

médecine/sciences 1997; 13:57-61

# Présence de cellules acidifiantes dans l'épididyme et le canal déférent : implication de la pompe à protons, H<sup>+</sup>-ATPase

La mobilité des spermatozoïdes constitue une propriété essentielle à leur fonction: aller à la rencontre de l'ovocyte et le féconder. C'est au cours de leur traversée épididymaire que les spermatozoïdes acquièrent leur potentiel de mobilité fonctionnelle. Le liquide luminal, contenu dans l'épididyme, et le canal déférent présentent un pH acide chez plusieurs espèces animales [1, 2]. Il semble qu'un pH faible soit nécessaire pour assurer la maturation finale des spermatozoïdes. Ce milieu acide, en conjonction avec d'autres facteurs tels que certaines protéines spécifiques, des acides faibles et d'autres ions, maintient les spermatozoïdes dans un état de dormance durant leur séjour dans l'épididyme et le canal déférent [1, 3]. Ce n'est qu'au moment où ils sont mélangés au plasma séminal, lors de l'éjaculation, que les spermatozoïdes deviennent mobiles. L'augmentation du pH intracellulaire apparaît comme l'un des événements clés parmi tous les mécanismes impliqués dans l'éveil des spermatozoïdes [1, 4, 5-7]. Le processus d'acidification luminale a des répercussions importantes au plan physiologique. Or, peu d'études ont abordé les mécanismes d'acidification et leur régulation physiologique au niveau du système reproducteur mâle. Nous avons récemment découvert que certaines cellules présentes dans l'épithélium de l'épididyme et du canal déférent possèdent une grande quantité de pompes à protons de type vacuolaire (H+-ATPase) [8, 9]. La H<sup>+</sup>-ATPase est une enzyme multimérique dont quelques sous-unités sont intimement imbriquées dans la membrane plasmique ou dans la membrane d'organites.

Cette enzyme consomme de l'ATP pour transporter des protons de part et d'autre de la membrane et se trouve donc impliquée dans plusieurs processus d'acidification. Nous allons d'abord évoquer le rôle des cellules possédant une grande quantité de pompes à protons dans différents épithéliums, puis nous examinerons la contribution de ces cellules au processus d'acidification luminale dans l'épididyme et le canal déférent.

# Distribution tissulaire et fonctions des cellules acidifiantes

Plusieurs épithéliums présentent une sous-population de cellules dont certaines caractéristiques spécifiques sont intimement liées à leur rôle dans le transport transépithélial de protons [10]. Ces cellules jouent un rôle important dans divers processus physiologiques, tels que l'acidification de la lumière tubulaire du néphron rénal, afin d'éliminer les acides produits par le métabolisme cellulaire. Jusqu'à présent, ces cellules ont surtout été étudiées au niveau de la vessie de tortue et de crapaud, ainsi qu'au niveau du canal collecteur du rein où elles sont connues sous le nom de cellules intercalaires [11-14]. Ces cellules contiennent, dans leur cytoplasme, un haut niveau d'anhydrase carbonique de type II, ainsi que des H+-ATPases sur leur membrane plasmique et sur certaines vésicules intracellulaires [10]. Ces deux enzymes travaillent conjointement à la sécrétion de protons (figure 1). Par ailleurs, ces cellules subissent quelques modifications morphologiques distinctes lors de l'augmentation de la sécrétion de protons par leur épithélium respectif [12]. Ces altérations semblent résulter de la fusion de vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique. Ces vésicules sont également impliquées dans le processus d'endocytose de certaines portions de la membrane plasmique riche en H\*-ATPases [14-17]. Grâce à cette population de vésicules spécialisées, des molécules H\*-ATPase font l'aller-retour à partir de la membrane plasmique. Cette activité de recyclage

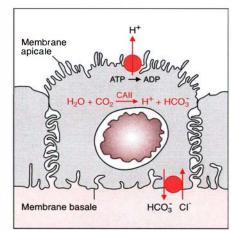


Figure 1. Mécanisme d'acidification luminale dans le tubule collecteur rénal par les cellules intercalaires de type A. L'anhydrase carbonique de type II (CAII), une enzyme cytoplasmique, catalyse l'hydratation du CO2, ce qui entraîne la formation d'ions H et HCO3<sup>-</sup>. La pompe à protons, H+-ATPase, située dans la membrane apicale sécrète les ions H<sup>+</sup>, tandis que l'échangeur basolatéral CI-/HCO3réabsorbe les ions HCO3-. Dans l'épididyme et le canal déférent, une H+-ATPase similaire et l'anhydrase carbonique de type II sont également impliquées dans la sécrétion luminale de protons. Cependant, la nature du transport basolatéral de HCO3- est encore inconnue [10].

engendre un taux extrêmement élevé d'endocytose, révélé par des marqueurs fluorescents liés au dextran [18, 19], ou par des marqueurs opaques aux électrons [15, 19].

Comment la régulation de l'activité de cette pompe à protons est-elle assurée? Chez les animaux, il a été clairement démontré que l'acidose systémique stimule l'exocytose des vésicules contenant les pompes H<sup>+</sup>-ATPase provoquant une augmentation rapide et importante d'H+-ATPases dans la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales rénales [20]. L'élévation de la pression partielle du CO<sub>9</sub> dans le milieu extracellulaire peut provoquer un effet similaire dans un épithélium isolé [14, 19, 20]. Or, dans la mesure où deux sous-types de cellules intercalaires se retrouvent dans le canal collecteur cortical du rein, cette situation se complique davantage. Dans les cellules de type A, la H<sup>+</sup>-ATPase est localisée au niveau du pôle apical et un échangeur chlorure/bicarbonate de type AE1 est présent dans la membrane basolatérale. Les cellules de type B constituent, quant à elles, une image en miroir des cellules A puisqu'elles présentent une localisation des pompes à protons diffuse ou basolatérale [21] ainsi qu'un échangeur chlorure/bicarbonate apical. Ces dernières participent à la sécrétion de bicarbonate dans la lumière tubulaire [13]. Cette diversité de cellules impliquées dans le transport de protons n'existe toutefois ni dans l'épididyme ni dans le canal déférent où toutes les cellules riches en H+-ATPases semblent contribuer à la sécrétion de protons dans la lumière tubulaire [8, 9]. La modification de l'acidification luminale de plusieurs épithéliums dépend de l'équilibre acido-basique de l'organisme entier, mais aussi de différents facteurs. Parmi ceux-ci, on retrouve des inhibiteurs spécifiques de la H<sup>+</sup>-ATPase de type vacuolaire tels que la bafilomycine, ou relativement non spécifiques tels que le Néthyl maléimide (NEM) [22]. En outre, l'aldostérone [23], les agonistes adrénergiques [24], les microtubules constituant le cytosquelette [25], ainsi que certains ions transportés avec les protons tel le chlorure [26] sont également impliqués dans

la sécrétion luminale de protons. De futures recherches permettront de déterminer dans quelle mesure ces facteurs sont susceptibles ou non de modifier le pH de l'épididyme et du canal déférent.

# Processus d'acidification dans l'épididyme et le canal déférent

Des recherches antérieures sur l'épididyme perfusé ont mis en lumière le rôle d'un échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> dans le processus d'acidification [27]. Cette observation s'appuyait sur la dépendance du flux de protons au sodium. Cette étude faisait aussi état d'une diminution du pH luminal de l'épididyme chez les rats en acidose systémique, alors que l'alcalose systémique entraînait une acidification plus faible [27].

Nous avons identifié dans l'épithélium de l'épididyme et du canal déférent de rat, un type de cellules spécialisées dans le transport de protons. Ces cellules acidifiantes présentent une grande quantité de pompes à protons de type vacuolaire (H<sup>+</sup>-ATPase) sur leur membrane plasmique et sur certaines vésicules intracellulaires [8, 9]. Par ailleurs, des études antérieures en histocytochimie ont révélé la présence d'une population distincte de cellules épithéliales qui possèdent une quantité importante d'anhydrase carbonique de type II dans leur cytoplasme [28], indiquant le rôle de ces cellules dans la sécrétion de protons. Une autre anhydrase carbonique, associée à la membrane apicale, l'anhydrase carbonique de type IV, a été également identifiée au niveau des cellules épithéliales de l'épididyme [29]. Enfin, notre équipe a récemment démontré que la pompe à protons et l'anhydrase carbonique de type II sont présentes dans le même type de cellules [8]. Il s'agit des cellules «apicales» ou cellules «étroites» de la tête de l'épididyme, et des cellules «claires» dans le corps et la queue [30-33]. Les morphologies respectives des cellules apicales et des cellules claires sont assez différentes, bien que toutes deux partagent un niveau extrêmement élevé d'activité d'endocytose apicale, comparable à celui des cellules intercalaires du rein [15, 19,

30]. En raison de la présence d'anhydrase carbonique de type II dans l'épididyme, il apparaît important de vérifier si l'inhibiteur de cette enzyme, l'acétazolamide, peut inhiber l'acidification luminale. Les données actuelles semblent contradictoires. En effet, il a été montré que l'acétazolamide inhibe partiellement l'acidification luminale [27], mais une étude ultérieure n'a montré aucun effet sur le pH de l'épididyme [34], probablement en raison des difficultés à traiter in vivo les cellules acidifiantes avec une dose suffisante d'inhibiteur. Toutefois, un traitement antiandrogène (flutamide) a donné lieu à une alcalinisation de l'épididyme [35]. Dans la mesure où les cellules apicales et les cellules claires disposent d'une quantité importante de pompes à protons sur leur membrane apicale, nous avons émis l'hypothèse qu'elles exerçaient une fonction analogue à celle des cellules intercalaires du rein, et qu'elles étaient principalement responsables de la sécrétion luminale de protons dans le système reproducteur mâle. Nous avons étudié le rôle de la H+-ATPase de type vacuolaire dans l'acidification de l'épididyme et du canal déférent par immunolocalisation puis en utilisant une électrode sélective aux protons. L'H+-ATPase de type vacuolaire apparaît comme source principale de l'acidification de l'épididyme et du canal déférent.

# Immunolocalisation de la H<sup>+</sup>-ATPase dans l'épididyme et le canal déférent

Des anticorps spécifiques, dirigés contre deux sous-unités de la H<sup>+</sup>-ATPase (les sous-unités de 31 kDa et 56 kDa), et couplés à un fluorophore ont été utilisés pour localiser la H+-ATPase [8, 9]. Quelques cellules de l'épithélium du canal déférent sont intensément marquées à leur pôle apical. Elles possèdent les caractéristiques morphologiques des cellules étroites. En effectuant un double marquage avec un anticorps dirigé contre l'anhydrase carbonique de type II, nous avons démontré que la H<sup>+</sup>-ATPase et l'anhydrase carbonique de type II sont localisées dans les mêmes cellules [8]. Nous avions déja identifié des cellules similaires dans

notre laboratoire au niveau de l'épithélium de l'épididyme (figure 2) [9]. Dans certaines régions de l'épididyme, près de la moitié des cellules épithéliales est marquée, tandis que, dans le canal déférent, le nombre de cellules contenant la H<sup>+</sup>-ATPase est considérablement moindre.

### Détection d'un flux de protons sensible à la bafilomycine dans le canal déférent

A l'aide d'une électrode sélective aux protons, nous avons mesuré une importante sécrétion de protons dans la lumière tubulaire du canal déférent isolé [8]. La technique consiste à disséquer la portion proximale du canal déférent et à rendre accessible la surface apicale de l'épithélium en effectuant une incision longitudinale (figure 3). Le tissu est alors fixé, sans dissection supplémentaire, au fond d'une boîte de Pétri posée sur la platine d'un microscope inversé. L'électrode sélective aux protons est placée près de la surface de l'épithélium et le débit de protons

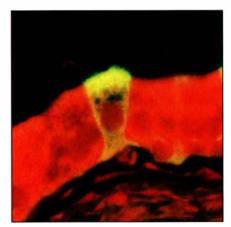


Figure 2. Localisation de la H\*-ATPase dans l'épithélium du système reproducteur mâle. En utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte avec un anticorps dirigé contre la sous-unité de 56 kDa et couplé au fluorophore FITC, nous avons révélé la présence d'une sous-population de cellules intensément marquées (en jaune) au niveau de leur pôle apical. La coloration rouge, qui est non spécifique, est obtenue avec le bleu de Evans.

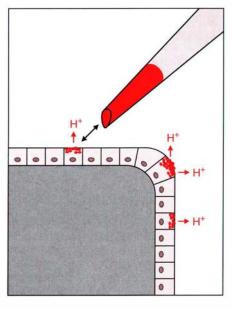


Figure 3. Détection d'un flux apical de protons dans le canal déférent à l'aide d'une électrode sélective. Le canal déférent est disséqué et une incision longitudinale est effectuée afin d'exposer la surface apicale de l'épithélium. Le tissu est ensuite fixé sur un bloc de cire dentaire placé au fond d'une boîte de Pétri. L'électrode sélective est positionnée près de la surface de l'épithélium et une oscillation, perpendiculaire au tissu et d'amplitude de 50 µm, est amorcée. Le pH est mesuré aux deux points d'oscillation extrême et la différence entre ces deux valeurs est convertie en débit de protons. Celui-ci est maximal lorsque l'électrode est située près d'une cellule riche en H+-ATPases.

est mesuré tout au long du tissu. La sécrétion de protons détectée en différents points d'un même canal déférent est variable, indiquant des régions de forte activité acidifiante [8]. Ces régions correspondent probablement à la présence des cellules acidifiantes dont nous avons révélé l'existence par des techniques d'immunofluorescence. On observe, en moyenne, une diminution du débit de protons de 65 % en présence de bafilomycine, l'inhibiteur spécifique de la H+-ATPase, mais cette inhibition peut aller, dans certains cas, jusqu'à 80 %. En revanche, nous n'avons détecté, jusqu'à présent, aucun effet de l'amiloride, l'inhibiteur de l'échangeur Na+/H+, sur le débit de protons. Ces résultats démontrent le rôle majeur de la H+-ATPase dans les processus d'acidification luminale au niveau du canal déférent.

#### Conclusion

Le maintien d'un milieu acide dans la lumière de l'épithélium de l'épididyme et du canal déférent est un élément clé du processus de maturation finale des spermatozoïdes et de l'état de sommeil dans lequel ils sont maintenus. Cet état de dormance apparaît essentiel à l'acquisition d'une mobi-

lité adéquate des spermatozoïdes liée à l'alcalinisation par le liquide séminal au moment de l'éjaculation. En conséquence, un défaut dans les processus d'acidification luminaux au niveau de l'épididyme et du canal déférent pourrait conduire à une maturation imparfaite des spermatozoïdes et être responsable de certains cas de stérilité. Les cellules acidifiantes que nous avons identifiées dans ces épithéliums représentent certainement une cible fort intéressante lors de la mise en œuvre de stratégies nouvelles destinées à moduler leur capacité d'acidification et à contrôler ainsi la fécondité masculine |

# RÉFÉRENCES •

- 1. Carr DW, Usselman MC, Acott TS. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol Reprod* 1985; 33:588-95.
- 2. Levine N, Marsh DJ. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolytes transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J Physiol (Lond)* 1971; 213: 557-75.

## RÉFÉRENCES •

- 3. Hinton BT, Palladino MA. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid micro-environment. *Microsc Res Tech* 1995; 30: 67-81.
- 4. Acott TS, Carr DW. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid. II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol Reprod* 1984; 30: 926-35.
- 5. Babcock DF, Rufo GA, Lardy HA. Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1327-31.
- 6. Gatti JL, Chevrier C, Paquignon M, Dacheux JL. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993; 98: 439-49.
- 7. Jouannet P, Serres C. Mouvement normal et pathologique du spermatozoïde humain. *Med Sci* 1995; 11: 555-62.
- 8. Breton S, Smith P, Lui B, Brown D. Acidification of male reproductive tract by a proton-pumping H\*-ATPase. *Nature Med* 1996; 2: 470-2.
- 9. Brown D, Lui B, Gluck S, Sabolic I. A plasma membrane proton ATPase in specialized cells of rat epididymis. *Am J Physiol* 1992; 263: C913-6.
- 10. Brown D, Breton S. Mitochondria-rich, proton pumping epithelial cells. *J Exp Biol* 1996; 199: 2345-58.
- 11. Brown D, Hirsch S, Gluck S. An H<sup>+</sup>ATPase is present in opposite plasma membrane omains in subpopulations of kidney epithelial cells. *Nature* 1988; 331: 622-4.
- 12. Madsen KM, Tisher CC. Structure-function relationships along the distal nephron. *Am J Physiol* 1986; 250: F1-15.
- 13. Schuster VL. Function and regulation of collecting duct intercalated cells. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 267-88.
- 14. Schwartz GJ, Al-Awqati Q. Carbon dioxide causes exocytosis of vesicles containing H<sup>+</sup> pumps in isolated perfused proximal and collecting tubules. *J Clin Invest* 1985; 75: 1638-44.
- 15. Brown D, Weyer P, Orci L. Non-clathrin coated vesicles are involved in endocytosis in kidney collecting duct intercalated cells. *Anat Rec* 1987; 218: 237-42.
- 16. Madsen KM, Verlander JW, Tisher CC. Morphological adaptation of the collecting duct to acid-base disturbances. *Kidney Int* 1991; 40 (suppl 33): S57-63.
- 17. Van Adelsburg J, Al-Awqati Q. Regulation of cell pH by Ca<sup>2+</sup>-mediated exocytotic insertion of H+ATPases. *J Cell Biol* 1986; 102:1638-45.
- 18. Lencer WI, Weyer P, Verkman AS, Ausiello DA, Brown D. FITC-dextran as a

- probe for endosome function and localization in the kidney. *Am J Physiol* 1990; 258: C309-17.
- 19. Schwartz GJ, Barasch J, Al-Awqati Q. Plasticity of functional epithelial polarity. *Nature* 1985; 318: 368-71.
- 20. Bastani B, Purcell H, Hemken P, Trigg D, Gluck S. Expression and distribution of renal vacuolar proton-translocating adenosine triphosphatase in response to chronic acid and alkali loads in the rat. *J Clin Invest* 1991; 88: 126-36.
- 21. Alper SL, Natale J, Gluck S, Lodish HF, Brown D. Subtypes of intercalated cells in rat kidney collecting duct defined by antibodies against erythroid band 3 and renal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989: 86: 5429-33.
- 22. Sabolic I, Brown D, Verbavatz JM, Kleinman J. H\*-ATPases of renal cortical and medullary endosomes are differentially sensitive to Sch-28080 and omeprazole. *Am J Physiol* 1994; 266: F868-77.
- 23. Stone DK, Seldin DW, Kokko JP, Jacobsen HR. Mineralocorticoid modulation of rabbit medullary collecting duct acidification. A sodium-independent effect. *J Clin Invest* 1983; 72: 77-83.
- 24. Ikeda M, Iyori M, Yoshitomi K, Hayashi M, Imai M, Saruta T, Kurokawa K. Isoproterenol stimulates Cl<sup>-</sup> current by a Gs proteinmediated process in beta-intercalated cells isolated from rabbit kidney. *J Membr Biol* 1993; 136: 231-41.
- 25. Stetson DL, Steinmetz PR. Role of membrane fusion in  $\mathrm{CO}_2$  stimulation of proton secretion by turtle bladder. Am J Physiol 1983; 245: C113-20.
- 26. Stone DK, Seldin DW, Kokko JP, Jacobson HR. Anion dependence of medullary collecting duct acidification. *J Clin Invest* 1983; 71: 1505-8.
- 27. Au CL, Wong PY. Luminal acidification by the perfused rat cauda epididymidis. J *Physiol (Lond)* 1980; 309: 419-27.
- 28. Cohen JP, Hoffer AP, Rosen S. Carbonic anhydrase localization in the epididymis and testis of the rat: histochemical and biochemical analysis. *Biol Reprod* 1976; 14: 339-46.
- 29. Parkkila S, Parkkila AK, Kaunisto K, Waheed A, Sly WS, Rajaniemi H. Location of a membrane-bound carbonic anhydrase isoenzyme (CA IV) in the human male reproductive tract. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:751-7.
- 30. Moore HD, Bedford JM. The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymus before and after castration. *Anat Rec* 1979; 193: 313-27.
- 31. Moore HD, Bedford JM. Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat Ree* 1979; 193: 293-311.

- 32. Reid BL, Cleland KW. The structure and function of the epididymis. I. The histology of rat epididymis. *Aust J Zool* 1957; 5: 223-46.
- 33. Sun EL, Flickinger CJ. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *Am J Anat* 1979; 154: 27-55.
- 34. Caflisch CR, DuBose TDJ. Direct evaluation of acidification by rat testis and epididymis: role of carbonic anhydrase. *Am J Physiol* 1990; 258: E143-50.
- 35. Caflisch CR. Effect of a nonsteroidal antiandrogen, flutamide on intraluminal acidification in rat testis and epididymis. *Andrologia* 1993; 25: 363-7.

### **Sylvie Breton**

Ph. D., Instructor in medicine, Harvard Medical School, Renal Unit, Massachusetts General Hospital East, 149 13th Street, Charlestown, MA 02129, États-Unis.

#### **Peter Smith**

Ph. D., directeur du Biocurrent research center, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, États-Unis.

### **Dennis Brown**

Ph. D., Associate professor, Harvard Medical School, Renal Unit and Department of Pathology, Massachusetts General Hospital East, États-Unis.



TIRÉS À PART

S. Breton.