

LES SIALOPROTÉINES ÉPIDIDYMAIRES. ACTIONS DE QUELQUES FACTEURS EXOGÈNES ET ENDOGÈNES

P. LAPORTE, J. GILLET et A. PEYRE*

*Laboratoire de Physiologie animale,
Faculté des Sciences fondamentales et appliquées,
40, Avenue du Recteur Pineau,
86022 Poitiers*

** Laboratoire de Physiologie comparée,
Faculté des Sciences,
Parc de Grandmont,
37200 Tours*

RÉSUMÉ

L'étude des acides sialiques épидидymaires solubles dans l'acide trichloracétique et des glycoprotéines auxquelles ils se rattachent permet de dégager les faits suivants obtenus chez le Rat :

— les androgènes stimulent plus efficacement que certain métabolite (DHT), la production des sialoglycoprotéines à tous les niveaux de l'épididyme. Ils accroissent également d'une façon importante, la teneur en AS de ces molécules, contrôlant ainsi leur constitution ;

— les spermatozoïdes contribuent à enrichir l'épididyme en AS mais leur participation varie d'une part avec leur nombre, donc avec l'âge des animaux et d'autre part avec leur état de maturation, fonction lui-même de la position intra-épididymaire qu'ils occupent. On enregistre à cet égard une perte d'AS des spermatozoïdes lorsqu'ils cheminent le long du canal épидидymaire ;

— le milieu épидидymaire, résultant de l'apport du fluide testiculaire et du métabolisme propre des cellules épithéliales paraît, sous l'influence indispensable des androgènes et ou de leurs métabolites, contribuer au processus de maturation physico-chimique des spermatozoïdes.

INTRODUCTION

On sait que la qualité du spermatozoïde et sa capacité fertilisante évoluent dans le tractus génital du mâle et de la femelle. Cependant, depuis longtemps, la question est posée de savoir si la maturation intra-épididymaire est un processus intrinsèque ou extrinsèque au spermatozoïde. Pour YOUNG (1929), elle est inhérente à la cellule

germinale, mais depuis, de nombreux auteurs (BEDFORD, 1967 ; ORGEBIN-CRIST, 1967 *b*, 1969 ; PAUFLER et FOOTE, 1968 ; IGBOELI et FOOTE, 1969) ont montré que cette capacité fertilisante du spermatozoïde s'acquiert non seulement à un niveau donné de l'épididyme (corps distal chez le Lapin, queue proximale chez le Rat et le Hamster) mais dépend aussi des androgènes sans pouvoir préciser si cette action des stéroïdes est directe ou passe par l'intermédiaire de l'épididyme. Néanmoins il est de plus en plus certain que la maturation physiologique des spermatozoïdes est étroitement liée à l'environnement épидидymaire. Or celui-ci est constitué en partie par le fluide testiculaire, profondément modifié au fur et à mesure qu'il avance dans les conduits épидидymaires, mais surtout par les sécrétions épithéliales de ce canal. Il était par conséquent intéressant d'étudier quantitativement ces sécrétions par le biais des *acides sialiques* entrant dans la composition des glycoprotéines. On sait d'autre part (HARTREE et SRIVASTAVA, 1965) que les spermatozoïdes contiennent eux-mêmes des quantités non négligeables d'AS *membranaire et acrosomial* dont les propriétés physico-chimiques conditionnent vraisemblablement l'importance physiologique.

Dans le présent travail, nous détaillerons deux points particuliers concernant l'origine et le contrôle des sialoprotéines épидидymaires : l'influence des androgènes et la participation des spermatozoïdes.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

A. — *Protocoles expérimentaux*

1. *Influence des androgènes.*

a) *Actions comparées des benzoates de testostérone et de 5 α -dihydrotestostérone.*

— Douze rats adultes ont été répartis en 4 lots : témoins normaux, témoins castrés, castrés traités au benzoate de testostérone et castrés traités au benzoate de dihydrotestostérone. Les doses totales d'androgènes (8,4 mg) ont été injectées en 22 jours après 10 jours de castration.

b) *Action d'un anti-androgène.*

— Dix rats adultes, castrés depuis 25 jours ont été soumis pendant 10 jours à des injections quotidiennes sous-cutanées de 0,2 mg de propionate de testostérone, mais la moitié des animaux recevait en plus chaque jour 1 mg d'acétate de cyprotérone.

2. *Participation des spermatozoïdes.*

a) *Diminution de la population épидидymaire.*

— Vingt-cinq rats adultes ont reçu en injections i.p., 10 mg/kg de busulfan tandis que 25 rats du même âge ont reçu un volume identique du milieu de suspension. Les animaux ont été sacrifiés par lots de 5 tous les 15 jours pendant 2 mois et demi.

b) *Augmentation du nombre des spermatozoïdes dans la tête de l'épididyme.*

— Neuf rats adultes traités comme précédemment au busulfan ont subi, 3 jours avant d'être sacrifiés, une ligature de l'isthme épидидymaire sous légère anesthésie à l'éther. Les rats furent sacrifiés par lots de 3 respectivement 1 mois, 1 mois et demi et 2 mois après administration de l'agent alkylant.

B. -- Méthodes analytiques

1. Préparation des échantillons.

Les épидидymes sont broyés à froid, au Potter de verre dans un volume d'acide trichloracétique à 5 p. 100 correspondant à 25 fois le volume de l'organe.

Après une heure d'attente au froid et centrifugation à 10 000 g pendant 20 mn, à 0°C, le TCA est extrait du surnageant par l'éther sans peroxyde (3 fois \times 2 vol.). L'éther est ensuite évaporé par barbotage d'azote. On ajoute alors à chaque échantillon un volume d'acide sulfurique 1N égal au 1/9 du volume du surnageant. Le chauffage à 80°C pendant 1 heure de ces solutions d'acidité 0,1N permet l'hydrolyse des liaisons neuraminyl.

2. Purification et concentration des surnageants.

Étant données, d'une part la teneur relativement faible en acide sialique des extraits épидидymaires TCA solubles et d'autre part l'impossibilité d'augmenter la sensibilité du dosage, déjà exceptionnelle (0,5 μ g), nous devons concentrer les hydrolysats tout en les débarrassant des oses interférant : fucose et désoxyribose. Pour cela, nous avons adapté à notre matériel la technique de SVENNERHOLM (1957). Chaque hydrolysat est passé sur un volume de résine anionique (Dowex 2 \times 8 ; mesh 200-400) (colonne de 0,4 \times 4 cm) tel que le volume de l'éluant (2,2 ml de tampon acétate à pH = 4,6) est voisin de celui de la prise d'éluat pour le dosage (2 ml).

3. Dosages spectrophotométriques.

a) *Des acides sialiques* : nous avons utilisé la méthode d'AMINOFF (1961) à l'acide 2-thio-barbiturique.

b) *Des protéines* : la méthode de LOWRY (1951) fut appliquée d'une part à une prise aliquote du broyat épидидymaire dans l'acide trichloracétique (50 μ l) pour estimer les protéines totales et d'autre part à une prise aliquote du surnageant déséthéré (300 μ l) pour évaluer les glycoprotéines TCA solubles.

c) *De l'acide citrique* : cet acide organique a été dosé, dans un broyat perchlorique des vésicules séminales, par la méthode enzymatique à la citrate-lyase selon MOELLERLING et GRUBER (1966).

4. Numération des spermatozoïdes.

Elle est effectuée à l'hématimètre et après dilution convenable, sur un broyat épидидymaire réalisé au Turrax (12 000 tr/mn) dans du sérum physiologique formolé.

5. Préparation des solutions.

a) *Busulfan* : la poudre est mise en suspension dans l'huile d'amande douce (concentration : 2 mg/ml), conservée à -20°C en flacons à usage unique, réchauffée et homogénéisée au moment de l'emploi.

b) *Stéroïdes* : tous les androgène et anti-androgène utilisés ont été mis en solution dans l'huile de sésame par chauffage à 60°C pendant quelques heures. Ce procédé à chaud a évité l'utilisation d'un solvant alcoolique pour dissoudre les androgènes ou du benzyl-benzoate pour solubiliser l'acétate de cyprotérone.

RÉSULTATS

Actions comparées de certains androgènes et d'un anti-androgène
(tabl. 1, 2, 3)

Les valeurs consignées dans le tableau 1 montrent que la 5 α -DHT administrée aux mêmes doses et sous la même forme saline (benzoate) que la testostérone possède un pouvoir morphogène moindre tant au niveau des vésicules séminales que des

TABLEAU I

Valeurs pondérales ($m \pm e.s.m.$) chez les rats castrés, traités à moyen terme par le benzoate de testostérone ou le benzoate de 5α -dihydro-testostérone. Comparaison avec les rats témoins

Série	Nbre rats	Corps (g)	Ves. Sem. (mg)	Épididyme		Test. (mg)
				t (mg)	q (mg)	
T	3	420 \pm 18	851 \pm 41	211 \pm 3,9	249 \pm 3,5	1 609 \pm 36
C	3	396 \pm 10,5	117 \pm 6	40,3 \pm 1,7	55,2 \pm 1,2	—
C + B.DHT	3	394 \pm 20	226 \pm 22,5	69 \pm 5	85 \pm 1,7	—
C + B.T	3	376 \pm 36	809 \pm 54	94 \pm 1,9	112 \pm 2,1	—

TABLEAU 2

Valeurs biochimiques chez les rats castrés, traités à moyen terme par le benzoate de testostérone ou le benzoate de 5α -dihydrotestostérone ($m \pm e.s.m.$)

() Nombre d'animaux

Protéines		Castrés (3)	C + B.DHT (3)	C + BT (3)
Épididyme	Tête	4,1 \pm 0,2	6,82 \pm 0,65	8,1 \pm 0,6
	Queue	5,2 \pm 0,2	9,25 \pm 0,95	9,9 \pm 0,9
Fractions TCA-solubles		A.S.s (μ g)	G.P. (μ g)	ASs/GP (μ g % μ g)
a) Tête	C	2,17 \pm 0,27	104 \pm 9,75	2,16 \pm 0,45
	C + B DHT	4,57 \pm 0,25	147 \pm 12	3,13 \pm 0,08
	C + BT	8,61 \pm 0,23	181 \pm 15	4,8 \pm 0,5
b) Queue	C	2,89 \pm 0,3	132,5 \pm 6,9	2,18 \pm 0,12
	C + B DHT	5,95 \pm 0,26	180 \pm 12	3 \pm 0,15
	C + BT	10,25 \pm 0,24	257 \pm 9	4 \pm 0,16
		ASs/P (μ g % mg)	GP/P (μ g/mg)	
a) Tête	C	53,5 \pm 8,1	25,3 \pm 1,4	
	C + B DHT	67,7 \pm 4,5	21,7 \pm 1,2	
	C + BT	107,5 \pm 10	22,3 \pm 1	
b) Queue	C	55,3 \pm 4	25,4 \pm 0,9	
	C + B DHT	66 \pm 8,6	22 \pm 3,8	
	C + BT	106 \pm 13	26,4 \pm 2,3	

épididymes. Il en est de même pour le pouvoir sécrétoire estimé par les variations des sialoprotéines TCA solubles épididymaires. On peut à ce sujet dégager du tableau 2 les observations suivantes :

— sous l'influence des stéroïdes, on note une augmentation simultanée dans les deux zones épididymaires des teneurs en ASs et de leurs concentrations exprimées par rapport aux protéines totales,

— les concentrations en ASs exprimées par rapport aux glycoprotéines augmentent plus sous l'influence de la testostérone que de la 5 α -DHT, ce qui peut traduire aussi bien une différence qualitative que quantitative,

— si les teneurs des glycoprotéines augmentent sous l'effet des stéroïdes, leurs concentrations par rapport aux protéines totales restent stables ou même diminuent parfois.

Le tableau 3 précise essentiellement le caractère fortement inhibiteur de l'acétate de cyprotérone vis-à-vis des effets stimulant du propionate de testostérone.

TABLEAU 3

Influence de l'acétate de cyprotérone chez le Rat castré, traité au propionate de testostérone. Valeurs pondérales et variations biochimiques épididymaires (m \pm e.s.m.)

() Nombre d'animaux

Série (5)	Corps (g)	Vésicules séminales			Épididymes (mg)	
		poids (mg)	ac. citrique (μ g) (μ g % mg)		tête	queue
C + PT	252 \pm 8	227 \pm 15,5	124,5 \pm 2,7	55,3 \pm 2,8	30,9 \pm 0,46	44,6 \pm 1,65
C + PT + A.C.	212 \pm 5,7	53 \pm 4,2	19,6 \pm 3,1	37,7 \pm 7,2	17,6 \pm 0,74	19,2 \pm 1,63
Série (5) ou (4)	A.S.s. (μ g)	GP (μ g)	P (mg)	ASs/P (μ g % mg)	GP/P (μ g/mg)	ASs/GP (μ g % μ g)
C + PT	7,3 \pm 0,25	126,5 \pm 8	7,25 \pm 0,55	102,5 \pm 6,9	17,9 \pm 2	5,85 \pm 0,35
C + PT + A.C.	3,33 \pm 0,2	74 \pm 6	4 \pm 0,4 (4)	86 \pm 6,2 (4)	18,5 \pm 1,65 (4)	4,6 \pm 0,39

L'inhibition s'exerce aussi bien sur le poids des annexes génitales (épididyme et vésicules séminales) que sur leurs sécrétions (sialoprotéines et acide citrique).

Répercussion sur l'épididyme de la diminution de la spermatogenèse par le busulfan (tabl. 4 et 5)

Le tableau 4 regroupe les données pondérales et le nombre des spermatozoïdes épididymaires. Les faibles variations du poids du corps et des vésicules séminales, la quasi constance des poids testiculaires et épididymaires indiquent que ces animaux

TABLEAU 4
*Variations pondérales et nombre de spermatozoïdes épiddidymaires
 chez les rats adultes témoins et traités au busulfan
 (m ± e.s.m.)*

Jours après inj. i.p.	Age (j)	Nbre Rats	Corps (g)	Ves. sem. (mg)	Test. G (mg)	Épididyme G. (mg)		Spermatozoïdes ($\times 10^6$)	
						t	q	t	q
Huile	15	5	286 ± 3,9	748 ± 52	1 390 ± 66	163 ± 4,3	178 ± 3,5	56,4 ± 8,4	153,2 ± 7
	30	5	332 ± 10,4	763 ± 18	1 583 ± 18	199 ± 10,3	213 ± 9,3	75,4 ± 8,3	176,6 ± 14,5
	45	5	335 ± 5,8	845 ± 63	1 565 ± 13	205 ± 3,4	218 ± 5,2	74,4 ± 13,8	198,6 ± 9,8
	60	5	335 ± 9,9	957 ± 71	1 478 ± 29	202 ± 2,4	231,5 ± 7,3	68,4 ± 6,2	224,5 ± 10,1
	75	5	397 ± 41	957 ± 54,5	1 508 ± 31	202 ± 2,9	285 ± 7,2	73,6 ± 3,6	210 ± 40,5
Busulfan	15	5	277 ± 9,6	685 ± 24	1 313 ± 30	175 ± 6	182 ± 4,5	97,2 ± 16,1	160 ± 18,3
	30	5	298 ± 7,7	823 ± 44,5	1 119 ± 31	174 ± 2,5	199 ± 4,9	71,2 ± 11,4	177,4 ± 8,7
	45	5	325 ± 9,3	1 008 ± 46	990 ± 48	160 ± 4,5	201 ± 6,5	26 ± 6,9	128 ± 22
	60	5	344 ± 5,6	1 096 ± 70	987 ± 25	151 ± 3,7	175 ± 3,6	4,8 ± 0,86	83,8 ± 8,2
	75	5	368 ± 9,1	1 079 ± 73	1 119 ± 69	130 ± 5,7	146 ± 5,2	4,37 ± 2,71	30,5 ± 0,87

TABLEAU 5

Évolution des paramètres biochimiques dans la tête (t) et la queue (q) de l'épididyme chez les rats adultes témoins et traités au busulfan (m ± e.s.m.)

Jours après injection i.p.	Huile						Busulfan																											
	15		30		45		60		75		15		30		45		60		75															
GP (μ g)	t	242 ± 4,7	269 ± 6,5	376 ± 43	317 ± 11,5	332 ± 13	286 ± 13,5	247,5 ± 12,5	271 ± 10,5	244 ± 13,5	224 ± 9	282 ± 19	289,5 ± 10,5	444 ± 6	310 ± 21	359 ± 6,5	264 ± 3	274 ± 16,5	330 ± 13	292,5 ± 12,5	220 ± 4,9													
	q	15,7 ± 0,63	19,9 ± 0,26	23,5 ± 0,73	22,6 ± 1,4	23,5 ± 0,62	17,4 ± 1	16,1 ± 0,5	17,6 ± 1,25	15,8 ± 0,2	13,2 ± 0,3	20,2 ± 0,35	24,7 ± 1,15	30,5 ± 1,15	22,4 ± 0,8	19,2 ± 0,9	21,3 ± 0,9	23,7 ± 0,4	16,1 ± 0,5	13,7 ± 0,6	18,6 ± 0,55	23,2 ± 0,8	27,5 ± 1,1	32,5 ± 1,4	20,6 ± 0,5	30,8 ± 1,3	21,2 ± 0,6	22 ± 0,6	20,8 ± 0,4	26 ± 0,7	17,6 ± 0,55	15,2 ± 0,45	20,3 ± 0,5	13,6 ± 0,3

ont atteint la pleine maturité. Ceci est corroboré par l'équilibre du nombre des gamètes dans les deux parties proximale et distale de l'épididyme et la richesse très supérieure de la queue, devenue un vrai réservoir de spermatozoïdes.

Si les animaux traités au busulfan ne présentent guère de différence avec les témoins du même âge en ce qui concerne le poids du corps et celui des vésicules séminales, on note par contre un effondrement maximum du poids testiculaire deux mois après l'injection et une diminution progressive du poids de l'épididyme au fur et à mesure que s'éliminent les spermatozoïdes.

On vérifie ainsi les propriétés antispermatogénétiques du busulfan. Ses effets sont également transitoires puisque deux mois et demi après l'injection, on constate une remontée du poids du testicule correspondant à une reprise de la spermatogénèse.

En ce qui concerne les sialoprotéines épидидymaires, les teneurs sont intéressantes à considérer (tabl. 5) surtout lorsqu'on les compare aux variations du nombre des gamètes (figure). Ainsi, les valeurs absolues des deux éléments TCA solubles, AS et GP dosés dans les épидидymes oligospermes s'écartent d'autant plus de celles des épидидymes témoins du même âge que les différences de teneurs en spermatozoïdes augmentent. Cependant les AS diminuent beaucoup plus régulièrement que les GP lorsque l'épididyme se vide de son contenu en spermatozoïdes. Ces deux éléments varient donc différemment, l'un (ASs) étant plus étroitement dépendant du nombre de spermatozoïdes que l'autre (GP).

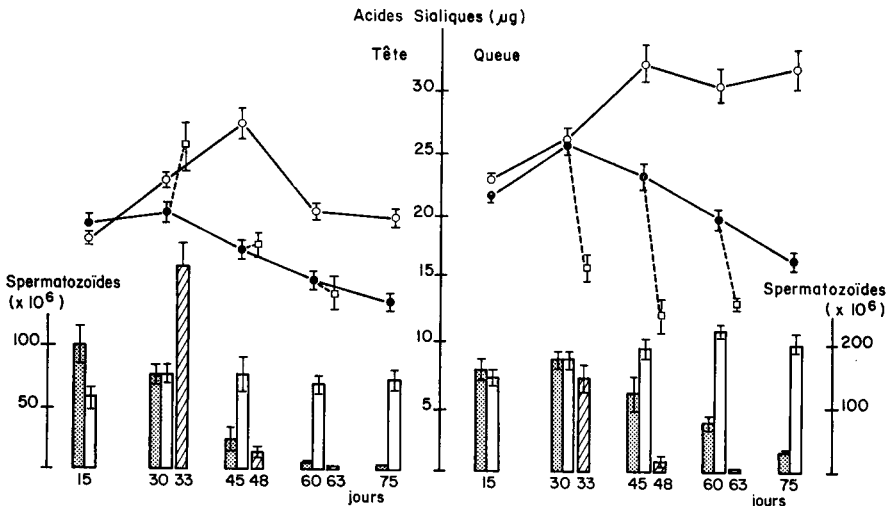


FIG. 1. — Évolutions comparées des ASs et des spermatozoïdes épидидymaires chez les rats adultes témoins (○), traités au busulfan (●) et après traitement, ligaturés à l'isthme depuis trois jours (□)

Effets des ligatures à l'isthme épидидymaire

Nous constatons dans le tableau 6 que la pose d'une ligature à l'isthme épидидymaire a des effets variables selon la durée du traitement au busulfan. En particulier, on note une augmentation du poids et du nombre des spermatozoïdes de la tête de l'épididyme chez les animaux traités depuis 1 mois (les valeurs passent ainsi

TABLEAU 6

Évolution du nombre de spermatozoïdes, du poids de l'épididyme et des paramètres biochimiques après 3 jours de ligature à l'isthme (L) chez des rats avec une production spermatogénétique variable. Comparaison avec les témoins non ligaturés, mais traités au busulfan (B) depuis 30, 45 et 60 jours (m ± e.s.m.)

		Nbre	B30	B45	B60	Nbre	B30 + L	B45 + L	B60 + L
Épid. G.	t	5	174 ± 2,5	159,5 ± 4,5	150 ± 3,7	3	263 ± 11,5	184 ± 6,7	161 ± 7
	q		199 ± 4,9	201 ± 6,4	174,5 ± 3,6		196 ± 5,4	163 ± 5,4	164 ± 8
Gamètes (× 10 ⁶)	t	4	70,2 ± 14,7	34 ± 6	5,25 ± 0,94	3	162 ± 16	14,3 ± 2	0
	q		172 ± 8,8	142 ± 21,7	89 ± 8,1		151 ± 18	22,5 ± 1,8	0
ASs (μg)	t	4	20,8 ± 0,4	17,6 ± 0,5	15,2 ± 0,5	3	25,5 ± 1,8	17,8 ± 0,8	14 ± 1,4
	q		26 ± 0,7	23,6 ± 1	20,2 ± 0,5		16,5 ± 0,7	12,4 ± 0,7	13,6 ± 0,2
GP (μg)	t	4	247,5 ± 12,5	271 ± 10,5	241 ± 13,5	3	461 ± 69	235,5 ± 7,4	241 ± 7,2
	q		274 ± 16,5	330 ± 13	292,5 ± 12,5		317 ± 19,5	287 ± 12	349 ± 13,4
P (mg)	t	4	16,5 ± 0,5	17,6 ± 1,2	15,7 ± 0,2	3	26,2 ± 2,7	17,3 ± 1,2	15 ± 1,1
	q		21,3 ± 0,9	23,7 ± 0,4	16,4 ± 0,5		21,9 ± 1,4	17,1 ± 2,3	18 ± 0,3

de 174 mg et $70,2 \times 10^6$ gamètes chez les traités non ligaturés à 263 mg et 162×10^6 gamètes chez les traités ligaturés depuis 3 jours). Par contre l'afflux des spermatozoïdes testiculaires est arrêté 15 et 30 jours plus tard (B45 et B60), ce qui est en accord avec la durée du cycle spermatogénétique qui avoisine 50 jours chez le Rat (CLERMONT *et al.*, 1959).

D'autre part, lorsque les spermatozoïdes augmentent en nombre (B30 et B30 + L), les AS, GP et P de la tête de l'épididyme augmentent en teneur mais le coefficient d'accroissement varie selon l'élément considéré : ASs (123 p. 100), P (158 p. 100) et GP (186 p. 100).

Enfin lorsque l'apport de spermatozoïdes est arrêté (B45 et B60) ce qui, nous le savons (LAPORTE *et al.*, 1975) n'exclut pas l'arrivée de fluide testiculaire, les 3 éléments épидидymaires ont au niveau de la tête des valeurs voisines dans les deux séries d'animaux.

DISCUSSION

A. — Androgènes périphériques

Étant donnés les rapports anatomiques étroits entre le testicule et l'épididyme, l'étude des sialoprotéines exigeait de rechercher en premier lieu l'influence des androgènes. Or ceux-ci peuvent stimuler la cellule épидидymaire soit par la voie générale lorsqu'ils sont véhiculés par le sang, soit par la voie locale lorsqu'ils transitent avec le fluide testiculaire. Nous précisons ici uniquement l'influence des premiers.

Les expériences de stimulation par les androgènes des épидидymes des animaux castrés établissent bien l'hormono-dépendance de cet organe dans la production sialoprotéinique. Néanmoins, les protéines totales et les sialoglycoprotéines augmentent plus, en fonction du temps d'administration des androgènes sous l'influence du benzoate de T que du benzoate de DHT. Ceci est en accord d'une part avec les résultats obtenus *in vitro* par BLAQUIER (1973) montrant que l'incorporation des acides aminés dans l'épididyme en culture était plus élevée sous l'influence de la testostérone que de la DHT, et d'autre part avec ceux de KARKUM *et al.* (1974) chez les Hamsters. Ces animaux adultes soumis à une supplémentation hormonale en testostérone ou dihydrotestostérone dès le lendemain de la castration rattrapent sur le plan des synthèses d'acides sialiques le niveau des témoins, mais les auteurs ne tiennent aucun compte des apports qualitatif et quantitatif en AS par les spermatozoïdes.

L'activation simultanée des parties antérieure et distale de l'épididyme par les androgènes démontre que le type cellulaire, sécréteur de sialocomposés se retrouve à tous les niveaux de l'organe ; c'est notamment le cas des cellules principales stéréociliées dont les fonctions d'absorption et de sécrétion chez le Rat ont été récemment précisées en ultrastructure par HOFFER *et al.* (1973) et en cytochimie ultrastructurale chez le Lapin par FLÉCHON (1972). On sait d'autre part depuis quelques années, que la testostérone est rapidement convertie dans les glandes annexes du tractus génital mâle en métabolites hydrogénés (BEAULIEU, 1970 ; GLOYNA et WILSON, 1969 ; INANO et ALII, 1969) dont la nature, l'importance quantitative et les propriétés biologiques varient avec l'organe effecteur. A cet égard, l'épididyme du Rat possède non seulement les récepteurs moléculaires de la DHT permettant à ce métabolite apporté

par le fluide testiculaire (AAFJES et VREEBURG, 1972) ou le sang (EWING et BROWN, 1975) de pénétrer dans la cellule et d'atteindre le noyau, (HANSSON et TVETER, 1971 ; TINDALL *et al.*, 1972 ; HANSSON *et al.*, 1973 ; DANZO *et al.*, 1974 ; WEDDINGTON *et al.*, 1974) mais également l'équipement enzymatique (5α -réductase) nécessaire à la formation des métabolites (MAINWARING et MANGAN, 1973). Les études *in vivo* et *in vitro* effectuées par DJØSELAND *et al.* (1973 *a* et *b*) montrent qu'à partir de la testostérone tritiée les cellules épидидymaires forment 40 à 47 p. 100 de DHT et environ 25 p. 100 de 5α -androstane 3α et β -diols. C'est pourquoi nous avons comparé les effets de la T_B et de la DHT_B . Nous constatons qu'à doses égales, la T_B augmente beaucoup plus les concentrations en ASs de l'épididyme que la DHT_B alors que ni l'une ni l'autre n'augmente les concentrations des glycoprotéines. Ceci peut vouloir dire que la structure moléculaire des glycoprotéines sécrétées est modifiée, dans le sens d'un enrichissement du groupement prosthétique en AS, plus efficacement sous l'influence des androgènes (testostérone et androsténédione) que de leurs métabolites. GIBBONS (1959) a relaté une telle modification dans le cas du mucus cervical des bovins au cours de la gestation (abaissement du rapport Fucoose + Acide sialique/Hexosamine). Or cette sécrétion relève d'un type unique de glande utérine.

B. — Participation des spermatozoïdes

Afin de connaître dans quelle mesure les spermatozoïdes participent aux teneurs en sialoprotéines de l'épididyme, il fallait modifier leur nombre en plus ou en moins d'une manière importante. Pour cela, on pouvait agir soit au niveau testiculaire en diminuant la production spermatogénétique, soit au niveau épидидymaire en bloquant le transit des gamètes par ligature de l'isthme. Si dans le premier cas, la disparition temporaire de la spermatogenèse entraîne à moyen terme la vacuité de tout le canal épидидymaire, avec la seconde modalité par contre, on obtient un engorgement en spermatozoïdes de la partie antérieure de l'épididyme tandis que la partie postérieure s'appauvrit progressivement.

a) Effets consécutifs à la disparition des spermatozoïdes épидидymaires.

La figure montre que l'effondrement de la population épидидymaire en gamètes s'accompagne d'une chute importante et régulière des ASs.

Cette observation nous a suggéré la possibilité de déterminer la teneur des spermatozoïdes en ASs. Nous avons choisi pour cela les animaux les plus âgés puisque, par rapport aux témoins du même âge, les traités depuis 75 jours présentaient des épидидymes quasiment dépourvus de spermatozoïdes et dans lesquels le nouvel équilibre du milieu intracanaliculaire était le mieux réalisé en l'absence de spermatozoïdes. La méthode indirecte utilisée a donné les résultats suivants (LAPORTE, 1975) :

1) Les spermatozoïdes épидидymaires contiennent en moyenne $9,5 \times 10^{-8}$ μg d'ASs. Cette valeur est voisine de celles déterminées par d'autres auteurs chez l'Homme (WARREN, 1959) et dans plusieurs espèces domestiques, notamment le Taureau (FUHRMANN, 1963) et le Bélier (SRIVASTAVA, 1965).

2) La teneur en ASs des spermatozoïdes diminue au cours du transit épидидymaire. Elle passe de $11,55 \pm 0,8 \times 10^{-8}$ μg au niveau de la tête à $8,61 \pm 0,57 \times 10^{-8}$ μg dans la queue. Ce résultat, en contradiction apparente avec l'augmentation des charges négatives observée par BEDFORD (1963) chez le Lapin et NEVO *et al.* (1951)

chez le Taureau, confirme en réalité la pluralité des groupes chimiques porteurs de charges négatives et leur répartition inégale à la surface des gamètes comme le mentionnaient récemment YANAGIMACHI *et al.* (1973).

La diminution observée de la teneur en ASs des spermatozoïdes au cours du transit épидидymaire peut être mise en parallèle avec celle des protéines déjà mentionnée par d'autres auteurs (LAVON, VOLCANI et DANON, 1971) et que nous retrouvons également. *Par conséquent, il est probable que la perte d'ASs constitue un critère supplémentaire de maturation biochimique des gamètes au cours du transit épидидymaire.*

b) *Effets consécutifs à l'augmentation du nombre de spermatozoïdes épидидymaires.*

Lorsque le transit des spermatozoïdes est bloqué depuis 3 jours par une ligature à l'isthme, on note parallèlement à l'augmentation du nombre des gamètes, une forte augmentation des teneurs en glycoprotéines dans la tête de l'épididyme et, après calcul selon la méthode indirecte précédemment utilisée, une teneur en ASs des spermatozoïdes (5×10^{-8} $\mu\text{g}/\text{cellule}$) inférieure à celle des gamètes transitant librement dans l'épididyme.

Pour un même nombre de spermatozoïdes accumulés dans l'épididyme, l'augmentation plus grande des GP que des AS peut s'expliquer ainsi. Partant du fait que le fluide testiculaire transporte vers l'épididyme une certaine quantité de protéines (KOSKIMIES et KORMANO, 1971 et 1973) qui dans les conditions physiologiques normales sont essentiellement réabsorbées dans les premières zones épидидymaires (CRABO, 1965), il est possible que l'entassement des spermatozoïdes diminue par obstruction directe, les possibilités de réabsorption des cellules épithéliales. Ceci est corroboré par l'absence d'augmentation des glycoprotéines dans la tête de l'épididyme lorsque celle-ci ne contient quasiment plus de spermatozoïdes (B45 et B60).

Quant aux faibles teneurs en ASs des spermatozoïdes qui stagnent en amont de la ligature, il serait tentant de les assimiler aux valeurs de spermatozoïdes surmaturés, puisqu'elles sont nettement inférieures aux teneurs rencontrées dans les cellules germinales de la queue d'un épидидyme intact. L'accélération de cette maturation physico-chimique peut résulter du fait que les spermatozoïdes sont contraints de baigner plus longtemps que normalement dans un milieu épидидymaire excessivement riche en stéroïdes qu'ils métabolisent. Cette hypothèse mériterait d'autres preuves plus convaincantes que le seul dosage des ASs ; néanmoins, si on compare les spermatozoïdes aux hématies, autre type cellulaire dans lequel l'acide sialique membranaire joue un rôle physiologique important, GATTEGNO *et al.* (1974) ont montré que le traitement à la neuraminidase diminue significativement leur durée de vie.

Cette perte expérimentale d'AS membranaire correspondrait donc à un vieillissement de la cellule, entraînant son élimination par le foie pour les hématies, par nécrose de l'épididyme pour les spermatozoïdes bloqués à l'isthme. C'est ce que l'on observe effectivement au-delà du 5^e jour de ligature.

On peut se demander si, dans ces conditions expérimentales, la maturation physico-chimique supposée des gamètes s'accompagne de leur maturation morphologique et biologique. Si BLAQUIER *et al.* (1972) n'observent aucune transformation des acrosomes de Cobaye dans la zone au-dessus de la ligature, ORGEBIN-CRIST (1973) par contre, constate, 24 heures après la ligature et en présence d'androgènes, l'acquisition du pouvoir fécondant par les spermatozoïdes de Lapin dans la zone du corps

proximal. Or, normalement, les gamètes n'acquièrent cette aptitude qu'une fois parvenus dans le corps distal. Si on considère l'observation récente de LUBICZ-NAWROCKI (1973), démontrant l'efficacité supérieure des 3 α -diols par rapport à la DHT dans le maintien du pouvoir fertilisant des spermatozoïdes de Hamster, on peut penser que l'environnement épидидymaire en général et les androgènes en particulier, sont indispensables au déroulement normal des processus complexes de maturation des spermatozoïdes.

*Colloque D. G. R. S. T., Biologie de la Procréation,
Paris, 7-8 mars 1975.*

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. RENARD, Laboratoire Techni-Pharma (Monaco) et le Docteur NEUMANN Laboratoire Schering (Berlin) de nous avoir fourni respectivement le busulfan (Misulban) et l'acétate de cyprotérone à l'état pur.

Ce mémoire constitue une partie de la thèse d'État de P. LAPORTE (A. O.-C. N. R. S. n° 10 839) en préparation.

Ce travail a bénéficié de l'aide de la D. G. R. S. T., contrat n° 71-7-3249.

SUMMARY

EPIDIDYMAL SIALOPROTEINS.

ACTION OF SOME EXOGENIC AND ENDOGENIC FACTORS

The study of rat epididymal sialic acids (soluble in TCA) and the glycoproteins to which they are attached, permits the following observations :

— androgens stimulate the production of sialoglycoproteins more efficiently at all levels of the epididymis than do their metabolites (DHT). They also significantly increase the content of sialic acids in these molecules, thus controlling the composition,

— spermatozoa contribute to sialic acid enrichment of the epididymis, but this contribution varies with the number of spermatozoa present and their state of maturation, which is a function of the intra-epididymal position they occupy. Thus, a loss of sialic acid from the spermatozoa is observed as they move down the epididymis.

— epididymal medium, resulting from the testicular fluid and epithelial cell metabolism, seems to contribute to physico-chemical maturation of the spermatozoa under the indispensable influence of androgens and/or their metabolites.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AAFJES J. H., VREEBURG J. T. M., 1972. Distribution of 5 α -dihydrotestosterone in the epididymis of bull and boar, and its concentration in rat epididymis after ligation of efferent testicular ducts, castration and unilateral gonadectomy. *J. Endocr.*, **53**, 85-93.
- AMINOFF D., 1961. Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminic-acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.*, **81**, 384-392.
- BAULIEU E., 1970. The actions of hormones metabolites : a new concept in endocrinology. *Annls. Clin. Res.*, **2**, 246.
- BEDFORD J. M., 1963. Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. *Nature*, **200**, 1178-1180.

- BEDFORD J. M., 1967. Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *J. Exp. Zool.*, **166**, 271-282.
- BLAQUIER J. A., 1973. An *in vitro* action of androgens on protein synthesis by epididymal tubules maintained in organ culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 1177-1183.
- BLAQUIER J. A., CAMEO M. S., BURGOS M. H., 1972. The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea pig. *Endocrinology*, **90**, 839-842.
- CLERMONT Y., LEBLOND C. P., MESSIER B., 1959. Durée du cycle de l'épithélium séminal du rat. *Arch. Anat. Micr. Morphol. exp.*, **48 bis**, 37-56.
- CRABO B., 1965. Studies on the composition of epididymal content of bulls and boars. *Acta vet. scand.*, **6**, suppl. 5, 1-94.
- DANZO B. J., ELLER B. C., ORGEBIN-CRIST M. C., 1974. Studies on the site of origin of the androgen binding protein present in epididymal cytosol from mature intact rabbits. *Steroids*, **24**, 107-121.
- DJØSELAND O., HANSSON V., HAUGEN H. N., 1973. Androgen metabolism by rat epididymis. I. Metabolic conversion of ³H-testosterone *in vivo*. *Steroids*, **21**, 773-783.
- DJØSELAND O., HANSSON V., HAUGEN H. N., 1974. Androgen metabolism by rat epididymis. II. Metabolic conversion of ³H-testosterone *in vitro*. *Steroids*, **23**, 397-410.
- EWING L., BROWN B., 1975. Formation and secretion of 5 α -Androstan-17 β -ol-3-one, 5 α -Androstan-3 α , 17 β -diol and 5 α -Androstan-3 β , 17 β -diol by the perfused rabbit testis epididymis. *Endocrinology*, **96**, 479-485.
- FLECHON J. E., 1972. Cytochimie ultrastructurale de l'épididyme : absorption et sécrétion. *J. Microscopie*, **14**, 47 a (abstr.).
- FUHRMANN VON G. F., GRANZER E., BEY E., RUHENSTROTH BAUER G., 1963. Die elektroforetische Beweglichkeit der Spermien des Rindes. *Z. Naturforsch.*, **18 b**, 236-242.
- GATTEGNO L., BLADIER D., CORNILLON P., 1974. The role of sialic acid in the determination of survival of rabbit erythrocytes in the circulation. *Carbohydrate Res.*, **34**, 361-369.
- GIBBONS R. A., 1959. Chemical properties of two mucoids from bovine cervical mucin. *Biochem. J.*, **73**, 209-217.
- GLOYNA R. E., WILSON J. D., 1969. A comparative study of the conversion of testosterone to 17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one by prostate and epididymis. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **29**, 970-977.
- HANSSON V., DJØSELAND O., REUSCH E., ATTRAMADAL A., TORGENSEN O., 1973. Intracellular receptors for 5 α -DHT in the epididymis of adult rats. Comparison with the androgenic receptors in the ventral prostate and the androgen binding protein (ABP) in the testicular and epididymal fluid. *Steroids*, **22**, 19-33.
- HANSSON V., TVETER K. J., 1971. Uptake and binding *in vivo* of ³H-labelled androgen in the rat epididymis and ductus deferens. *Acta endocr.*, **66**, 745-755.
- KARKUN T., RAJALAKSHMI M., PRASAD M. R. N., 1974. Maintenance of the epididymis in the castrated golden hamster by testosterone and dihydrotestosterone. *Contraception*, **9**, 471-485.
- HARTREE E. F., SRIVASTAVA P. N., 1965. Chemical composition of the acrosomes of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **9**, 47-60.
- HOFFER A. P., HAMILTON D. W., FAWCETT D. W., 1973. The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. *Anat. Rec.*, **175**, 169-202.
- IGBOELI G., FOOTE R. H., 1969. Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1703-1705.
- INANO H., MACHINO A., TAMAOKI B. I., 1969. *In vitro* metabolism of steroid hormones by cell-free homogenates of epididymes of adult rats. *Endocrinology*, **84**, 997-1003.
- KOSKIMIES A. I., KORMANO M., LAHTI A., 1971. A difference in the immunoglobulin content of seminiferous tubule fluid and rete testis fluid of the rat. *J. Reprod. Fert.*, **27**, 463-465.
- KOSKIMIES A. I., KORMANO M., 1973. The proteins in fluids from the seminiferous tubules and rete testis of the rat. *J. Reprod. Fert.*, **34**, 433-444.
- LAPORTE P., 1974. Teneur en acides sialiques des spermatozoïdes épididymaires : estimation indirecte, *in vivo* chez le Rat. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **279**, série D, 761-764.
- LAPORTE P., GILLET J., 1975. Influence de la spermatogenèse sur la sécrétion du fluide testiculaire chez le Rat adulte. *C. R. Acad. Sc. Paris* (sous presse).
- LAVON U., VOLCANI R., DANON D., 1971. The proteins of bovine spermatozoa from the caput and cauda epididymis. *J. Reprod. Fert.*, **24**, 219-232.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- LUBICZ-NAWROCKI C. M., 1973. The effect of metabolites of testosterone on the viability of hamster epididymal spermatozoa. *J. Endocr.*, **58**, 193-198.
- MAINWARING W. I. P., MANGAN F. R., 1973. A study of the androgen receptors in a variety of androgen-sensitive tissues. *J. Endocr.*, **59**, 121-139.
- MOELLERING H., GRUBER W., 1966. Determination of citrate with citrate lyase. *Anal. Biochem.*, **17**, 369-376.
- NEVO A. C., MICHAELI I., SHINDLER H., 1961. Electrophoretic properties of bull and of rabbit spermatozoa. *Exp. Cell. Res.*, **23**, 69-83.

- ORGEBIN-CRIST M. C., 1967. Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature*, **216**, 816-818.
- ORGEBIN-CRIST M. C., 1969. Studies on the function of the epididymis. *Biol. Reprod.*, **1**, 155-175.
- ORGEBIN-CRIST M. C., 1973. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis : effect of castration and testosterone replacement. *J. Exp. Zool.*, **185**, 301-309.
- PAUFLER S. K., FOOTE R. H., 1968. Morphology, motility and fertility of spermatozoa recovered from different areas of ligated rabbit epididymides. *J. Reprod. Fert.*, **17**, 125-137.
- SRIVASTAVA P. N., 1965. *Biochemistry of the sperm-acrosome. With special reference to sialic acid.* Thèse, Cambridge.
- SVENNERHOLM L., 1958. Quantitative estimation of sialic acids. III. An anion resin method. *Acta. Chem. Scand.*, **12**, 547-554.
- TINDALL D. J., FRENCH F. S., NAYFEH S. N., 1972. Androgen uptake and binding in rat epididymal nuclei, *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **49**, 1391-1397.
- WARREN L., 1959. Sialic acid in human semen and in the male genital tract. *J. Clin. Invest.*, **38**, 755-761.
- WEDDINGTON S. C., McLEAN W. S., NAYFEH S. N., FRENCH F. S., 1974. Androgen binding protein (ABP) in rabbit testis and epididymis. Changes with age in comparison with the androgen binding protein (TeBG) in serum and separation from the intra-cellular receptor in epididymis. *Steroids*, **24**, 123-133.
- YANAGIMACHI R., NODA Y. D., FUJIMOTO M., NICOLSON G. L., 1973. The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa. *Am. J. Anat.*, **135**, 497-520.
- YOUNG W. C., 1929. A study of the function of the epididymis. I. Is the attainment of full spermatozoon maturity attributable to some specific action of the epididymal secretion?. *J. Morphol.*, **47**, 479-495.