méthode plus efficace (Fig. 5). En ce qui concerne les transfections avec la lipofectamine, les résultats obtenus montrent que la méthode ne permet pas d'obtenir un meilleur taux de transfection (Fig. 6). La méthode par précipitation au phosphate de calcium a donc été favorisée pour la création de la lignée cellulaire de l'épididyme.

Immortalisation

Les cellules épидидymaires ont été transfectées avec l'antigène grand-T par précipitation au phosphate de calcium avec 0 ou 200 ng du plasmide. Après 4 jours de culture, les clones cellulaires ont été sélectionnés. Pour ce faire, les cellules furent exposées dans leur milieu de culture à 200 μg de G418 (néomycine) pour deux semaines. Après cinq jours, aucune des cellules transfectées avec 0 ng de plasmide n'avaient survécu. Les cellules ayant résisté au G418 contiennent la résistance à la néomycine et celle-ci leur est conférée par le plasmide contenant aussi l'antigène grand-T. Ainsi donc, les quelques clones ayant survécu furent isolés par dilution limite. Cependant, avec des cellules adhérentes, il est très difficile d'isoler une seule cellule, plusieurs étant perdues à chaque fois. Il est donc possible qu'il y ait eu deux ou trois cellules par clone. Le temps de division des cellules obtenues est extrêmement lent et le temps de doublage n'a pu être déterminé puisque très variable. Un seul clone a été obtenu et utilisé pour caractérisation.

Caractérisation cellulaire

Dès que le nombre de cellules du clone fut suffisant, celles-ci furent séparées en deux groupes et l'un d'eux exposé à la testostérone (10 ng/ml). Quelques cellules de chacun des groupes furent ensuite utilisées pour la caractérisation. La première étape de ce processus fut de vérifier la nature épithéliale des cellules en marquant la cytokératine en immunofluorescence. Contrairement aux résultats obtenus avec les cultures primaires, toutes les cellules de la future lignée cellulaire étaient négatives, qu'elles furent ou non exposées à la testostérone.

L'amplification par RT-PCR à quant à elle permet d'identifier la présence du messager de CRISP-1, un marqueur épидидymaire sécrété par les cellules principales de l'épididyme, dans les cellules exposées à la testostérone et très faiblement dans les autres. Le récepteur à androgènes a aussi été amplifié dans les deux groupes de cellules (Fig. 7). De plus, il y a eu amplification d'un fragment correspondant à la Cl-1, mais aucun transcrit pour la protéine de jonction d'adhérence E-Cad. Nous avons vérifié pour E-Cad la sélection des amorces en l'amplifiant E-Cad à partir d'ARN d'épididyme. Une bande de 230 pb a été amplifiée, clonée et séquencée afin de confirmer la spécificité du produit amplifié.

Nous avons ensuite caractérisé la morphologie des cellules par microscopie électronique. Cette analyse est venue confirmer la nature épithéliale et épидидymaire des cellules. En fait, les résultats sont identiques dans les deux groupes. Ainsi, la population de cellules isolées comprend trois types cellulaires : des cellules principales, claires et apicales. Les différents types cellulaires ont pu être identifiés grâce aux structures et organelles présentes dans le cytoplasme des cellules et aux caractéristiques propres à chaque type cellulaire qui ont été conservées.

Les cellules principales, plus nombreuses que les autres, sont caractérisées par un grand nombre de corps de Golgi, un large noyau irrégulier, diverses vésicules et corps multivésiculaires ainsi que des mitochondries. Il y a aussi des invaginations de la membrane. De plus, il semble y avoir tendance vers la polarisation des cellules, puisque les organelles se localisent dans une portion restreinte du cytoplasme et il y a présence de quelques microvilli ou stéréocils (Fig. 8, 9). De plus, certaines cellules adjacentes sont reliées par des jonctions, possiblement des jonctions serrées (Fig. 10). Des cellules caractérisées par un cytoplasme comprenant un nombre élevé de larges vacuoles ont aussi été observées. Ces cellules s'apparentent largement aux cellules claires de l'épithélium épидидymaire. Ainsi, ces cellules présentent deux compartiments cytoplasmiques : la portion supranucléaire contient les larges vacuoles et de nombreux corps multivésiculaires qui sont entourés de plusieurs mitochondries et la région périnucléaire basale contient divers corps sphériques de taille et de densité différentes. En comparaison aux cellules principales, ces cellules ont un appareil de Golgi très petit. Une fois de plus,

l'organisation des organelles laisse croire à une tendance vers la polarisation (Fig. 11). Le troisième type cellulaire, bien que de nature épithéliale, est plus difficile à identifier. Les cellules sont plutôt rondes et ont un petit noyau sphérique. Leur cytoplasme est rempli d'organelles diverses : vésicules en C, lysosomes, grandes et petites vacuoles, corps multivésiculaires, quelques mitochondries et un réticulum ou golgi très développé (Fig. 12). Plusieurs de ces caractéristiques apparente ces cellules aux cellules apicales : noyau rond et nombreuses vésicules ainsi que la présence de lysosomes et d'endosomes. Toutefois, les nombreuses vésicules en C sont plutôt typiques des cellules étroites.

DISCUSSION

Les interactions cellulaires dans l'épididyme sont nombreuses et leur régulation est complexe. Jusqu'à ce jour, leurs rôles dans l'épididyme et leur implication dans la maturation des gamètes sont mal connus (Cyr *et al.*, 2000). Un fait limitant dans l'étude de ces fonctions est le manque d'outils. La présente étude avait donc pour objectif principal la création d'une lignée cellulaire de l'épididyme afin de pouvoir compléter l'étude de la régulation des jonctions par les hormones thyroïdiennes dans l'épididyme. Les lignées cellulaires sont des outils largement utilisés dans l'étude de divers autres tissus et organes.

Les premiers pas vers la création de cette lignée furent la mise au point de cultures primaires de cellules principales. Plusieurs études ont déjà été publiées à ce sujet. Les techniques d'isolation des cellules de même que les conditions de mise en culture varient largement. Cependant, il semblerait que peu importe la méthode choisie, les cellules principales de l'épithélium épididymaire soient prédominantes (Kierszenbaum *et al.*, 1981 ; Finaz *et al.*, 1991; Carbalada et Sailing, 1997 ; Kirchhoff *et al.*, 2000). Nous avons donc choisi de préconiser une méthode simple et ne nécessitant pas l'achat d'équipements coûteux et de simplifier au maximum la méthode de culture. Ainsi donc, nous avons utilisé des digestions enzymatiques et mis en culture des fragments d'épithélium, ou agrégats de cellules au lieu de cellules isolées (Kirchhoff *et al.*, 2000). Ces agrégats

adhèrent à la plaque, puis après quelques jours en culture, des cellules migrent et s'étalent autour de cet amas de cellules et quelques-unes se en divisent. Selon Byers *et al.*, (1985) cette méthode de culture limite grandement la dédifférenciation des cellules, phénomène très fréquent lors de la mise en culture de cellules isolées. Le milieu de culture utilisé a été optimisé afin de favoriser la croissance des cellules épithéliales versus celle des fibroblastes (utilisation d'hydrocortisone et du facteur de croissance épidermale (EGF)) (Kirchhoff *et al.*, 2000). La méthode préconisée permet donc, selon les résultats obtenus avec le marquage en immunofluorescence de la cytokératine dans les cellules, d'obtenir une population composée à 85-90 % de cellules de nature épithéliale, ce qui est similaire aux résultats obtenus par Kirchhoff *et al.* (2000).

Dans l'optique de poursuivre l'étude sur la régulation des jonctions dans l'épididyme, nous nous devons d'optimiser les conditions de culture afin de permettre la formation de celles-ci entre les cellules. La seule démonstration de la formation d'une monocouche polarisée de cellules principales de l'épididyme et la formation de jonctions a été réalisée dans des cultures utilisant des supports semi-perméables recouvert d'une matrice (Byers *et al.*, 1992). Malgré tout, nos premières cellules furent mises en culture à même les puits dans des plaques de plastique et le marquage en immunofluorescence de la protéine de jonction E-Cad fut positif, bordant le contour des cellules adjacentes. La présence de E-Cad suggère de la formation d'une monocouche polarisée (Byers *et al.*, 1992). De plus, la présence de cette protéine est nécessaire à la formation des autres types de jonctions (Gumbiner *et al.*, 1988). Fort de ce résultat, nous avons aussi marqué les protéines transmembranaires intégrales de jonctions serrées occludine et Cl-1, appuyant la notion de polarisation. En ce qui concerne la protéine de jonction gap Cx43, seule reconnue comme étant présente dans l'épididyme au moment de l'étude, le marquage fut négatif, ce qui est tout à fait justifiable si l'on considère le fait que cette protéine se localise entre les cellules principales et basales (Cyr *et al.*, 1996), alors que notre culture se compose majoritairement de cellules principales. Ainsi, les cultures primaires de cellules épидидymaires réalisées ne nécessitent pas obligatoirement l'utilisation d'un support semi-perméable ou d'une matrice pour permettre l'établissement des jonctions et la formation d'une monocouche de cellules, possiblement polarisée.

L'étape suivante fut la sélection d'une méthode d'immortalisation des cellules. Depuis quelques années déjà, l'utilisation de l'antigène grand-T du virus simien 40 (SV40) est une pratique courante pour immortaliser divers types de cellules épithéliales. La précipitation au phosphate de calcium est une méthode simple et non coûteuse d'incorporer de l'ADN étranger dans une cellule. De plus, ce fut la méthode utilisée par Coleman et Harris (1991) pour mettre au point leur lignée cellulaire de tissus épидидymaire fœtaux. Les essais de transfections avec RSV-luc ont démontré la possibilité de transférer les cellules épидидymaires par cette méthode, malgré une différence appréciable entre les résultats obtenus avec les cellules épидидymaires et ceux de la lignée cellulaire CV-1. La méthode par lipofectamine a aussi été testée, mais les résultats obtenus avec les cellules épидидymaires furent très similaires à ceux obtenus par précipitation au phosphate de calcium. Ainsi donc, il est possible que les résultats obtenus avec nos cellules soient optimaux. L'antigène grand-T fut incorporé aux cellules par transfection par précipitation au phosphate de calcium. Le plasmide contenant l'antigène a déjà été utilisé pour immortaliser des oligodendrocytes de nerf optique par infection rétrovirale (Almazan et McKay, 1992). Cependant, comme la méthode d'incorporation de l'ADN ne dépend pas du type cellulaire, mais plutôt des cellules à immortaliser, cela ne devait pas en principe influencer nos résultats.

Le plasmide de l'antigène grand-T utilisé contient aussi une résistance pour la néomycine (Almazan et McKay, 1992). C'est à l'aide de cette résistance que les cellules ayant incorporé le plasmide et exprimant l'antigène grand-T ont pu être sélectionnées. Le nombre de cellules ayant survécu aux deux semaines de sélection dans le G418 fut plutôt faible. Cependant, cela n'est pas surprenant, puisque l'efficacité des transfections, peu importe la méthode utilisée, est rarement supérieure à 10% (Chen et Okayama, 1987). De plus, dans le processus d'immortalisation, un nombre très important de cellules meurent durant la période de crise qui précède l'immortalisation et très peu de cellules deviennent immortelles (Wadhwa, Kaul et Mitsui, 1999). Un seul clone a été obtenu.

La première étape de la caractérisation de ce clone fut, comme pour les cultures primaires, le marquage de la cytokératine, une protéine des filaments intermédiaires des cellules de nature épithéliale. Cette procédure est fréquente lors de l'évaluation du type

cellulaire et a été utilisée à plusieurs reprises dans l'identification des cellules épидидymaires (Finaz et al., 1991 ; Chen et al., 1998 ; Kirchhoff et al., 2000). Cependant, l'absence de marquage dans les cellules fut assez décevant. Nous avons même cru avoir immortaliser le type cellulaire en minorité dans nos cultures, potentiellement des fibroblastes (Olson et al., 1983), puisque ceux-ci n'expriment pas la cytokératine (Olson et al., 1983 ; Chen et al., 1998). Toutefois, deux éléments suggèrent la faible possibilité d'immortaliser la mauvais type cellulaire : nombre réduit de fibroblastes (environ 5%) et aussi plus grande facilité à transfecter et immortaliser les cellules épithéliales comparativement aux fibroblastes (Bryan et Redell, 1994). Cependant, une autre possibilité pouvant expliquer ces résultats aurait pu être la dédifférenciation rapide des cellules épидидymaires.

Nous avons tout de même procédé à la vérification de certains marqueurs épидидymaires. Le premier fut CRISP-1, une protéine sécrétée par l'épithélium épидидymaire et régulée par les androgènes (Charest et al., 1989). Les résultats obtenus ont permis de démontrer la présence du messenger de cette protéine dans les cellules immortalisées, mais a un niveau quasi imperceptible. Cependant, l'exposition des cellules à la testostérone augmente considérablement les niveaux observés. Ici, les très faibles quantités observées dans les cellules non exposées à la testostérone peuvent s'expliquer par le fait que la protéine est surtout sécrétée au niveau distal de la tête et dans le corps de l'épididyme (Kirchhoff, 1999), alors que les cellules mises en culture proviennent du segment initial et de la tête de l'organe. La suite de nos expériences nous a aussi permis d'amplifier un fragment avec les amorces pour les récepteurs à androgènes. Les niveaux de ceux-ci déjà relativement élevés dans les cellules sans testostérone, sont aussi augmentés par la présence de l'hormone. La différence entre les résultats obtenus pour CRISP-1 et ceux pour le récepteur à androgènes peut facilement s'expliquer par le fait que l'expression du récepteur est prédominante dans la tête de l'épididyme (Pujol et Bayard, 1979). Les fibroblastes n'exprimant pas ces deux marqueurs, cela est donc venu appuyer l'idée que malgré l'absence de cytokératine, les cellules isolées semble être épидидymaires. De plus, la présence d'un fragment lors de l'amplification de Cl-1 dans les cellules vient aussi confirmer cette hypothèse, puisque les fibroblastes ne font pas de jonctions serrées

(Giepmans et Moolenaar, 1998). Cependant, aucun fragment n'a pu être amplifié pour la protéine de jonction d'adhérence E-Cad, ce qui est surprenant. Cela permettrait peut-être d'expliquer la plus faible adhérence des cellules de la lignée comparativement aux cultures primaires.

Malgré tout, ces expériences n'étaient pas suffisantes pour prouver la nature épithéliale et épидидymaire des cellules. Quelques-unes de celles-ci furent donc analysées en microscopie électronique. Ainsi, comme semblait vouloir le démontrer la présence des différents marqueurs, nous sommes effectivement en présence de cellules épithéliales épидидymaires. Toutefois, la population n'est pas pure et est composée de trois types cellulaires distincts. Cette hétérogénéité est probablement due à la difficulté d'isoler complètement les différents clones ayant survécu à la sélection. Malgré tout, cela ne rend pas la lignée totalement inutilisable, puisque les trois types cellulaires présents sont de nature épithéliale et d'origine épидидymaire. Ces cellules présentent diverses caractéristiques des cellules observées à partir de tissus et largement décrites à plusieurs reprises (Hamilton, 1975 ; Soranzo, Dadoune et Fain-Maurel, 1982 ; Robaire et Hermo, 1988 ; Amaldi et Hermo, 1996). La seule incertitude concerne la cellule apicale, qui présente aussi plusieurs caractéristiques de la cellule étroite, dont de nombreuses vésicules en C (Amaldi et Hermo, 1996). Les cellules apicales et étroites ont longtemps été confondues, parce qu'elles possèdent de nombreuses caractéristiques communes (Robaire et Hermo, 1988 ; Amaldi et Hermo, 1996), ce qui explique l'ambiguïté. Les cellules isolées ne possèdent pas leur forme caractéristique, ce qui s'explique par le fait que les cellules ont été trypsinisées. De plus, la distribution des organelles suggère fortement une tendance vers la polarisation. Aussi, des jonctions ont été observées à quelques reprises entre les cellules principales, malgré le fait que ces cellules aient été trypsinisées avant la fixation. Cela suggère donc un nombre important de contact entre les cellules.

Ainsi donc, nous avons bel et bien immortalisé des cellules épидидymaires. Toutefois, contrairement à toutes nos attentes, ces cellules ont un taux de croissance extrêmement faible, ce qui limite grandement leur utilisation. Cela est contraire à ce qui est généralement observé dans les lignées cellulaires, mais est par contre totalement

typique des cellules épидидymaires, qui ont un taux de division extrêmement lent et un index mitotique très faible (Olson *et al.*, 1983), l'épididyme n'étant pas un tissu en régénération (Robaire et Hermo, 1988). Ce phénomène a aussi été observé à plusieurs reprises dans des cultures primaires. Dans ces cultures, les cellules ne sont pas en prolifération. Les cellules principales de l'épididyme sont des cellules hautement différenciées et ce type de cellule se divise rarement (Klinefelter, Amann et Hammerstedt, 1982 ; Olson *et al.*, 1983)

Pendant la réalisation de cette lignée, l'équipe d'Araki *et al.*(2001) ont aussi réussi à immortaliser des cellules épидидymaires en utilisant des souris transgéniques exprimant l'antigène grand-T. Selon des résultats primaires, certaines de leurs cellules expriment faiblement la cytokératine, mais d'autres sont aussi négatives. Cela permet peut-être d'expliquer en partie la non-expression de la cytokératine dans nos cellules. En fait, il est possible qu'au départ les cellules expriment la protéine, puis que par la suite cette expression diminue jusqu'à disparaître et qu'à ce moment une source de collagène, de fibronectine ou une matrice semi-perméable soit nécessaire à l'expression de celle-ci ou de E-Cad (Byers et al., 1992). Ainsi, nos cellules ayant dû être en culture pour une longue période de temps avant d'en obtenir suffisamment pour le marquage, il est possible que nos cellules soient maintenant à un stade où elles n'expriment plus la protéine. Toutefois, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer le pourquoi de cette perte. De plus, le taux de croissance des cellules de la lignée formée par l'autre groupe est aussi relativement faible. Encore une fois, cela ne déroge pas de la caractéristique des cellules épидидymaires, même si le processus d'immortalisation agit en général sur des suppresseurs de tumeurs permettant alors la croissance incontrôlée des cellules (Bryan et Redell, 1994). Le mécanisme d'immortalisation dans l'épididyme n'est pas connu. De plus, cet organe est l'un des seuls où aucun cancer n'a encore pu être détecté. Ainsi, le mécanisme d'immortalisation dans l'épididyme est peut-être différent, ce qui pourrait expliquer la faible croissance des cellules. L'incorporation de d'autres composés serait peut-être nécessaire à la réalisation d'une lignée cellulaire ou encore l'utilisation d'une matrice de fibronectine ou de collagène.

Ainsi donc, des cellules épидидymaires ont été immortalisées par transfection par la méthode de précipitation au phosphate de calcium avec l'antigène grand-T du virus simien 40. Ces cellules ont pu être conservées pour une longue période et être congelées. De plus, elles expriment certains marqueurs épидидymaires et l'observation en microscopie électronique a permis de vérifier la nature épидидymaire des cellules, malgré l'absence de cytokératine. Certes, il nous faudra optimiser les conditions pour permettre une meilleure croissance des cellules. Malgré tout, cette lignée représente un atout non négligeable pour l'étude de l'épididyme.

RÉFÉRENCES

- ALMAZAN, G. et R. McKay. 1992. "An oligodendrocyte precursor cell line from rat optic nerve". Brain Research, vol. 579, p. 234-245.
- AMALDI H.I. et L. Hermo. 1996. "Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis". Journal of Andrology, vol. 17, p. 208-222.
- ARAKI Y., K. Suzuki, R.J. Matusik, M. Obinata et M.-C. Orgebin-Crist. 2001. "Immortalized epididymal cell lines from transgenic mice harboring temperature-sensitive SV40 large T antigen gene". VIIth International Congress of Andrology, p. 195
- BEDFORD, J. M. 1975. "Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis". In R. O. Greep et E. B. Astwood (éd.). Handbook of Physiology, Section 7, Volume 5. Washington, DC : American Physiology Society, p. 303-317.
- BRYAN T.M. et R. Reddel. 1994. "SV40-induced immortalization of human cells". Critical Reviews in Oncogenesis, vol. 5, p. 331-357.
- BYERS, S. W., D. Djakiew et M. Dym. 1985. "Structural features of rat epididymal epithelial cells in vitro". Journal of Reproduction and Fertility, vol. 75, p. 401-411.
- BYERS S.W., S. Citi, J.M. Anderson et B. Hoxter. 1992. "Polarized functions and permeability properties of rat epididymal epithelial cells *in vitro*". Journal of Reproduction and Fertility, vol. 95, p. 385-396.
- CHAREST N.J., P. Petrusz, P. Ordronneau, D.R. Joseph, E.M. Wilson et F.S. French. 1989. "Developmental expression of an androgen-regulated epididymal protein". Endocrinology, vol. 125, p. 942-947.

CHEN C. et H. Okayama. 1987. "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA". Molecular and Cellular Biology, vol. 7, p. 2745-2752.

CHEN, Y. C., D. Bunick, J. M. Bahr, G. R. Klinefelter et R. A. Hess. 1998. "Isolation and culture of epithelial cells from rat ductuli efferentes and initial segment epididymidis". Tissue & Cell, vol. 30, no. 1, p. 1-13.

COLEMAN, L. et A. Harris. 1991. "Immortalization of male genital duct epithelium : an assay system for the cystic fibrosis gene". Journal of Cell Science, vol. 98, p. 85-89.

CYR, D.G., L. Hermo et D.W. Laird. 1996. "Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis". Endocrinology, vol. 137, p. 1474-1484.

CYR, D. G., K. W. Finnon, J. Dufresne et M. Gregory. 2002. "Cellular interactions and the blood-epididymal barrier". In B. Robaire et B. Hinton (éd.). *The epididymis : from molecules to clinical practice*. Plenum Press, p. 103-118.

DENBESTEN, P. K., C. Gao, W. Li, C. H. E. Mathews et D. C. Gruenert. 1999. "Development and characterization of an SV40 immortalized porcine ameloblast-like cell line". European Journal of Oral Sciences, vol. 107, p. 276-281.

FINAZ, C., F. Boué, G. Meduri et A. Lefèvre. 1991. "Characterization of rat epithelial epididymal cells purified on a discontinuous Percoll gradient". Journal of Reproduction and Fertility, vol. 91, p. 617-625.

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

GIEPMANS B.N.G. et W.H. Moolenaar. 1998. "The gap junction protein connexin 43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein". Current Biology, vol. 8, p. 931-934.

HAMILTON, D.W. 1975. "Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymis, and ductus deferens in the rat". In R. O. Greep et E. B. Astwood (éd.). Handbook of Physiology, Section 7, Volume 5. Washington, DC : American Physiology Society, p. 259-301.

HINTON, B.T. 1985. "The blood-epididymal barrier". In. T. J. Lobl et E. S. E. Hafez (éd.). Male fertility and its regulation. Boston : MTP Press Ltd., p. 371-382.

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

JOSHI M.S. 1985. "Isolation and cell culture of the epithelial cells of cauda epididymis of the bull". Biology of Reproduction, vol. 33, p. 187-200.

KIERSZENBAUM, A. L., O. Lea, P. Petrusz, F. S. French et L. L. Tres. 1981. "Isolation, culture, and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 78, p. 1675-1679.

KIRCHHOFF C. 1999. "Gene expression in the epididymis". International Reivew of Cytology, vol. 188, p. 133-202.

KIRCHHOFF, C., R. Carballada, B. Harms et I. Kascheike. 2000. "CD52 mRNA is modulated by androgens and temperature in epididymal cell cultures". Molecular Reproduction and Development, vol. 56, p. 26-33.

KLINEFELTER G.R., R.P. Amann et R.H. Hammerstedt. 1982. "Culture of principal cells from the rat caput epididymis". Biology of Reproduction, vol. 26, p. 885-901.

LEWIN B. 1999. "Oncogènes et Cancer". Chap. In Gènes VI. Traduit de l'anglais par C. Sanlaville, p. 1131-1172. Paris : De Boek Université.

OBINATA M. 1997. "Conditionally immortalized cell lines with differentiated functions established from temperature-sensitive T-antigen transgenic mice". Genes to Cell, vol. 2, p. 235-244.

OLSON G.E., J. Jonas-Davies, L.H. Hoffman et M.-C. Orgebin-Crist. 1983. "Structural features of cultured epithelial cells from the adult rat epididymis". Journal of Andrology, vol. 4, p. 347-360.

ORGBIN-CRIST, M.-C., B. J. Danzo et J. Davies. 1975. "Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis". In R. O. Greep et E. B. Astwood (éd.). Handbook of Physiology, Section 7, Volume 5. Washington, DC : American Physiological Society, p. 319-338.

PERA, I., R. Ivell et C. Kirchhoff. 1996. "Body temperature (37 C) specifically down-regulates the messenger ribonucleic acid for the major sperm surface antigen CD52 in epididymal cell culture". Endocrinology, vol. 137, p. 4451-4459.

PUJOL A. et F. Bayard. 1979. "Androgen receptors in the rat epididymis and their hormonal control". Journal of Reproduction and Fertility, vol. 56, p. 217-222.

ROBAIRE B. et L. Hermo. 1988. "Efferent ducts, epididymis, and vas deferens : structure, functions, and their regulation". In E. Knobil et J. Neill (éd.). *The physiology of Reproduction*. New York : Raven Press Ltd., p. 999-1080.

SINGH R., S. Pervin, J. Shryne, R. Gorski et G. Chaudhuri. 2000. "Castration increases and androgens decrease nitric oxide synthase activity in the brain : Physiologic implications". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 97, p. 3672-3677.

SORANZO L., J.-P. Dadoune et M.-A. Fain-Maurel. 1982. "La segmentation du canal épидидymaire chez la souris : etude ultrastructurale". *Reproduction, Nutrition et Développement*, vol. 22, p. 999-1012.

SWISSHELM K. 1999. "Concepts of immortalization in human mammary epithelial cells". *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, vol. 24, p. 155-172.

WADHAWA R., S.C. Kaul et Y. Mitsui. 1999. "Cellular mortality and immortalization : a complex interplay of multiple gene functions". In A. Macieira-Coelho (éd). *Progress in molecular and subcellular biology*. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, p. 191-204.

WAGLEY L.M., T.D. Versluis, D.V. Brown et R.P. Amann. 1984. "Culture of principal cells from the ram epididymis". *Journal of Andrology*, vol. 5, p. 389-408.

LÉGENDE DES FIGURES

Figure 1. Schéma représentant la construction du plasmide contenant l'antigène grand-T et la résistance pour le G-418 utilisé pour l'immortalisation des cellules épидидymaires.

Figure 2. Photomicrographies en microscopie lumière des cultures primaires de cellules du segment initial et de la tête de l'épididyme. n, noyau. Le contour d'une cellule à été tracé en noir. Magnification : X.400.

Figure 3. Marquage en immunofluorescence de la cytokératine dans les cultures primaires de cellules du segment initial et de la tête de l'épididyme. La cytokératine est marquée en vert (c) alors que les noyaux, colorés à l'iodure de propidium sont en rouge (n). Certaines cellules de natures épithéliales sont aussi présentes. Leur noyau (n*) sont aussi colorés en rouge. c = cytokératine, n = noyau de cellules épithéliales, n* = noyau de cellules non-épithéliales. Magnification : X400.

Figure 4. Marquage en immunofluorescence des protéines de jonctions E-Cad (a), occludine (b) et Cl-1 (c) de cellules épидидymaires en culture primaire. Les protéines de jonctions sont marquées en vert (flèches) alors que les noyaux, colorés à l'iodure de propidium sont en rouge. Il n'y a aucun marquage dans les sections contrôles incubées avec du FBS, outre les noyaux (d). n = noyau. Magnification : X400.

Figure 5. Graphique comparant l'efficacité des transfections par la méthode par précipitation au phosphate de calcium dans les cellules CV-1 et les cellules épидидymaires (c-ep). RLU = Relative lights units.

Figure 6. Graphique comparant l'efficacité de transfection des cellules épидидymaires selon deux méthodes : précipitation au phosphate de calcium et lipofectamine. RLU = Relative lights units.

Figure 7. Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR de CRISP-1 et du récepteur à androgènes, ainsi que la protéine de jonction claudine-1 dans les cellules de la lignée cellulaire cultivées dans du milieu sans testostérone ou avec 10 ng/ml testostérone (*). MM- échelle de poids moléculaires, CR- CRISP-1, AR- Récepteur à androgènes, Cl- Claudine-1, H₂O- contrôle H₂O.

Figure 8. Microphotographies en microscopie électronique des cellules principales de la lignée cellulaire immortalisée avec l'antigène grand-T. Les cellules principales sont caractérisées par un nombre important de corps de Golgi et un large noyau irrégulier. g = corps de Golgi ; m = mitochondries ; mp = membrane plasmique ; mvb = corps multivésiculaires ; n= noyau. Magnification : X 9000.

Figure 9. Microphotographies en microscopie électronique des cellules principales de la lignée cellulaire immortalisée avec l'antigène grand-T. Les cellules principales sont caractérisées par un gros noyau irrégulier et plusieurs corps de Golgi. g = corps de Golgi ; m = mitochondries ; mp = membrane plasmique ; mvb = corps multivésiculaires ; n= noyau. Magnification : X 9000.

Figure 10. Microphotographies en microscopie électronique des cellules principales de la lignée cellulaire immortalisée avec l'antigène grand-T formant des jonctions serrées. m = mitochondries ; n= noyau. Les cercles noirs indiquent la présence de jonctions. Magnification : X 7000.

Figure 11. Microphotographies en microscopie électronique des cellules claires de la lignée cellulaire immortalisée avec l'antigène grand-T. Les cellules claires sont caractérisées par de larges vacuoles. m = mitochondries ; mvb = corps multivésiculaires ; n= noyau ; v = vésicules ;. Magnification : X 7000.

Figure 12. Microphotographies en microscopie électronique des cellules apicales de la lignée cellulaire immortalisée avec l'antigène grand-T. Les cellules apicales sont caractérisées par un grand nombre de vésicules en C (cercles noirs). g = corps de Golgi ; l = lysosomes ; m = mitochondries ; mvb = corps multivésiculaires ; n= noyau ; v = vésicules ; M = microvillis ou stéréocils. Magnification : X 9000.

TABLEAU 1

**Amorces et conditions d'amplification par RT-PCR de Claudine-1,
Crisp-1, E-Cadhérine et du récepteur à androgènes**

Transcrit	Amorces		Prédiction de la taille du produit (pb)	Conditions d'amplification par PCR	Référence
Claudine-1	sense	5'- ACGCAGGAGCCTCGCCCCGC AGCTGCA-3'	893	30 cycles	Furuse <i>et al.</i> , 1998
				94°C pour 1min 30sec	
	antisense	5'CAGCCAAGGCCTGCATAGCC ATGG-3'		60°C pour 1min 30sec	
				72°C pour 1min 30sec	
CRISP-1	sense	5'- CTTATTATGAATGGCACAATG- 3'	600	30 cycles	
				94°C pour 1min	
	antisense	5'-TTATCCAGACAGCGATTTTA- 3'		57,5°C pour 1min	
				72°C pour 1min	
E-cadhérine	sense	5'- TGCCCCAGTATCGTCCCCGT-3'	230	30 cycles	Johnson <i>et al.</i> , 2000
				94°C pour 1min	
	antisense	5'- CGGTTGCCCATTCGTTTCAGAT AA-3'		55,6°C pour 1min	
				72°C pour 1min	
Récepteur à androgènes	sense	5'- GAGCGTGCGCGAAGCGATCCA GAA-3'	524	35 cycles	Singh <i>et al.</i> , 2000
				94°C pour 1min	
	antisense	5'- TGCTGCCTTCGGATATTACCTC CTGCT-3'		60°C pour 1min	
				72°C pour 1min 30sec	

Figure 1.

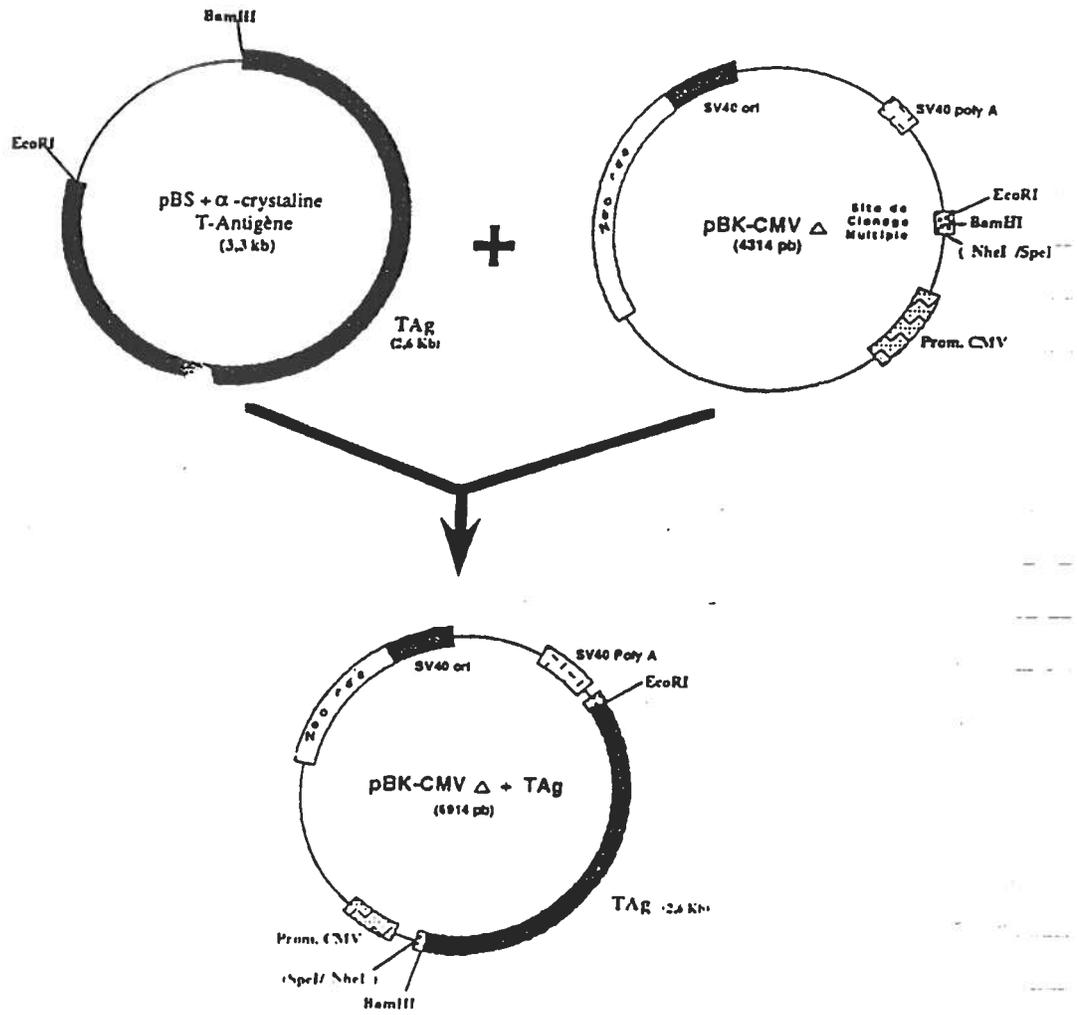


FIGURE 2.

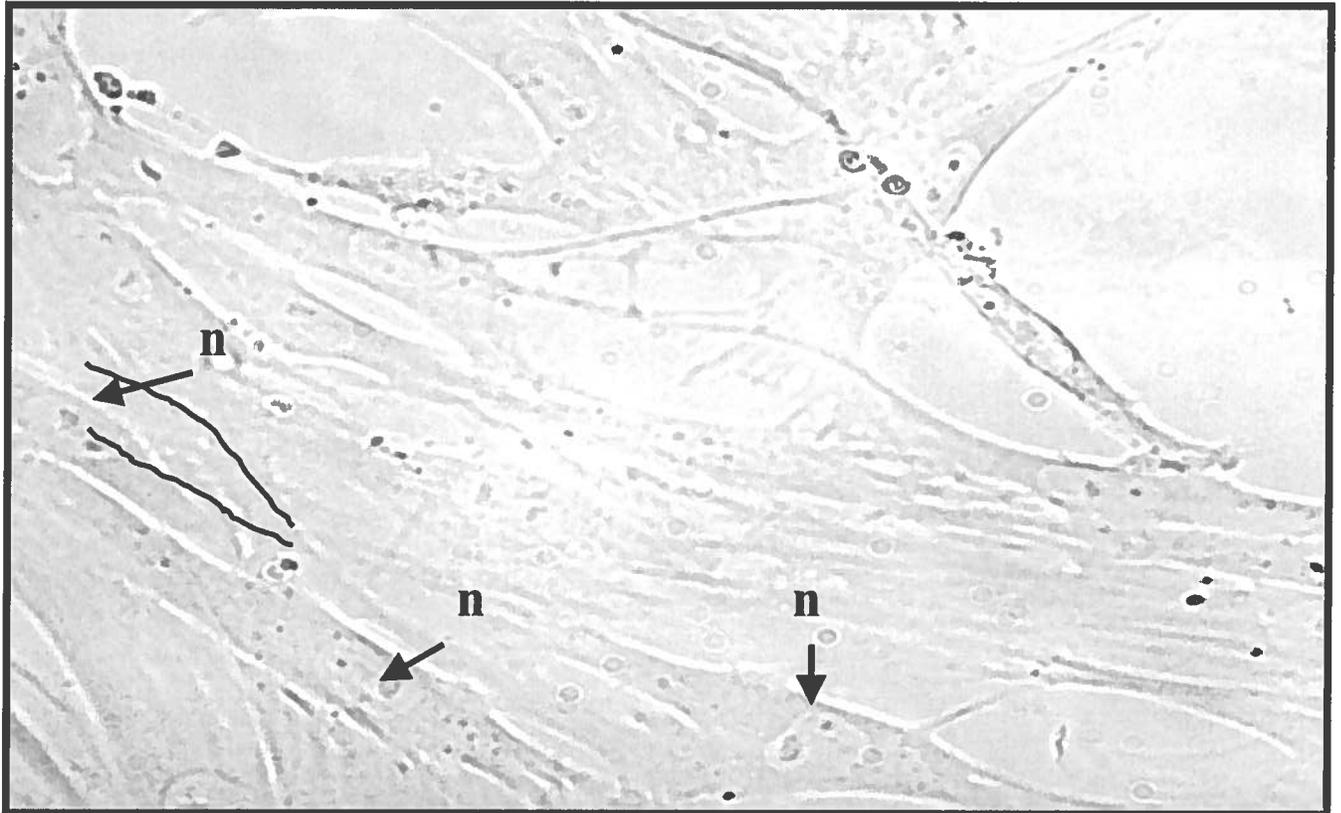


FIGURE 3.

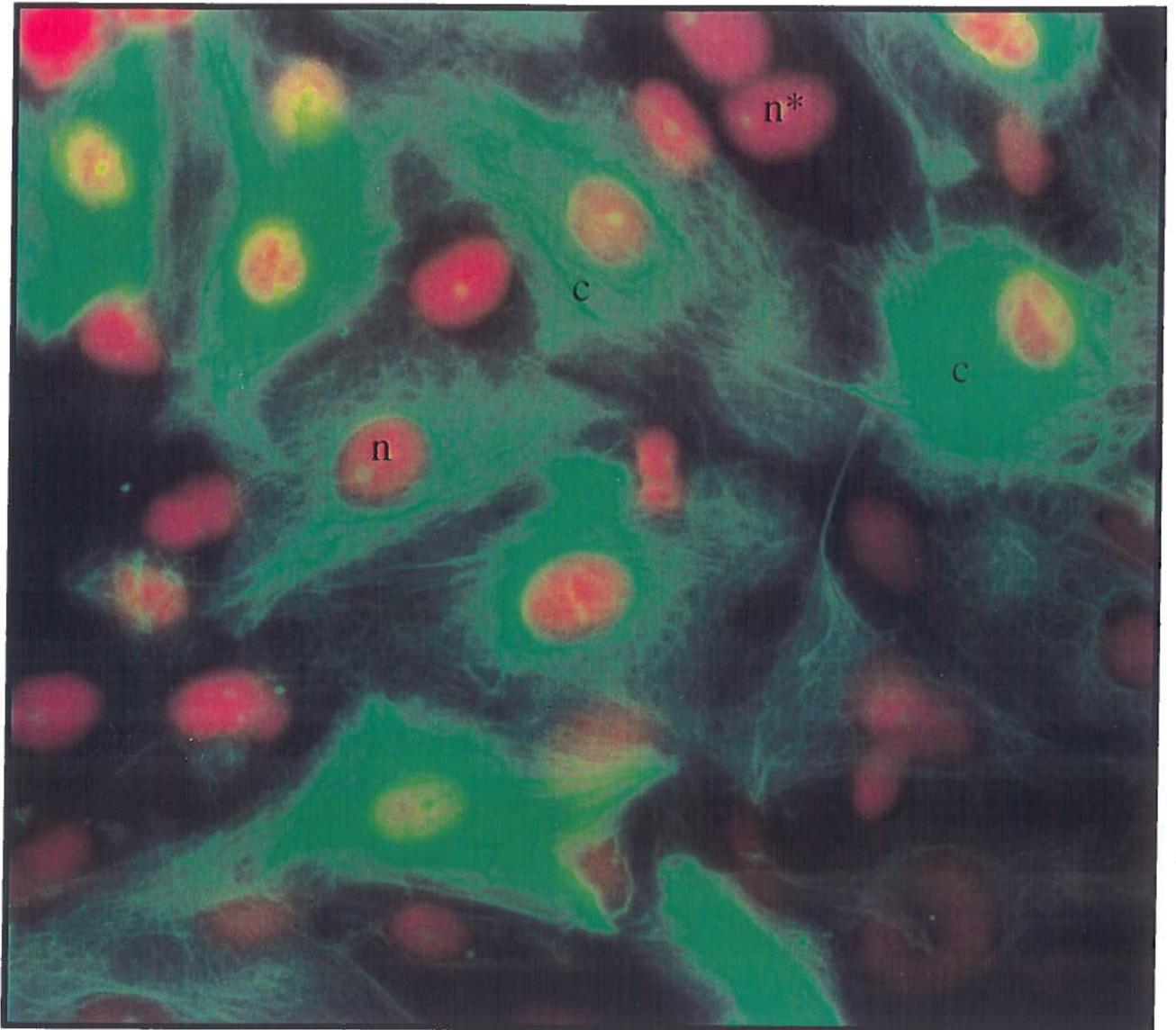


FIGURE 4.

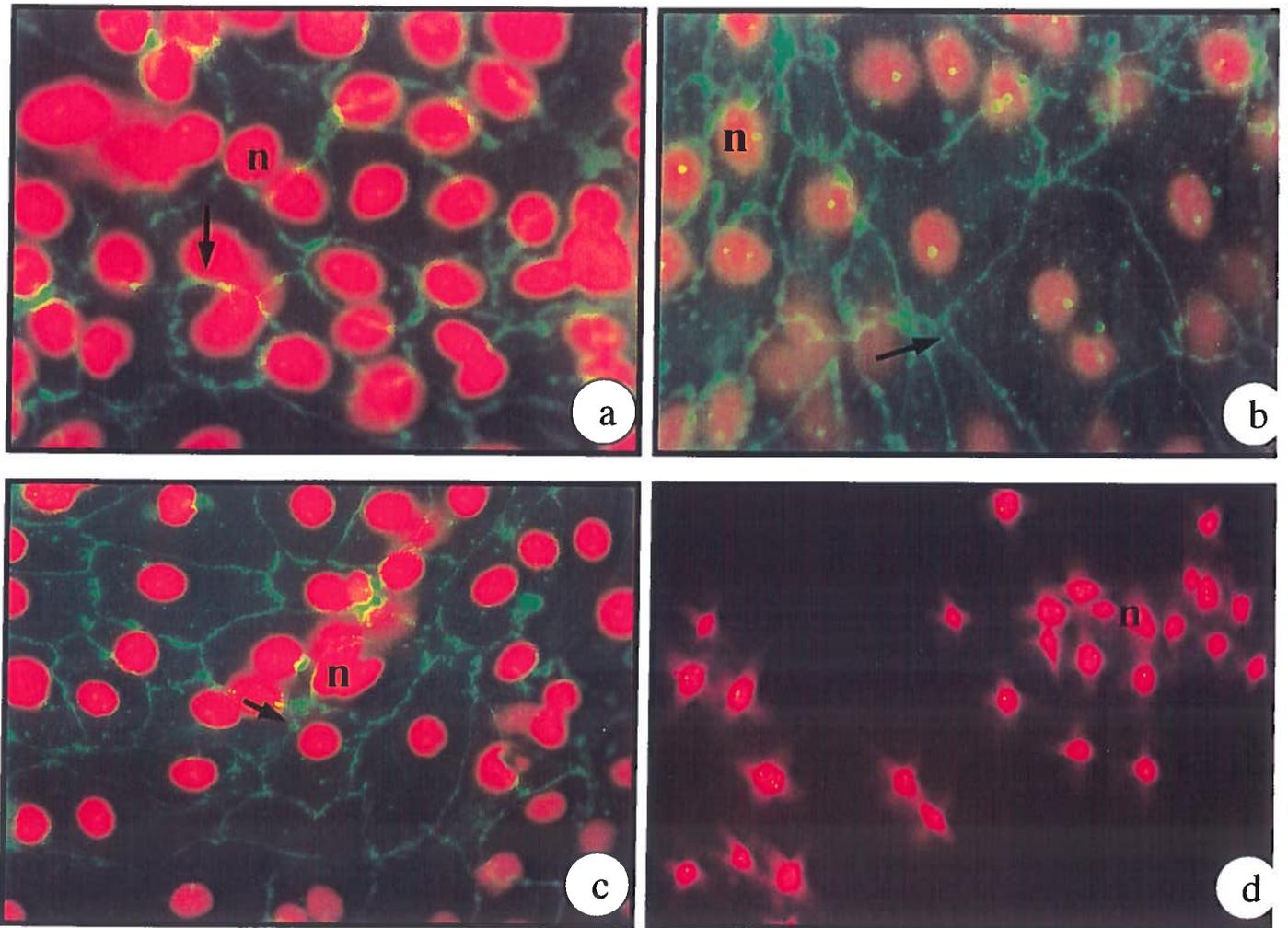


Figure 5

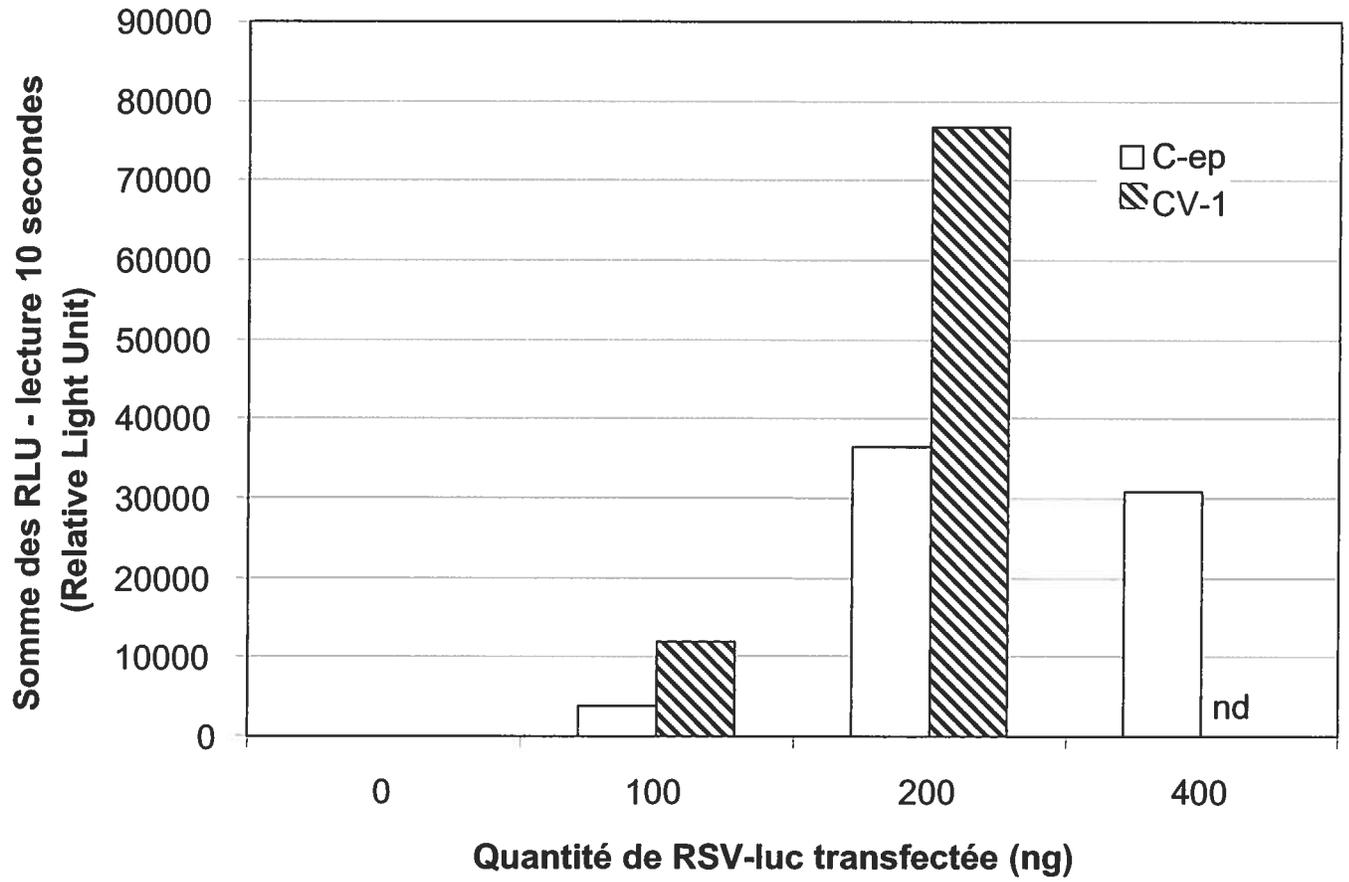


Figure 6

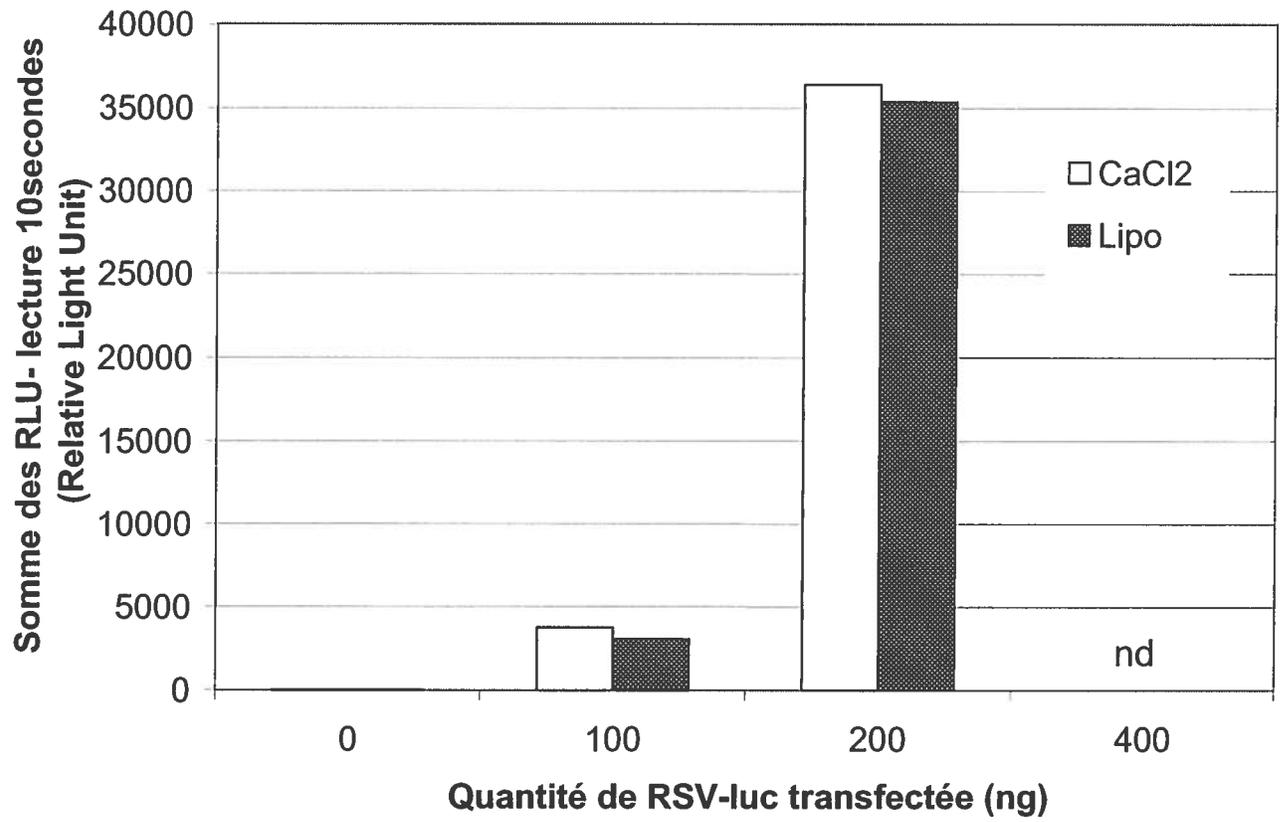


FIGURE 7.

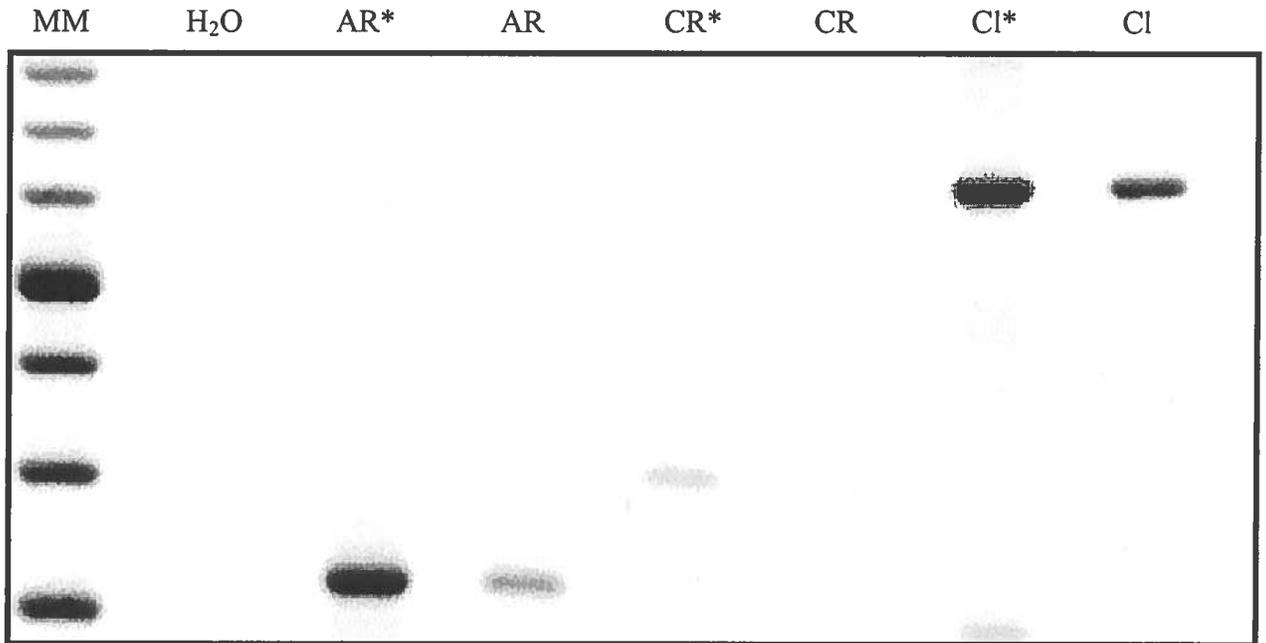


Figure 8

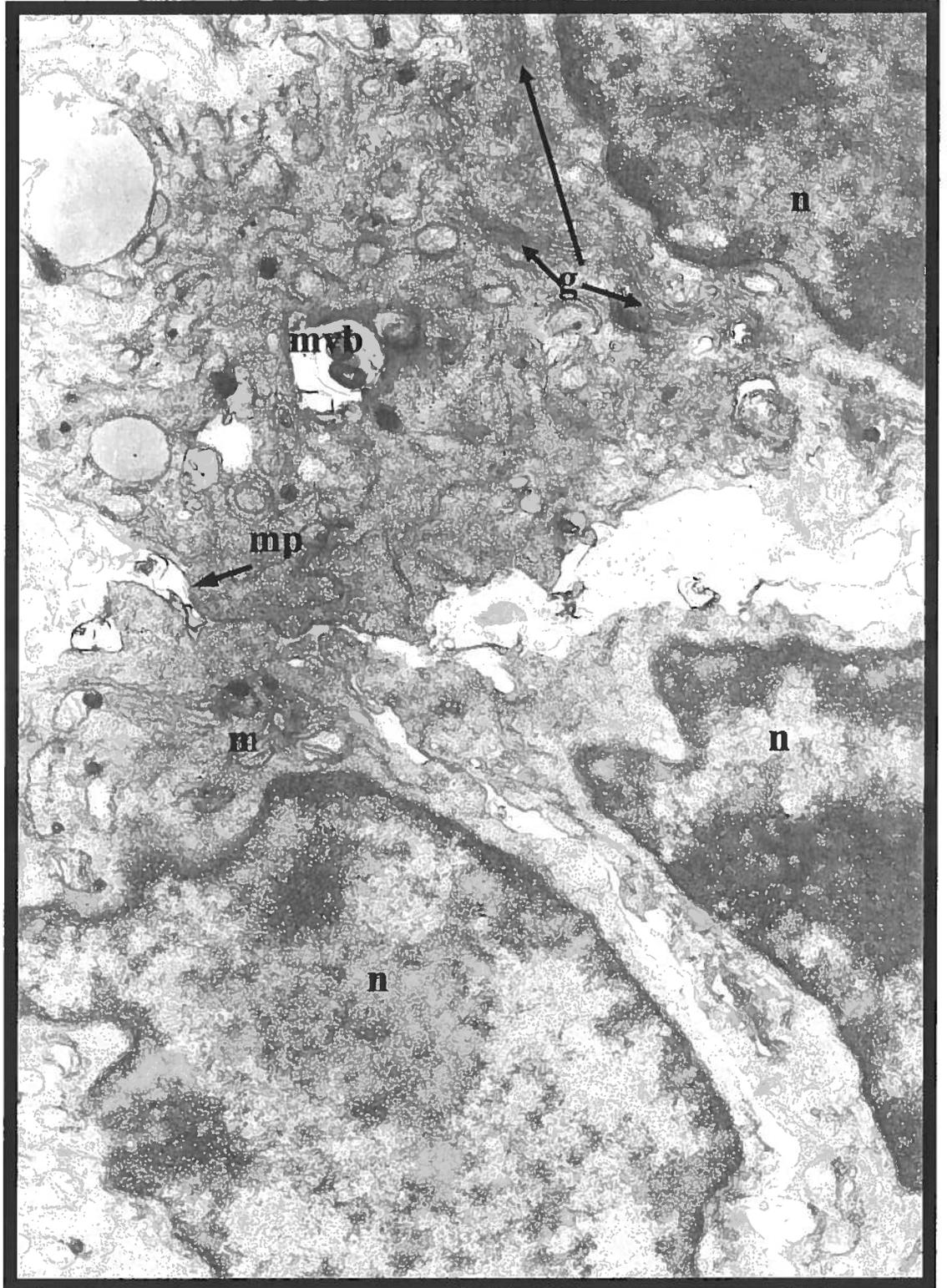


Figure 9

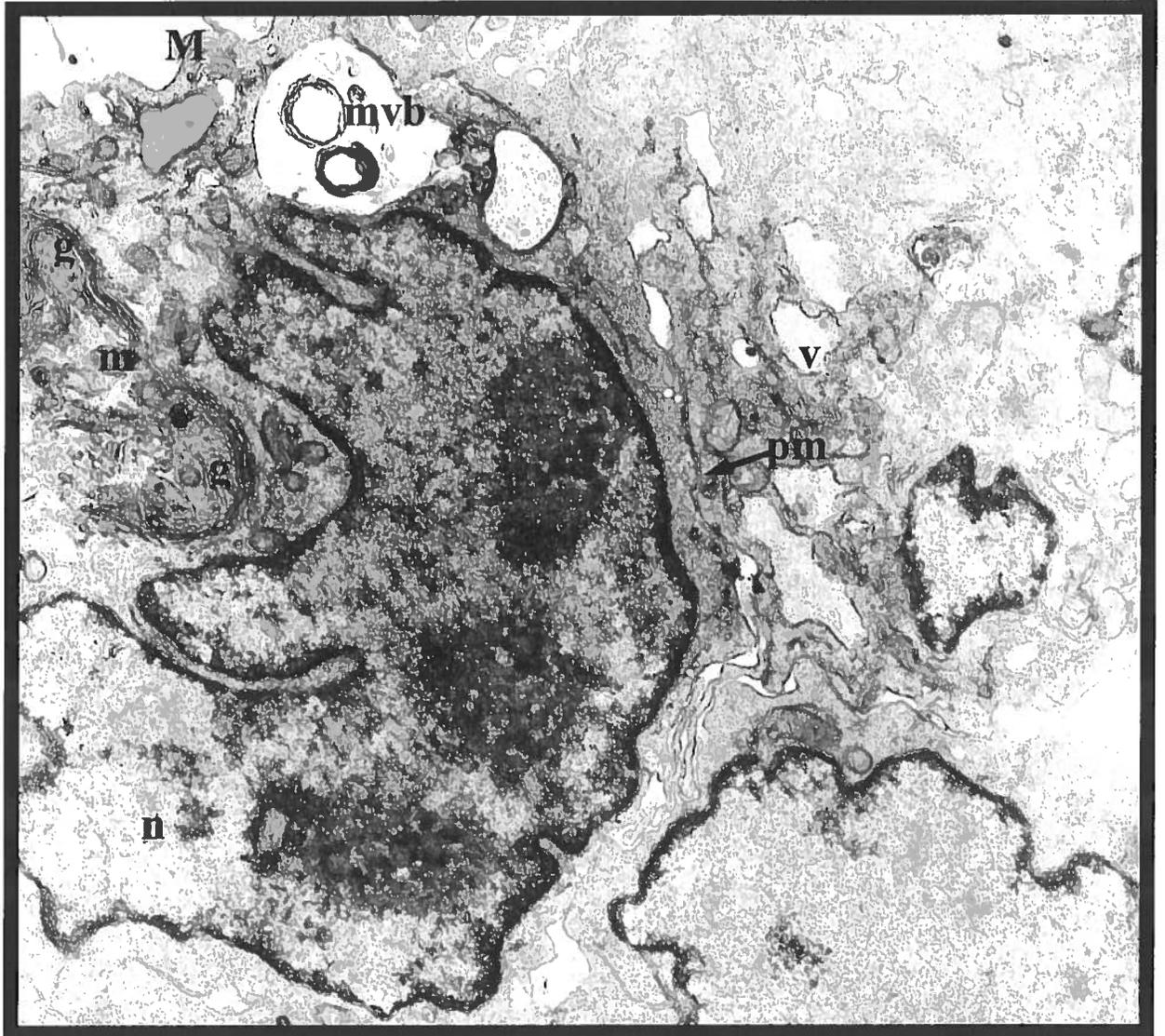


Figure 10

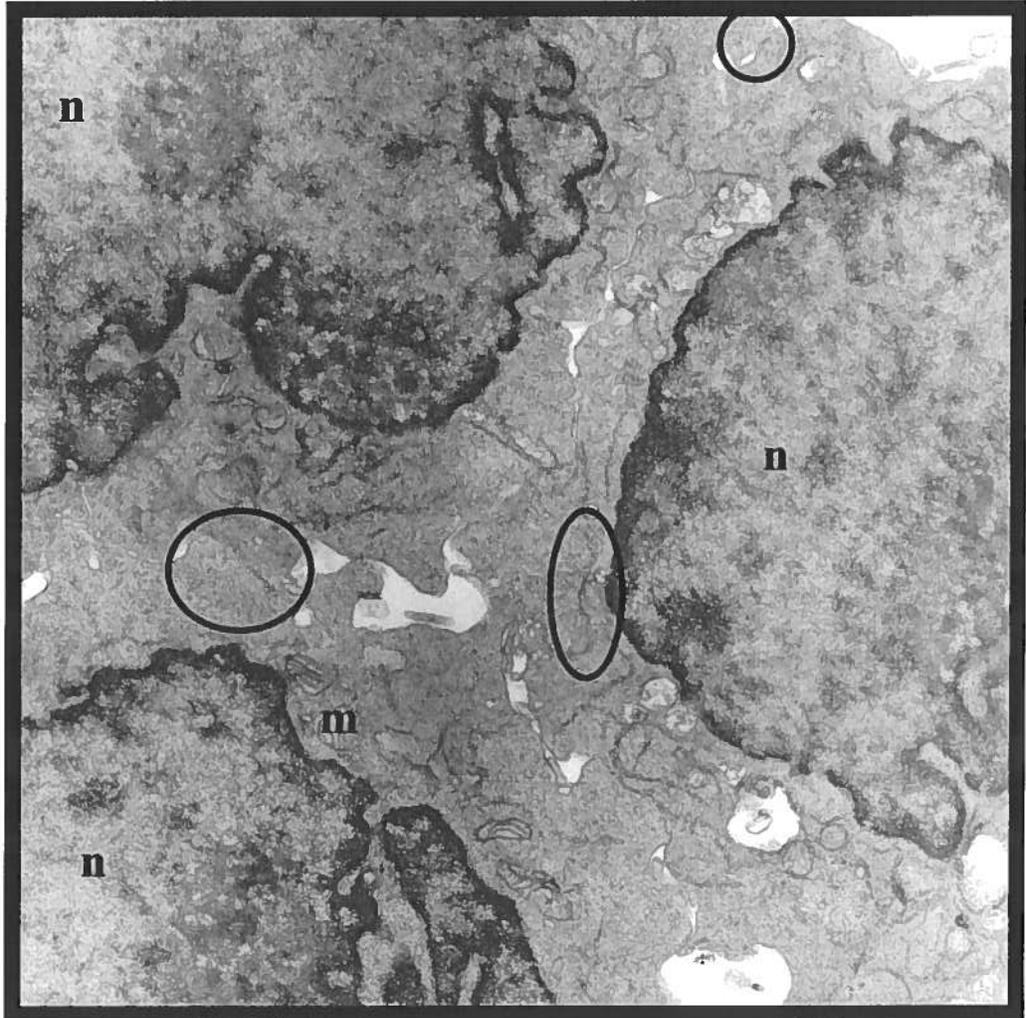


Figure 11

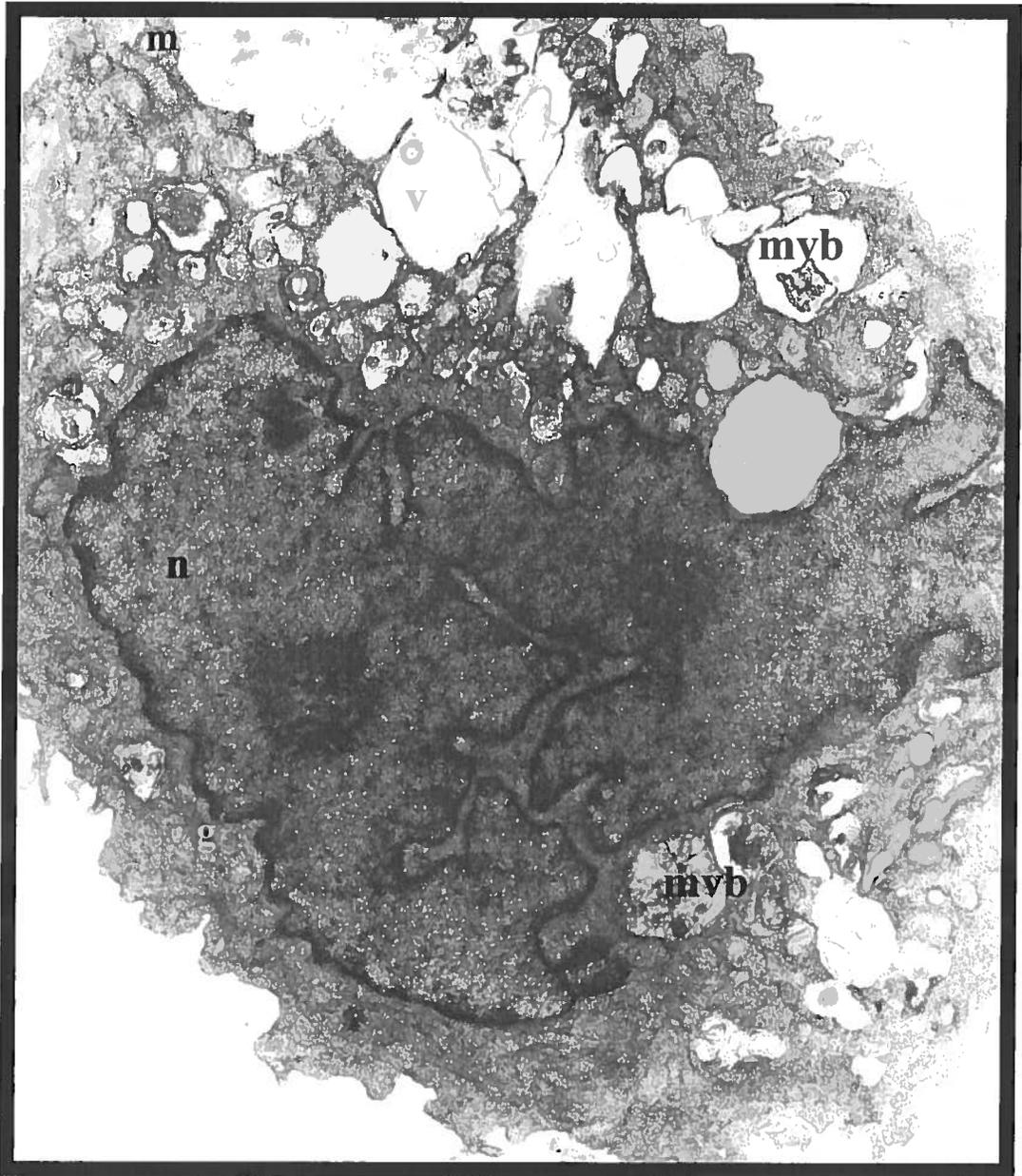


FIGURE 12



TROISIÈME SECTION : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Nous avons dans un premier temps démontré la régulation de la Cx43, composante de la jonction lacunaire, dans le testicule et l'épididyme par les hormones thyroïdiennes. Le modèle *in vivo* utilisé a permis de démontrer une régulation complexe de ces jonctions par les hormones sécrétées par la glande thyroïde. La présence de récepteurs pour ces hormones dans le testicule a été démontré à plusieurs reprises (Bruzzard *et al.*, 2000 ; Canale *et al.*, 2001). De plus, les effets d'un manque d'hormone sur la croissance testiculaire ont aussi largement été étudiés (Cooke et Meisami, 1991 ; Hardy *et al.*, 1993, 1996). Les données concernant l'épididyme sont quant à elles plus limitées. La présence de récepteur, fut soupçonnée suite à la démonstration de liaisons de haute affinité de la T₃ avec les noyaux épидидymaires (Del Rio *et al.*, 2000). Nous avons démontré pour la première fois la présence du récepteur TR α_1 et/ou TR β_1 dans l'épididyme de rat adulte et aussi chez les jeunes animaux par analyse Western. La taille de la bande obtenue dans l'épididyme diffère légèrement de celle observé pour le testicule, utilisé comme contrôle positif. Toutefois, cela ne remet pas en cause la présence du récepteur dans l'épididyme, puisque des récepteurs de différentes tailles ont déjà été décrits (Benbrook et Pfahl, 1987). Cette démonstration est importante puisqu'elle permet de supposer une action directe des hormones autant au niveau de l'épididyme que du testicule.

Nos expériences ont donc démontré qu'un hypothyroïdisme néonatal transitoire affecte la localisation de la protéine Cx43 dans le testicule de jeunes animaux et ce même quelques jours après la fin du traitement. Toutefois, la morphologie générale des tubules séminifères est aussi affectée, puisque leur lumière ne s'ouvre que beaucoup plus tard. Ainsi, il n'est pas faux de dire qu'un manque d'hormone thyroïdienne modifie la localisation de la Cx43. Toutefois certaines pistes laissent croire que cet impact n'est peut-être pas direct. L'ouverture des tubules séminifères dans le testicule est reliée à la présence des jonctions serrées. Quelques jonctions serrées ont déjà été identifiées dans le testicule. Parmi celles-ci, il y a l'occludine (Moiroi *et al.*, 1998 ; Cyr *et al.*, 1999), aussi reconnue pour colocaliser avec la Cx43 (Cyr *et al.*, 1999). Comme la formation des

jonctions est aussi régulée par les autres types de jonctions, cela constituait une bonne piste à explorer. Notre approche fut donc de marquer l'occludine dans le testicule. Le type de marquage obtenu diffère toutefois légèrement de ce qui a été démontré dans la littérature (Moiroi *et al.*, 1998 ; Cyr *et al.*, 1999). Cependant, lors du marquage, nous avons utilisé une méthode permettant une meilleure expression des antigènes, ce qui pourrait en partie expliquer le fait que le marquage obtenu soit ponctuel et non un patron de bandes discontinues. Malgré tout, la localisation étant la même chez les individus contrôles, cela nous a laissé croire à l'exactitude de nos résultats. Les résultats obtenus ont donc permis de démontrer que les hormones thyroïdiennes ont aussi un impact sur la localisation de l'occludine dans le testicule. Cela amène donc la possibilité d'une action des hormones thyroïdiennes sur la Cx43 par l'intermédiaire de l'occludine. Toutefois, une autre hypothèse est aussi plausible. L'organisation des jonctions dans le testicule des animaux traités est plutôt désorganisée et ressemble au patron retrouvé chez de plus jeunes animaux. De plus, les testicules des animaux traités sont plus petits que les animaux contrôles jusqu'au jour 30 et il a été démontré depuis qu'un hypothyroïdisme néonatal provoque un retardement dans la différenciation des cellules de Leydig (Hardy *et al.*, 1993) et de Sertoli (Hess *et al.*, 1993). Il est donc possible que la différence dans le marquage de la Cx43 soit le résultat d'un retard généralisé dans la maturation du testicule.

Les effets de l'hypothyroïdisme au niveau de la Cx43 dans l'épididyme sont différents de ceux obtenus au niveau du testicule. Contrairement à ce qui a été observé dans le testicule, il y a diminution significative des niveaux d'ARN messager dans la portion proximale de l'épididyme chez les individus traités. Cette baisse dans les niveaux d'ARNm est aussi accompagnée d'une diminution, sous les niveaux détectables, de la protéine dans les mêmes régions (proximales). Aucun impact n'a toutefois été observé au niveau de la queue de l'épididyme. Cela n'est pas surprenant, puisque la régulation des différentes fonctions de l'épididyme et de ces composantes est largement reliée aux différents segments (Hamilton, 1975 ; Kirchhoff, 1999). La sécrétion et l'expression spécifique de plusieurs gènes ont démontré cette caractéristique de l'épididyme. Une fois de plus, la question d'un impact direct ou par l'intermédiaire des autres types de jonctions

s'est posée. Dans ce cas toutefois, l'implication d'occludine était moins probable, les deux protéines étant localisées à des endroits différents, soit dans la portion apicale du tubule pour l'occludine et la zone basale pour la Cx43 (Cyr, Hermo et Laird, 1996 ; Cyr *et al.*, 1999). Toutefois, la protéine de jonction d'adhérence E-cadhérine est aussi reconnue comme étant nécessaire à l'établissement de la communication cellulaire dans divers tissus (Jongen *et al.*, 1991 ; Meyer *et al.*, 1992 ; Balda *et al.*, 1993). L'étude de développement de l'ARNm de cette protéine n'a toutefois pas permis de démontrer un lien quelconque entre les diminutions au jour 14 observés pour E-cad dans les deux segments de l'épididyme et celles observées aux jours 14, 18 et 22 pour la Cx43 dans le segment proximal. Cela suggère donc un impact des hormones thyroïdiennes sur la Cx43 dans l'épididyme. Cette possibilité est plausible puisque d'autres études ont déjà démontré l'interaction directe du récepteur des hormones thyroïdiennes avec un élément de réponse dans le promoteur de la Cx43. De plus, le retour rapide à la normale après la fin du traitement découlerait du fait que le remplacement des connexines est très rapide. Il est donc probable que les hormones thyroïdiennes règlent directement l'expression de la Cx43 dans la région proximale de l'épididyme, ce qui ne semble pas être le cas pour la queue. Cependant, cela n'est pas surprenant puisque plusieurs gènes et protéines sont régulés différemment selon les segments de l'épididyme.

Ainsi donc, cette portion de notre étude a permis de démontrer un impact des hormones de la thyroïde sur la Cx43 dans le testicule et l'épididyme. Toutefois, les études *in vivo* sont parfois limitantes et ne permettent toujours pas de démontrer certaines interactions entre différentes protéines. Dans l'optique de poursuivre l'exploration de la régulation des jonctions par les hormones thyroïdiennes dans l'épididyme, nous avons donc voulu développer un modèle *in vitro*.

Dans le domaine de la recherche sur l'épididyme, il est reconnu qu'un outil important, pouvant faciliter les différentes recherches, est inexistant. Il s'agit de la lignée cellulaire. Depuis quelques années, les lignées cellulaires sont fréquemment utilisées en remplacement des cultures primaires. Ces dernières sont très exigeantes et aussi

limitantes. Notre deuxième objectif était donc de développer une lignée cellulaire de cellules principales de l'épididyme.

L'immortalisation des cellules est un processus complexe et à l'état naturel très rare, voir souvent inexistant. Encore une fois, plusieurs méthodes sont utilisées pour parvenir à immortaliser des cellules (Swisshelm, 1999). L'introduction de l'antigène grand-T du virus simien 40 est une technique largement utilisée (Coleman et Harris, 1991 ; Alamzan et McKay, 1992). C'est donc cette méthode qui fut préconisée et dans l'optique de simplifier le processus, nous avons décidé d'introduire l'ADN par transfection. La difficulté d'immortaliser réside dans le fait qu'en plus du nombre très limité de cellules transfectées, très peu survivront aux étapes précédant l'immortalisation. Cela combiné à la perte des cellules lors de l'isolation des divers clones ne nous a pas permis d'obtenir un très grand nombre de clones. Un seul d'entre eux a pu être caractérisé. Malgré tout, les résultats sont satisfaisants. L'analyse en microscopie électronique a permis de statuer sur la nature épithéliale et épididymaire des cellules. Cependant, la population est mixte et trois types cellulaires distincts ont pu être identifiés. Cela résulte sans contredit de l'isolation des clones après la sélection, étape qui fût difficile. La nature épithéliale des cellules est tout de même surprenante, puisqu'il nous fut tout à fait impossible d'identifier de la cytokératine dans ces cellules. Ce phénomène demeure jusqu'à présent inexpliqué. De plus, ces cellules expriment différents marqueurs épididymaires de même que le messager de la claudine-1, protéine de jonction serrée. Le marquage des protéines de jonctions, tel que réalisé avec les cultures primaires n'a toutefois pu être réalisé, les cellules étant peu adhérentes. L'absence de E-cadhérine, pourrait expliquer ce manque d'adhérence. Malgré tout, l'analyse de microscopie a permis de confirmer l'établissement de jonctions entre les cellules. Une autre caractéristique des cellules immortalisées est leur vitesse de croissance. En fait, cela représente l'obstacle majeur à l'utilisation de cette lignée. Les cellules obtenues croissent extrêmement lentement, empêchant ainsi d'en obtenir un nombre suffisant pour mettre au point des expériences de toute sorte, y compris pour poursuivre les études sur les jonctions cellulaires.

La croissance lente des cellules en culture primaire n'est pas un fait surprenant, puisque l'épididyme est un épithélium hautement différencié qui n'est pas en régénération ou en prolifération. Ces cellules ne se divisent donc pas beaucoup. Toutefois, l'immortalisation des cellules par l'antigène grand-T est reliée à l'inactivation de différents suppresseurs de tumeurs, ce qui favorise généralement la croissance des cellules. Cela ne semble toutefois pas être le cas au niveau de l'épididyme, à tout le moins dans la lignée que nous avons créée. Lors de la caractérisation de cette dernière, une autre équipe a mentionné avoir aussi réalisé une lignée cellulaire de l'épididyme. La méthode utilisée est toutefois totalement différente, ceux-ci ayant utilisé des souris transgéniques pour l'antigène grand-T (Araki *et al.*, 2001). Le peu d'informations recueillies au sujet de cette lignée suggère que la faible croissance des cellules soit un problème commun. L'épididyme est un organe réputé pour ne pas être atteint par les cancers. Cela explique peut-être la difficulté à immortaliser ces cellules. Cette avenue de recherche serait intéressante à explorer.

En conclusion, la régulation des jonctions dans le testicule et l'épididyme par les hormones thyroïdiennes a donc été abordée. Toutefois, plusieurs autres protéines de jonctions pourraient aussi être affectées. Il pourrait se révéler intéressant d'étudier, entre autres, l'impact d'un hypothyroïdisme néonatal sur les autres connexines présentes dans ces deux organes. Des modèles *in vitro* de culture cellulaire et l'utilisation de dominants négatifs pourraient aussi permettre de vérifier la possibilité d'interactions entre les différents types de jonctions dans la régulation par les hormones thyroïdiennes. En ce qui concerne la lignée cellulaire, celle-ci sera conservée afin de vérifier si la croissance des cellules pourra augmenter. Certains essais seront réalisés afin de vérifier si la présence d'une matrice extracellulaire pourrait favoriser la croissance des cellules. Toutefois, d'autres essais, utilisant une autre technique ou un promoteur d'immortalisation différent, pourraient aussi être réalisés. Une lignée cellulaire de l'épididyme est un outil important dans l'étude de cet organe et ce à divers niveaux.

Bibliographie

AGARWAL A. et A.P. Hoffer. 1989. "Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rat". Journal of Andrology, vol. 10, p. 425-431.

AMINI S. et D.G. Cyr. non publié. "Localization and regulation of K-cadherin in the rat epididymis". Undergraduate Research Project, McGill University.

ANDERSON G.W., C.N. Mariash et J.H. Oppenheimer. 2000. "Molecular actions of thyroid hormone". In L.W. Braverman et R.D. Utiger (éd.). Werner & Ingbar's. The Thyroid. A fundamental and clinical text. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, p. 174-195.

ANDERSON J.M. et C.M. Van Italie. 1999. "Tight junctions : closing in on the seal". Current Biology, vol. 9, p. R922-R924.

ANDERSSON A.-M., K. Edvardsen et N.E. Skakkebaek. 1994. "Expression and localization of N- and E-cadherin in the human testis and epididymis". International Journal of Andrology, vol. 17, p. 174-180.

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

BALDA M.S. et K. Matter. 1998. "Tight junctions". Journal of Cell Science, vol. 111, p. 541-547.

BARDIN C.W., C.Y. Cheng, N.A. Musto et G.L. Gunsalus. 1988. "The Sertoli cell". In E. Knobil et J. Neill (éd.). The physiology of Reproduction. New York : Raven Press Ltd., p. 933-974.

BATIAS C., J.-P. Siffroi, P. Fénichel, G. Pointis et D. Segretain. 2000. "Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium". The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, vol. 48, p. 793-805.

BEDFORD J.M. 1975. "Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis". In R. O. Greep et E. B. Astwood (éd.). Handbook of Physiology, Section 7, Volume 5. Washington, DC : American Physiology Society, p. 303-317.

BEDFORD J.M. 1991. "Effects of elevated temperature on the epididymis and testis : experimental studies". In A.W. Zorgniotti (éd.). Temperature and environmental effects on the testis. New York : Plenum Press, p. 19-32.

- BENBROOK D. et M. Pfahl. 1987. "A novel thyroid hormone receptor encoded by a cDNA clone from human testis library". Science, vol. 238, p. 788-791.
- BERNADIS L.L., J.M. Natale, C.S. Fink, P.J. Horvath et A.B. Awad. 1995. "In vitro [¹⁴C]glucose utilization by tissues of weanling rats with hypothalamic area lesions one month after lesion production". Japanese Journal of Physiology, vol. 45, p. 631-344.
- BLODORN B., M. Mader, Y. Urade, O. Hayaishi, K. Felgenhauer et W. Bruck. 1996. "Choroid plexus: the major site of mRNA expression for the beta-trace protein (prostaglandin D synthase) in human brain". Neurosciences Letters, vol. 209, p. 117-120.
- BROOKS D.E. 1983a. "Epididymal functions and their hormonal regulation". Australian Journal of Biological Sciences, vol. 36, p. 205-221.
- BROOKS D.E. 1983b. "Effects of androgens on protein synthesis and secretion in various regions of the rat epididymis as analysed by two-dimensional gel electrophoresis". Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 29, p. 255-270.
- BRUZZONE R., T.W. White et D.L. Paul. 1996. "Connections with connexins : the molecular basis of direct intercellular signaling". European Journal of Biochemistry, vol. 238, p. 1-27.
- BRYANT P.J. 1997. "Junction genetics". Developmental Genetics, vol. 20, p. 75-90.
- BRUZZARD 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". Biology of Reproduction, vol. 62, p. 664-669.
- BYERS S., R.-M. Pelletier et C. Suárez-Quian. 1993. "Sertoli cell junctions and the seminiferous epithelium barrier". In L.D. Russell et M.D. Griswold (éd.). *The Sertoli cell*. Florida : Cache River Press, p. 431-446.
- BYERS S.W., S. Citi, J.M. Anderson et B. Hoxter. 1992. "Polarized functions and permeability properties of rat epididymal epithelial cells *in vitro*". Journal of Reproduction and Fertility, vol. 95, p. 385-396.
- BYERS S.W., S. Sujarit, B. Jegou, S. Butz, H. Hoschutzky, K. Herrenknecht, C. MacCalman et O.W. Blaschuk. 1994. "Cadherins and cadherin-associated molecules in the developing and maturing rat testis". Endocrinology, vol. 134, p. 630-639.
- CANALE D., M. Agostini, G. Giorgilli, C. Caglieresi, G. Scartabelli, V. Nardini, E.A. Jannini, E. Martino, A. Pinchera et E. Macchia. 2001. "Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis". Journal of Andrology, vol. 22, p. 284-288.

- CARREAU, S. 2001. "Germ cells : a new source of estrogens in male gonad". Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 178, p. 65-72.
- CHOPRA I.J. et L. Sabatino. 2000. "Nature and sources of circulating thyroid hormones". In L.W. Braverman et R.D. Utiger (éd.). *Werner & Ingbar's. The Thyroid. A fundamental and clinical text.* Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, p. 121-135.
- CITI S. 1993. "The molecular organization of tight junctions". The Journal of Cell Biology, vol. 121, p. 485-489.
- COOKE G.M. et B. Robaire. 1987. "The mechanism of rat epididymal 4-ene steroid-5 α -reductase". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 26, p. 361-368.
- COOKE P.S. 1991. "Thyroid hormones and testis development : a model system for increasing testis growth and sperm production". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 637, p. 122-132.
- 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, vol. 129, p. 237-243.
- COOKE P.S., R.A. Hess, J. Porcelli et E. Meisami. 1991. "Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism". Endocrinology, vol. 129, p. 244-248.
- COSTA S.L., K. Boekelheide, B.C. Vanderhyden, R. Seth et M.W. McBurney. 1997. "Male infertility caused by epididymal dysfunction in transgenic mice expressing a dominant negative mutation of retinoic acid receptor α ". Biology of Reproduction, vol. 56, p. 985-990.
- CYR D.G. et B. Robaire. 1991. "Developmental regulation of Epithelial- and Placental-cadherin mRNA's in the rat epididymis". Annals of New York Academy of Sciences, vol. 637, p. 399-408.
- CYR D.G., O.W. Blaschuk et B. Robaire. 1992. "Identification and developmental regulation of cadherin messenger ribonucleic acids in the rat testis". Endocrinology, vol. 131, p. 139-145.
- CYR D.G., L. Hermo, O.W. Blaschuk et B. Robaire. 1992. "Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis". Endocrinology, vol. 130, p. 353-363.
- CYR D.G. et B. Robaire. 1992. "Regulation of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) messenger ribonucleic acid in the rat epididymis". Endocrinology, vol. 130, p. 2160-2166.

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

CYR D.G., B. Robaire et L. Hermo. 1995. "Structure and turnover of junctional complexes between cells of the rat epididymis". Microscopy Research and Technique, vol. 30, p. 54-66.

CYR D.G., L. Hermo et D.W. Laird. 1996. "Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis". Endocrinology, vol. 137, p. 1474-1484.

CYR D.G., L. Hermo, N. Egenberger, C. Mertineit, J.M. Trasler et D.W. Laird. 1999. "Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis". Endocrinology, vol. 140, p. 3815-3825.

CYR D.G. 2001. "Understanding cell-cell interactions in the epididymis : key determinants for structural integrity and spermatozoal maturation". National Journal of Andrology, vol. 7, p. 351-357.

CYR D.G., K. Finnon, J. Dufresne et M. Gregory. 2002. "Cellular interactions and the blood-epididymal barrier". In B. Robaire et B. Hinton (éd.). *The epididymis : from molecules to clinical practice*. Plenum Publishers, p. 103-118

DAHL E., D. Manthey, Y. Chen, H.-J. Schwarz, Y.S. Chang, P.A. Lalley, B.J. Nicholson et W. Willecke. 1996. "Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 17903-17910.

DEBELLEFEUILLE S., L. Hermo et D.G. Cyr. 1999. "Regulation of α -catenin in the rat epididymis". Molecular Biology of the Cell, vol. 10 (supplement), p. L114.

DEBELLEFEUILLE S. et D.G. Cyr. 2001. "Association of ZO-1 and beta-catenin in the epididymis of the rat". International Congress of Andrology.

DE FRANCA L.R., R.A. Hess, P.S. Cooke et L.D. Russell. 1995. "Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil : evidence that the Sertoli cell controls testis growth". The Anatomical Record, vol. 242, p. 57-69.

DE KRETZER D.M. et J.B. Kerr. 1988. "The cytology of the testis". In E. Knobil et J. Neill (éd.). *The physiology of Reproduction*. New York : Raven Press Ltd., p. 837-932.

- DEL RIO A.G., C.L. Valdez et M.C. Quiros. 1979. "Thyroid gland and epididymal function in rats - Histological study". Archives of Andrology, vol. 3, p. 19-22.
- DEL RIO A.G. et M.C. Quiros. 1983. "Thyroid gland and epididymal function in rats II. Sperm motile efficiency". Archives of Andrology, vol. 11, p. 25-28.
- DEL RIO A.G., A.M. Blanco, O. Pignataro, H. Niepomnische, G. Juvenal et M.A. Pisarev. 2000. "High-affinity binding of T3 to epididymis nuclei". Archives of Andrology, vol. 44, p. 187-191.
- DEL RIO A.G., L.A. Palaoro et A.M. Blanco. 2001. "Epididymal scanning electron microscopy study in hypothyroid rats". Archives of Andrology, vol. 46, p. 73-77.
- DUFRESNE J., K.W. Finnsen, M. Gregory et D.G. Cyr. 2002. "Developmental changes in the expression of multiples connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication". Submitted.
- ENDERS G.C. 1993. "Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell communications". In L.D. Russell et M.D. Griswold (éd.). *The Sertoli cell*. Florida : Cache River Press, p. 447-460.
- EVANS W.H. 1994. "Assembly of gap junction intercellular communication channels". Biochemical Society Transactions, vol. 22, p. 788-792.
- FANNING A.S., B.J. Jameson, L.A. Jesaitis et J.M. Anderson. 1998. "The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton". The Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 29745-29753.
- FRIEND D.S. et N.B. Gilula. 1972. "Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues". The Journal of Cell Biology, vol. 53, p. 758-776.
- FURUSE M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura et S. Tsukita. 1993. "Occludin : a novel integral membrane protein localizing at tight junctions". The Journal of Cell Biology, vol. 123, p. 1777-1788.
- FURUSE M. K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto et S. Tsukita. 1998. "Claudin-1 and -2 : novel integral membrane proteins localized at tight junctions with no sequence similarity to occludin". The Journal of Cell Biology, vol. 141, p. 1539-1550.
- GEIGER B. et O. Ayalon. 1992. "Cadherins". Annual Review of Cell Biology, vol. 8, p. 307-332.
- GIEPMANS B.N.G. et W.H. Moolenaar. 1998. "The gap junction protein connexin 43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein". Current Biology, vol. 8, p. 931-934.

GILULA N.B., D.W. Fawcett et A. Aoki. 1976. "The Sertoli cell occluding junction and gap junction in mature and developing mammalian testis". Developmental Biology, vol. 50, p. 142-168.

GLOVER T.D. 1974. "Recent progress in the study of male reproductive physiology : testis stimulation ; sperm formation, transport and maturation (epididymal physiology) ; semen analysis, storage and artificial insemination". In AG Cuyton et D. Horrobin (éd.). Reproductive physiology, vol. 8. MIR International Review of Sciences. University Park Press. Baltimore, p. 221-270.

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

GOODENOUGH DA. 1999. "Plugging the leaks". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 319-321.

GOW A., C.M. Southwood, J.S. Li, M. Pariali, G.P. Riordan, S.E. Brodie, J. Danias, J.M. Bronstein, B. Kachar et R.A.Lazzarini. 1999. "CNS myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice". Cell, vol. 99, p. 649-659.

GREEN L.M., M. LaBue, J.P. Lazarus et J.C. Jennings. 1996. "Reduced cell-cell communication in experimentally induced autoimmune thyroid disease". Endocrinology, vol. 137, p. 2823-2832.

GREEN L.M., J.P. Lazarus, X. Song, R.B. Stagg, M. LaBue et S. Hilliker. 1997. "Elevation of protein kinase C in thryocytes isolated from a Lewis rat model of autoimmune thyroiditis prevents assembly of immunodetectable connexin43 gap junctions and reduces intercellular communication". Thyroid, vol. 7, p. 13-21.

GREGORY M., J. Dufresne, L. Hermo et D.G. Cyr. 2001. "Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis". Endocrinology, vol. 142, p. 854-863.

GRIFFIN J.E. et J.D. Wilson. 1998. "Disorders of the testes and the male reproductive tract". In J.D. Wilson *et al.* (éd.). Williams textbook of Endocrinology, 9^e édition. Pennsylvania : WB Saunders Company, p. 819-875.

GUERRERO P.A., R.B. Schuessler, L.M. Davis, E.C. Beyer, C.M. Johnson, K.A. Yamada et J.E. Saffitz. 1997. "Slow ventricular conduction in mice heterozygous for connexin43 null mutation". The Journal of Clinical Investigation, vol. 99, p. 1991-1998.

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

GUMBNER B.M. 1996. "Cell adhesion : the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis". Cell, vol. 84, p. 345-357.

GUMBNER B.M. 2000. "Regulation of cadherin adhesive activity". The Journal of Cell Biology, vol. 148, p. 399-403.

HAEFLIGER J.-A., R. Bruzzone, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland et D.L. Paul. 1992. "Four novel members of the connexin family of gap junction proteins". Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 2057-2064.

HALL P.F. 1988. "Testicular steroid synthesis : organization and regulation". In E. Knobil et J. Neill (éd.). *The physiology of Reproduction*. New York : Raven Press Ltd., p. 975-998.

HAMILTON D.W. 1975. "Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymis, and ductus deferens in the rat". In R. O. Greep et E. B. Astwood (éd.). *Handbook of Physiology, Section 7, Volume 5*. Washington, DC : American Physiology Society, p. 259-301.

HARDY M.P., J.D. Kirby, R.A. Hess et P.S. Cooke. 1993. "Leydig cells increases their number numbers but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism". Endocrinology, vol. 132, p. 2417-2420.

HARDY M.P., R.S. Sharma, N.K. Arambepola, C.M. Sottas, L.D. Russell, D. Bunick, R.A. Hess et P.S. Cooke. 1996. "Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat". Journal of Andrology, vol. 17, p. 231-238.

HARRISON R.G. 1975. "Effect of temperature on the mammalian testis". In R. O. Greep et E. B. Astwood (éd.). *Handbook of Physiology, Section 7, Volume 5*. Washington, DC : American Physiology Society, p. 219-223.

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". Journal of Cell Biology, vol. 141, p. 199-208.

HENNEMANN H., E. Dahl, J. White, H.-J. Schwarz, P.A. Lalley, B.J. Nicholson et K. Willecke. 1992. "Two gap junction genes connexin 31.1 and -30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin". Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 17225-17233.

HESS R.A., P.S. Cooke, D. Bunick et J.D. Kirby. 1993. "Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers". Endocrinology, vol. 1993, p. 2607-2613.

HESS R.A., D. Bunick, K.-H. Lee, J. Bahr, J.A. Taylor, K.S. Korach et D.B. Lubahn. 1997a. "A role for oestrogens in the male reproductive system". Nature, vol. 391, p. 447-448.

HESS R.A., D.H. Gist, D. Bunick, D.B. Lubahn, A. Farrell, J. Bahr, P.S. Cooke et G.L. Green. 1997b. "Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract". Journal of Andrology, vol. 18, p. 602-611.

HESS R.A., D. Bunick, D.B. Lubahn, Q. Zhou et J. Bouma. 2000. "Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice". Journal of Andrology, vol. 21, p. 107-121.

HINTON B.T. 1985. "The blood-epididymis barrier". In T.J. Lobl et E.S.E. Hafez (éd.). Male fertility and its regulation. Boston : MTP Press Ltd., p. 371-382.

HINTON B.T. et M.A. Palladino. 1995. "Epididymal epithelium : its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment". Microscopy Research and Technique, vol. 30, p. 67-81.

HINTON B.T., Z.J. Lan, D.B. Rudolph, J.C. Labus et R.J. Lye. 1998. "Testicular regulation of epididymal gene expression". Journal of Reproduction and Fertility supplement, vol. 53, p. 47-57.

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

HOH J.A., S.A. John et J.-P. Revel. 1991. "Molecular cloning and characterization of a new member of the gap junction gene family, connexin-31". Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 6524-6531.

JABBOUR H.N., L.A. Clarke, A.S. McNeilly, M. Edery et P.A. Kelly. 1998. "Is prolactin a gonadotrophic hormone in red deer (*Cervus elaphys*)? Pattern of expression of the prolactin receptor gene in the testis and epididymis". Journal of Molecular Endocrinology, vol. 20, p. 175-182.

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 tissue". Endocrinology, vol. 126, p. 2521-2526.

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

- JONES R.C. 1998. "Evolution of the vertebrate epididymis". Journal of Reproduction and Fertility supplement, vol. 53, p. 163-181.
- JONGEN W.M.F., D.J. Fitzgerald, M. Asamoto, C. Piccoli, T.J. Slaga, D. Gros, M. Takeichi et H. Yamasaki. 1991. "Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by CA^{2+} in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin". The Journal of Cell Biology, vol. 114, p. 545-555.
- JOYCE K.L., J. Porcelli et P.S. Cooke. 1993. "Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse". Journal of Andrology, vol. 14, p. 448-455.
- JUNEGA S.C., J. Barak, G.C. Enders et G.M. Kidder. 1999. "Defects in the germ line and gonads of mice lacking Cx43". Biology of Reproduction, vol. 60, p. 1263-1270.
- KIDRONI G., R. Har-Nir, J. Menzel, I.W.. Frutkoff, Z. Palti et M. Ron. 1983. "Vitamin D3 metabolites in rat epididymis : high 24-25-dihydroxy vitamin D3 levels in the cauda region". Biochemical and Biophysical Research Communication, vol. 133, p. 982-989.
- KIRCHHOFF C. 1999. "Gene expression in the epididymis". International Reivew of Cytology, vol. 188, p. 133-202.
- KOJIMA T., N. Sawada, H. Chiba, Y. Kokai, M. Yamamoto, M. Urban, G.-H. Lee, E.L. Hertzberg, Y. Mochizuki et D.C.Spray. 1999. "Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes : connexin 32 interacts with occludin". Biochemical and Biophysical Reseach Communications, vol. 266, p. 222-229.
- KOLAJA K.L., J.S. Petrick et C.D. Klaassen. 2000. "Inhibition of gap-junctional-intercellular communication in thyroid-follicular cells by prophythiouracil and low iodine diet". Toxicology, vol. 143, p. 195-202.
- KORACH K.S., J.F. Couse, S.W. Curtis, T.F. Washburn, J. Lindzey, K.S. Kimbro, E.M. Eddy, S. Migliaccio, S.M. Snedeker, D.B. Lubahn, D.W. Schomberg et E.P. Smith. 1996. "Estrogen receptor gene disruption : Molecular characterization and experimental and clinical phenotypes". Recent Progress in Hormone Research, vol. 51, p. 159-186.
- KWON S., R.A. Hess, D. Bunick, J.D. Kirby et J.M. Bahr. 1997. "Estrogen receptors are present in the epididymis of the rooster". Journal of Andrology, vol. 18, p. 378-384.
- LARSEN P.R., T.F. Davies et I.D. Hay. 1998. "The thyroid gland". In J.D. Wilson *et al.* (éd.). Williams textbook of Endocrinology, 9^e édition. Pennsylvania : WB Saunders Company, p. 389-464.

LARUE L., M. Ohsugi, J. Hirchenhain et R. Kemler. 1994. "E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium". Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, vol. 91, p. 8263-8267.

LASLET A.L., L.-H. Li, W.F. Jester Jr. Et J.M. Orth. 2000. "Thyroid hormone down-regulates neural cell adhesion molecule expression and affects attachment of gonocytes in Sertoli cell-gonocyte cocultures". Endocrinology, vol. 141, p. 1633-1641.

LEUNG P.S., H.C. Chan, Y.W. Chung, T.P. Wong et P.Y. Wong. 1998. "The role of local angiotensins and prostaglandins in the control of anion secretion by the rat ". Journal of Reproduction and Fertility supplement, vol. 53, p. 15-22.

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

LEVY S., V. Serre, L. Hermo et B. Robaire. 1999. "The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the brown Norway rat". Journal of Andrology, vol. 20, p. 356-365.

LISSITZKY S. 1990. "Thyroid hormones". In E.-E. Baulieu et P.A. Kelly (éd.). Hormones. New York : Hermann Publishers in arts and science, p. 341-374.

LO C.W. 1999. "Genes, gene knockouts, and mutations in the analysis of gap junctions". Developmental Genetics, vol. 24, p. 1-4.

LONGCOPE C. 2000. "The male and female reproductive tract in hypothyroidism". In L.W. Braverman et R.D. Utiger (éd.). Werner & Ingbar's. The Thyroid. A fundamental and clinical text. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, p. 824-832.

LUEGMAYR E., H. Glantschnig, F. Varga et K. Klaushofer. 2000. "The organization of adherens junctions in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) and their modulation by triiodothyronine and 1,25-dihydroxyvitamin D3". Histochemistry and cellular biology, vol. 113, p. 467-478.

MACCALMAN C.D., R. Farookhi et O.W. Blaschuk. 1994. "Estradiol regulates E-cadherin mRNA levels in the surface of epithelium of the mouse ovary". Clinical & Experimental Metastasis, vol. 12, p. 276-282.

MACCALMAN C.D., S. Getsios, R. Farookhi et O.W. Blaschuk. 1997. "Estrogens potentiate the stimulatory effects of follicle-stimulating hormone on N-cadherin messenger ribonucleic acid levels in cultured mouse Sertoli cells". Endocrinology, vol. 138, p. 41-48.

- MARIEB E.N. 1993. Anatomie et physiologie humaines. Traduit de l'anglais par J.-P. Artiau, *et al.*. Québec : Les éditions du renouveau pédagogique, 1014p.
- MEYER R.A., D.W. Laird, J.-P. Revel et R.G. Johnson. 1992. "Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies". The Journal of Cell Biology, vol. 119, p. 179-189.
- MITIC L.L., C.M. Van Italie et J.M. Anderson. 2000. "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function : lessons from mutant animals and proteins". American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology, vol. 279, p. G250-G254.
- MOIROI S., M. Saitou, K. Fujimoto, A. Sakakibara, M. Furuse, O. Yoshida et S.H. Tsukita. 1998. "Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes". American Journal of Physiology, vol. 274, p. C1708-C1717.
- MORITA K., M. Furuse, K. Fujimoto et S. Tsukita. 1999a. "Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strand". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 511-516.
- MORITA K., H. Sasaki, K. Fujimoto, M. Furuse et S. Tsukita. 1999b. "Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cell in testis". The Journal of Cell Biology, vol. 145, p. 579-588.
- MUNARI-SILEM Y. et B. Rousset. 1996. "Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands – molecular and functional aspects : a review". European Journal of Endocrinology, vol. 135, p. 251-264.
- MUNRO S.B. et O.W. Blaschuk. 1996. "A comprehensive survey of the cadherins expressed in the testes of fetal, immature, and adult mice utilizing the Polymerase Chain Reaction". Biology of Reproduction, vol. 55, p. 822-827.
- NEAVES W.B. et P.S. Bramley. 1972. "Relationship between blood levels of testosterone and accessory gland weights in impala (*Aepyceros melampus*)". Comparative Biochemistry and Physiology. A: Comparative Physiology, vol. 42, p. 983-987.
- OHSUGI M., L. Larue, H. Schwarz et R. Kemler. 1997. "Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin". Developmental Biology, vol. 185, p. 261-271.
- ORGEBIN-CRIST M.-C., B.J. Danzo et J. Davies. 1975. "Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis". In R. O.

Greep et E. B. Astwood (éd.). Handbook of Physiology, Section 7, Volume 5. Washington, DC : American Physiology Society, p. 319-338.

ORGEBIN-CRIST M.-C. 1996. "Androgens and epididymal function". In S. Bhasin *et al.* (éd.). Pharmacology, biology and clinical applications of androgens. Wisley-Liss, Inc., p. 27-38.

ORGEBIN-CRIST M.-C. 1998. "The epididymis across 24 centuries". Journal of Reproduction and Fertility supplement, vol. 53, p. 285-292.

PÖTTER E., C. Bergwitz et G. Brabant. 1999. "The cadherin-catenin system : implications for growth and differentiation of endocrine tissues". Endocrine Reviews, vol. 20, p. 207-239.

PUJOL A. et F. Bayard. 1979. "Androgen receptors in the rat epididymis and their hormonal control". Journal of Reproduction and Fertility, vol. 56, p. 217-222.

RADICE G.L., M.C. Ferreira-Cornwell, S.D. Robinson, H. Rayburn, L.A. Chodosh, M. Takeichi et R.O. Hynes. 1997. "Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice". Journal of Cell Biology, vol. 139, p. 1025-1032.

RAHNER C., L.L. Mitic et J.M. Anderson. 2001. "Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut". Gastroenterology, vol. 120, p. 411-422.

RISLEY M.S., I.P. Tan, C. Roy et J.C. Sáez. 1992. "Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin 43 gap junctions in testes". Journal of Cell Science, vol. 103, p. 81-96.

RISLEY M.S. 2000. "Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat". Biology of Reproduction, vol. 62, p. 748-754.

ROBAIRE, B. et L. Hermo. 1988. "Efferent ducts, epididymis, and vas deferens : structure, functions, and their regulation". In E. Knobil et J. Neill (éd.). The physiology of Reproduction. New York : Raven Press Ltd., p. 999-1080.

ROWLANDS T.M., J.M. Symonds, R. Farookhi et O.W. Blaschuk. 2000. "Cadherins : crucial regulators of structure and function in reproductive tissues". Reviews of Reproduction, vol. 5, p. 53-61.

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

- 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". Molecular Biology of the Cell, vol. 11, p. 4131-4142.
- SETCHELL B.P. et D.E. Brooks. 1988. "Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract". In E. Knobil et J. Neill (éd.). *The physiology of Reproduction*. New York : Raven Press Ltd., p. 753-836.
- SHETH B., B. Moran, J.M. Anderson et T.P. Fleming. 2000. "Post-translational control of occludin membrane assembly in mouse trophoctoderm : a mechanism to regulate timing of tight junction biogenesis and blastocyst formation". Development, vol. 127, p. 831-840.
- SHINOHARA K., T. Funabashi, D. Mitushima et F. Kimura. 2000. "Effects of estrogen on the expression of connexin32 and connexin43 mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats". Neuroscience Letters, vol. 286, p. 107-110.
- SHORE E.M. et W.J. Nelson. 1991. "Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells". The Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 19672-19680.
- SIMON A.M. et D.A. Goodenough. 1998. "Diverse functions of vertebrate gap junctions". Trends in Cell Biology, vol. 8, p. 477-483.
- SPRAY D.C. 1998. "Gap junction proteins. Where they live and how they die". Circulation Research, vol. 83, p. 679-681.
- STEGER K., F. Tetens et M. Bergmann. 1999. "Expression of connexin 43 in human testis". Histochemistry and Cellular Biology, vol. 112, p. 215-220.
- STEINBERGER E. et A. Steinberger. 1975. "Spermatogenic function of the testis". In R. O. Greep et E. B. Astwood (éd.). *Handbook of Physiology, Section 7, Volume 5*. Washington, DC : American Physiology Society, p. 1-19.
- STOCK A., H. Sies et W. Stahl. 1998. "Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones". Biochemical Pharmacology, vol. 55, p. 475-479.
- STOCK A. et H. Sies. 2000. "Thyroid hormone receptors bind to an element in the connexin43 promoter". Biological Chemistry, vol. 381, p. 973-979.
- SUN E.L. et C.J. Flickinger. 1979. "Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis". American Journal of Anatomy, vol. 154, p. 27-56.

TAN I.P., C. Roy, J.C. Sáez, C.G. Sáez, D.L. Paul et M.S. Risley. 1996. "Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions". Biology of Reproduction, vol. 54, p. 1300-1310.

TAUROG A.M. 2000. "Hormone synthesis : thyroid iodine metabolism". In L.W. Braverman et R.D. Utiger (éd.). *Werner & Ingbar's. The Thyroid. A fundamental and clinical text.* Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, p. 61-84.

TONEY T.W. et B.J. Danzo. 1989a. "Estrogen and androgen regulation of protein synthesis by the immature rabbit epididymis". Endocrinology, vol. 125, p. 231-242.

TONEY T.W. et B.J. Danzo. 1989b. "Androgen and estrogen effects on protein synthesis by the adult rabbit epididymis". Endocrinology, vol. 125, p. 243-249.

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

TROXELL M.L., S. Gopalkrishnan, J. McCormack, B.A. Poteat, J. Pennington, S.M. Garringer, E.E. Schneeberger, W.J. Nelson et J.A. Marrs. 2000. "Inhibiting cadherin function by dominant mutant E-cadherin expression increases the extent of tight junction assembly". Journal of Cell Science, vol. 113, p. 985-996.

TSUKITA S. et M. Furuse. 1998. "Overcoming barriers in the study of tight junction functions : from occludin to claudin". Genes to Cells, vol. 3, p. 569-573.

TSUKITA S., M. Furuse et M. Itoh. 1999. "Structural and signaling molecules come together at tight junctions". Current Opinion in Cell Biology, vol. 11, p. 628-633.

TSUKITA S. et M. Furuse. 2000a. "Pores in the wall : claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores". The Journal of Cell Biology, vol. 149, p. 13-16.

TSUKITA S. et M. Furuse. 2000b. "The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions". Annals of New York Academy of Sciences, vol. 915, p.129-135.

TURNER T.T., C.E. Jones, S.S. Howards, L.L. Ewing, B. Zegeye et G.L. Gunsalus. 1984. "On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa". Endocrinology, vol. 115, p. 1925-1932.

VAN HAASTER L.H., F.H. De Jong, R. Docter et D.G. De Rooij. 1992. "The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat". Endocrinology, vol. 131, p. 1574-1576.

- VIGER R.S. et B. Robaire. 1991. "Differential regulation of steady state 4-ene steroid 5 α -reductase messenger ribonucleic acid levels along the rat epididymis". Endocrinology, vol. 128, p. 2407-2414.
- VIGER R.S. et B. Robaire. 1992. "Expression of 4-ene steroid 5 α -reductase messenger ribonucleic acid in the rat epididymis during postnatal development". Endocrinology, vol. 131, p. 1534-1540.
- VIGER R.S. et B. Robaire. 1994. "Immunocytochemical localization of 4-ene steroid 5 α -reductase type 1 along the rat epididymis during postnatal development". Endocrinology, vol. 134, p. 2298-2306.
- VITALE R, D.W. Fawcett et M. Dym. 1973. "The normal development of the blood-testis barrier and the effects of Clomiphene and estrogen treatment". Anatomical Records, vol. 176, p. 333-344.
- VLEMINCKX K. et R. Kemler. 1999. "Cadherins and tissue formation : integrating adhesion and signaling". BioEssays, vol. 21, p. 211-220.
- WILLECKE K., S. Kirchhoff, A. Plum, A. Temme, E. Thönnissen et T. Ott. 1999. "Biological functions of connexin genes revealed by human genetic defects, dominant negative approaches and targeted deletions in the mouse". In Gap junction-mediated intercellular signalling in health and disease. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 219), p. 76-96.
- WILLIAMS C.L., V.Y. Hayes, A.M. Hummel, J.E. Tarara et T.J. Halsey. 1993. "Regulation of E-cadherin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors in small cell lung carcinoma". The Journal of Cell Biology, vol. 121, p. 643-654.
- WOO P.L., H.H. Cha, K.L. Singer et G.L. Firestone. 1996. "Antagonistic regulation of tight junction dynamics by glucocorticoids and transforming growth factor- β in mouse mammary epithelial cells". The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 404-412.
- WU J.-C., C.W. Gregory et R.M. DePhilip. 1993. "Expression of E-cadherin in immature rat and mouse testis and in rat Sertoli cell cultures". Biology of Reproduction, vol. 49, p. 1353-1361.
- YEUNG C.H., E. Sonnenberg-Riethmacher et T.G. Cooper. 1998. "Receptor tyrosine kinase *c-ros* knockout mice as a model for the study of epididymal regulation of sperm function". Journal of Reproduction and Fertility supplement, vol. 53, p. 137-147.
- YINGJIAN W. et B. Rose. 1997. "An inhibition of gap-junctional communication by cadherins". Journal of Cell Science, vol. 110, p. 301-309.

ZETTL K.S., M.D. Sjaastad, P.M. Riskin, G. Parry, T.E. MaChen et G.L. Firestone. 1992. "Glucocorticoid-induced formation of tight junctions in mouse mammary epithelial cells *in vitro*". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 89, p. 9069-9073.

ZHANG J.T. et B.J. Nicholson. 1989. "Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junction, Cx26, as deduced from its cDNA". Journal of Cell Biology, vol. 109, p. 3391-3401.

