



**THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ  
DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

**SCIENCES DE LA VIE**

Présentée par **Christine PIETREMENT**

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

**Hétérogénéité physiologique de l'épithélium de l'épididyme : sécrétion de protons via la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire dans les cellules claires et transport d'eau et de solutés via l'aquaporine 9 dans les cellules principales.**

Soutenue le 16 octobre 2006, devant le jury composé de :

<b>Philippe Birembaut</b>	<b>Examineur</b>
<b>Sylvie Breton</b>	<b>Codirecteur</b>
<b>Pierre Cochat</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Jean-Louis Dacheux</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Jacques Motte</b>	<b>Président du jury</b>
<b>Philippe Rieu</b>	<b>Codirecteur</b>

## **Remerciements**

La rédaction de cette thèse et sa soutenance marquent la fin d'une aventure à plusieurs facettes : aventure dans le monde de la recherche, qui ne devrait pas en rester là, aventure de l'autre côté de l'atlantique, aventure familiale. Différentes personnes m'ont accompagnées tout au long de ce parcours et je tiens ici à les en remercier.

Merci à Monsieur Philippe Birembaut qui a accepté de faire partie de la phase finale de cette aventure en devenant membre du jury.

Merci à Monsieur Jean-Louis Dacheux d'avoir accepté d'être rapporteur. Quand la question de la composition du jury s'est posée, Sylvie Breton vous a désigné d'office comme le spécialiste français de l'épididyme.

Merci à Pierre Cochat d'avoir accepté d'être rapporteur. J'apprécie le soutien que vous m'avez témoigné depuis mon retour des Etats-Unis.

Merci à Jacques Motte d'avoir accepté la présidence du jury. Vous avez été à l'origine de cette aventure en mettant en œuvre les conditions qui m'ont permis de quitter le service pendant deux ans, sans l'angoisse du retour. Depuis plus d'un an maintenant, j'apprécie votre confiance et votre souci de mon travail.

Merci à Philippe Rieu d'avoir accepté d'être responsable de cette thèse et de m'avoir lancée outre-atlantique. C'est toi qui m'a mise en contact avec la Renal Unit/Program in Membrane Biology et m'a permis de pénétrer dans le monde bouillonnant de la recherche biomédicale américaine. Merci pour tes critiques lors de la rédaction de ce travail.

Merci à Sylvie Breton, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour tout ce que tu m'as apporté. Tu m'as acceptée dans ton laboratoire malgré mon expérience limitée de recherche, un DEA. Tu m'as chaleureusement accueillie au sein de ton équipe, et mis en place les moyens de ma formation. Tu m'as guidée tout au long de ces deux années de recherche qui ont pu aboutir à la rédaction de cette thèse. Tu m'as soutenue et aidée dans les difficultés de la vie quotidienne. Tu as

accepté d'être co-directeur de cette thèse et par la-même de faire le voyage jusqu'à Reims pour la soutenance. Merci pour ton aide lors de la rédaction.

Merci à Dennis Brown, directeur de l'ensemble de l'unité Program in Membrane Biology. Votre rigueur, votre enthousiasme, votre proximité vis à vis de chacun des membres du laboratoire sont remarquables. Votre énergie à construire une équipe soudée, très performante et formidablement équipée constitue un modèle que je n'oublierai pas. Merci de ne m'avoir fait découvrir que quelques mois seulement avant mon départ que vous étiez bilingue.

Merci à Richard Bouley, Margaret Mc Laughlin, Mary McKee et Robert Tyszkowski pour le témoignage de leur affection et leurs conseils. Merci à Mireille Marsolais pour son travail et pour sa gentillesse. Merci à Marianne James, Claudia Silberstein, Nicolas Da Silva, Valérie Beaulieu pour leur travail et leur aide.

Merci à Martine Gorlier, Pnina Abir-Am, Alan Fleischman, Thomas et Malgorzata Hedderick, Deidre et Naill Robinson pour leur affection et leur aide au cours de ces deux années, ils m'ont permis de constituer un réseau presque familial en terre étrangère.

Merci au Comité Américain et en particulier à son président Hale Sturges. Sans cette formidable association qui perpétue la mémoire et permet la réalisation de projets, cette aventure n'aurait pas pu se concrétiser. J'ai bénéficié plusieurs fois de votre aide et je vous en suis extrêmement reconnaissante.

Merci au conseil régional de Champagne-Ardenne et en particulier à Monsieur Gérard Berthiot qui a contribué aussi à la réalisation de ce projet de recherche et à sa durée.

Merci à Augustin et Aurèle de nous avoir suivi dans cette aventure sans que nous, vos parents, nous ne vous ayons vraiment laissé le choix. Vous êtes vraiment des enfants super cool ! Merci à toi, Gilles, d'être auprès de moi. Merci d'avoir enduré les périodes de séparation. Merci pour tous nos bonheurs bostoniens. Merci pour ton soutien lors de la rédaction de cette thèse. Cette aventure est

devenue notre aventure à tous les quatre au cours de laquelle nous avons engrangé des tonnes de souvenirs.

Merci à mes parents qui m'ont toujours donné le maximum de ce qu'ils pouvaient. Vous m'avez épaulée dans les moments difficiles et toujours été un exemple dans le travail.

# Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	10
<b>1-Introduction</b> .....	13
1-1 Histologie de l'épididyme.....	14
1-2 Origine embryologique de l'épididyme.....	20
1-3 L'équilibre acido-basique dans l'épididyme.....	27
1-4 H <sup>+</sup> -ATPases vacuolaires.....	35
1-5 Transport de l'eau dans l'appareil reproducteur masculin.....	49
1-6 Aquaporines.....	51
<b>2- Questions posées et objectifs</b> .....	64
<b>3- Matériels et méthodes</b> .....	68
<b>4- Résultats</b> .....	80
4-1 Description des localisations différentes des isoformes de plusieurs sous-unités de la H <sup>+</sup> ATPase vacuolaire dans l'épididyme de rat.....	81
4-2 L'aquaporine 9 est une protéine de type PDZ qui interagit avec NHERF1 et est activée par l'AMP cyclique.....	86
4-3 Interaction entre CFTR et l'aquaporine 9.....	90
<b>5-Discussion</b> .....	94
<b>6-Conclusion et perspectives</b> .....	109

## Abréviations

ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AE	Echangeur d'anions
AMP	Adénosine monophosphate
AQP	Aquaporine
ARN	Acide ribonucléique
ARNO	<i>ADP-ribosylation factor nucleotide site opener</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CA	Anhydrase carbonique
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
ER	Récepteur des oestrogènes
GMP	Guanosine monophosphate
GST	Glutathion S-transférase
GTPase	Guanosine triphosphatase
MERM	Merlin Ezrin Radixin Moesin
MIP	<i>Major intrinsic protein</i>
NBC	Na bicarbonate cotransporteur
NHE	Echangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
NHE3	Echangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> de type 3
NHERF	<i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger regulatory protein</i>
Npt2a	<i>Sodium-dependent phosphate transporter 2a</i>
PDZ	PSD-95, <i>Drosophila disc large protein</i> , ZO-1s
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
ROMK	<i>Renal outer medullary potassium channel</i>
SAC	Adenylate cyclase soluble
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
V-ATPase	H <sup>+</sup> -ATPase vacuolaire

## Résumé

L'épididyme est l'organe où les spermatozoïdes deviennent matures et où ils sont stockés dans un état quiescent. La lumière de l'épididyme est limitée par un épithélium hétérogène composé de deux principaux types cellulaires aux fonctions distinctes et complémentaires. Un pH intra-luminal acide par rapport au plasma est créé par la réabsorption des bicarbonates par les cellules principales dans les parties proximales, et par la sécrétion de protons, par les cellules claires via la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, dans les zones distales. Les cellules principales interviennent dans les mouvements d'eau et de solutés, via l'aquaporine 9, régulant la concentration du sperme. Nous montrons la spécificité de la composition en sous-unités, et en isoformes, de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire exprimée à la membrane apicale des cellules claires et en intracellulaire dans les deux types cellulaires. Nous montrons que la réabsorption du glycérol par l'aquaporine 9 est stimulée par l'AMP cyclique. Cette stimulation pourrait être en relation avec les interactions, que nous mettons en évidence, de l'aquaporine 9 avec NHERF1, et de l'aquaporine 9 avec CFTR. Au delà de l'intérêt d'une meilleure connaissance de la physiologie de l'épididyme, ce travail permet d'aborder la physiopathologie de la stérilité dans la mucoviscidose, et des phénomènes cellulaires généraux : la relation structure/fonction de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire et la régulation de l'aquaporine 9.



## Summary

Sperm are stored in a dormant state and become mature in the epididymis. The epididymis epithelium is heterogenous, and is composed of two main cell types with distinct but complementary functions. Acidic pH compared to plasma is established through bicarbonate reabsorption in the proximal epididymis by principal cells, and in the distal parts by clear cells. Protons secretion occurs in clear cells via the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. Principal cells are involved in water and solute movements, via aquaporin 9, and regulate sperm concentration. Here we show the specificity of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit and isoform combination, expressed in the clear cells apical plasma membrane and in the cytosol of both cell types cytosol. We show cAMP stimulation of the aquaporin 9-dependent glycerol reabsorption. This stimulation might be related to the interaction between aquaporine 9 and NHERF1 and between aquaporine 9 and CFTR, which we revealed as part of this work. Through this study on epididymis physiology, the question of cystic fibrosis sterility is studied but general cellular functions are also explored : structure/function of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, and regulation of aquaporin 9.

## **Avant-Propos**

L'épididyme, qui appartient à l'appareil reproducteur masculin, se situe après le testicule et avant l'abouchement des voies prostatiques. Ce petit organe n'a, jusqu'à présent, été l'objet que de peu d'attention par les équipes de recherche. Seulement 12752 articles sont référencés sous ce mot clef dans PubMed contre 68275 avec le mot testicule et 74112 avec le mot prostate. Le fait que l'épididyme ne soit que très exceptionnellement le siège de tumeur maligne explique sans doute en partie ce manque d'engouement, mais cette particularité en fait aussi un de ses intérêts.

L'épididyme, tout autant que le testicule, est essentiel dans la fonction de reproduction de l'appareil génital masculin. Les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité et leur capacité de fécondation dans la lumière de l'épididyme [1-3]. Ainsi, l'incapacité de l'épididyme à fournir un environnement adéquat pour ce processus de maturation du sperme a des conséquences importantes sur la fertilité. Parmi l'ensemble des couples qui consultent pour stérilité, 30% le sont en raison d'une infertilité masculine. Entre 30 et 50% de ces infertilités masculines sont d'origine idiopathique. Bien qu'un nombre significatif de cas semblent liés à une anomalie génétique [4], des facteurs environnementaux sont aussi en cause [5]. La baisse de la fertilité, certes discutée, de la population masculine au cours des dernières décades pourrait s'expliquer par des anomalies du fonctionnement de l'épididyme secondaires à la pollution de l'environnement [4, 6]. Parallèlement à l'azoospermie ou l'oligospermie, la production de spermatozoïdes ayant des fonctions réduites, incluant une motilité basse (asthénospermie) et une interaction faible avec l'ovocyte est une cause majeure d'infertilité masculine [7]. Des anomalies des voies spermatiques et de l'épididyme responsables de stérilité sont décrites de façon quasi constante dans la mucoviscidose. Une meilleure connaissance de la physiologie de l'épididyme pourra permettre d'avancer dans la compréhension de ces phénomènes et leur prise en charge.

Actuellement les contraceptifs les plus efficaces doivent être pris par les femmes par voie générale. Des essais de développement d'une contraception masculine, par voie générale, basés sur une manipulation hormonale, sont actuellement en cours. Dans cette optique contraceptive, l'épididyme est particulièrement intéressant car c'est une cible thérapeutique potentielle pour le développement d'une contraception masculine sans modifications hormonales.

Dans une optique vétérinaire, une meilleure compréhension des phénomènes qui interviennent lors du passage des spermatozoïdes dans l'épididyme est une étape indispensable à l'amélioration et au contrôle de la qualité du sperme pour la sélection animale [8].

L'intérêt d'une meilleure connaissance de cet organe est donc évident, mais beaucoup de progrès sont encore à faire dans la compréhension de sa physiologie. La physiologie rénale est l'un des sujets d'étude du laboratoire Program in Membrane Biology and Nephrology Division du Massachusetts General Hospital à Boston, et c'est la similitude entre certains fonctionnements cellulaires, expliquée en partie par une origine embryologique commune, qui y a permis le développement d'une recherche sur l'épididyme. Alors que le rein est essentiel dans le maintien de l'équilibre acido basique de l'ensemble de l'organisme, il s'avère que la régulation de l'équilibre acido basique dans la lumière de l'épididyme est essentielle à la maturation et au stockage des spermatozoïdes dans l'épididyme. Cette régulation est assurée en partie dans les deux organes par une même molécule la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire. Tout comme dans le rein, des canaux à eau appelés aquaporines sont exprimés dans l'épididyme. Ces aquaporines permettent d'aboutir à la concentration des spermatozoïdes et d'ajuster la teneur en eau de la lumière dans la partie distale de l'épididyme. L'aquaporine 9 est le canal à eau le plus abondant dans l'épithélium de l'épididyme.

L'introduction rappelle l'histologie, l'origine embryologique de l'épididyme, les connaissances actuelles sur la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire et les aquaporines dans l'épididyme. Les expériences dont les résultats sont exposés dans le chapitre 4 ont eu pour but d'avancer dans la compréhension du fonctionnement physiologique de l'épididyme. Deux molécules ont été étudiées : la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire en analysant sa composition particulière dans l'épithélium de l'épididyme, et l'aquaporine 9 en analysant la régulation de sa fonction et ses interactions avec d'autres protéines.

## **1-Introduction**

## 1-1 Histologie de l'épididyme

### 1-1-1 Localisation-Structure

Les voies excrétrices de l'appareil reproducteur masculin sont composées de plusieurs tissus différents incluant les canaux efférents, l'épididyme et le canal déférent. L'épididyme, conduit unique extrêmement tortueux, qui relie les canaux efférents au canal déférent, est l'un des composants majeurs de ce système d'excrétion. Il peut mesurer chez les mammifères de 3 à 80 mètres [9]. Chez l'homme, l'épididyme mesure environ 3-4 cm de long mais le canal qu'il contient mesure une fois déroulé 6 mètres. Ce long canal flexueux, s'étend du bord postéro-supérieur du testicule, classiquement en cimier de casque, jusqu'au pôle inférieur du testicule ou il devient le canal déférent (Figure 1).

La partie proximale de l'épididyme est reliée au testicule par les canaux efférents. Puis on distingue trois parties : la tête (caput), la plus antérieure, le corps (corpus) et la queue (cauda). Le segment initial, une zone de transition bien individualisée dans certaines espèces, par exemple chez la souris, est interposée entre les canaux efférents et la tête. La tête, le corps et la queue sont également sous-segmentés en parties distinctes par leur microenvironnement, formant des zones hautement spécialisées selon leurs fonctions de sécrétion, d'absorption [10]. Dix segments sont ainsi décrits dans l'épididyme de souris que l'on peut regrouper en six entités [11], trois zones de sécrétion distinctes sont décrites à partir de leur protéome chez l'étalon [12]. Sept segments sont décrits chez l'homme : canaux efférents, tête proximale, tête distale, corps proximal, corps distal, queue proximale, et la queue distale [13]. Le canal déférent fait suite à la portion caudale de l'épididyme; c'est un canal régulier, d'environ 0.5 cm de diamètre, de consistance très dure. Il chemine au dessus et en arrière de l'épididyme, dans un ensemble d'éléments qui constituent le cordon spermatique.

L'épididyme est constitué d'un cylindre de muscle lisse bordé par un épithélium pseudo-stratifié (Figure 2). L'épaisseur de la paroi musculaire va en croissant de l'extrémité proximale vers l'extrémité distale. Elle passe d'une seule couche circulaire, à trois couches disposées de la même façon que dans le canal déférent. A l'extrémité distale, le muscle lisse est richement innervé par le système nerveux sympathique.

Figure 1 [14]

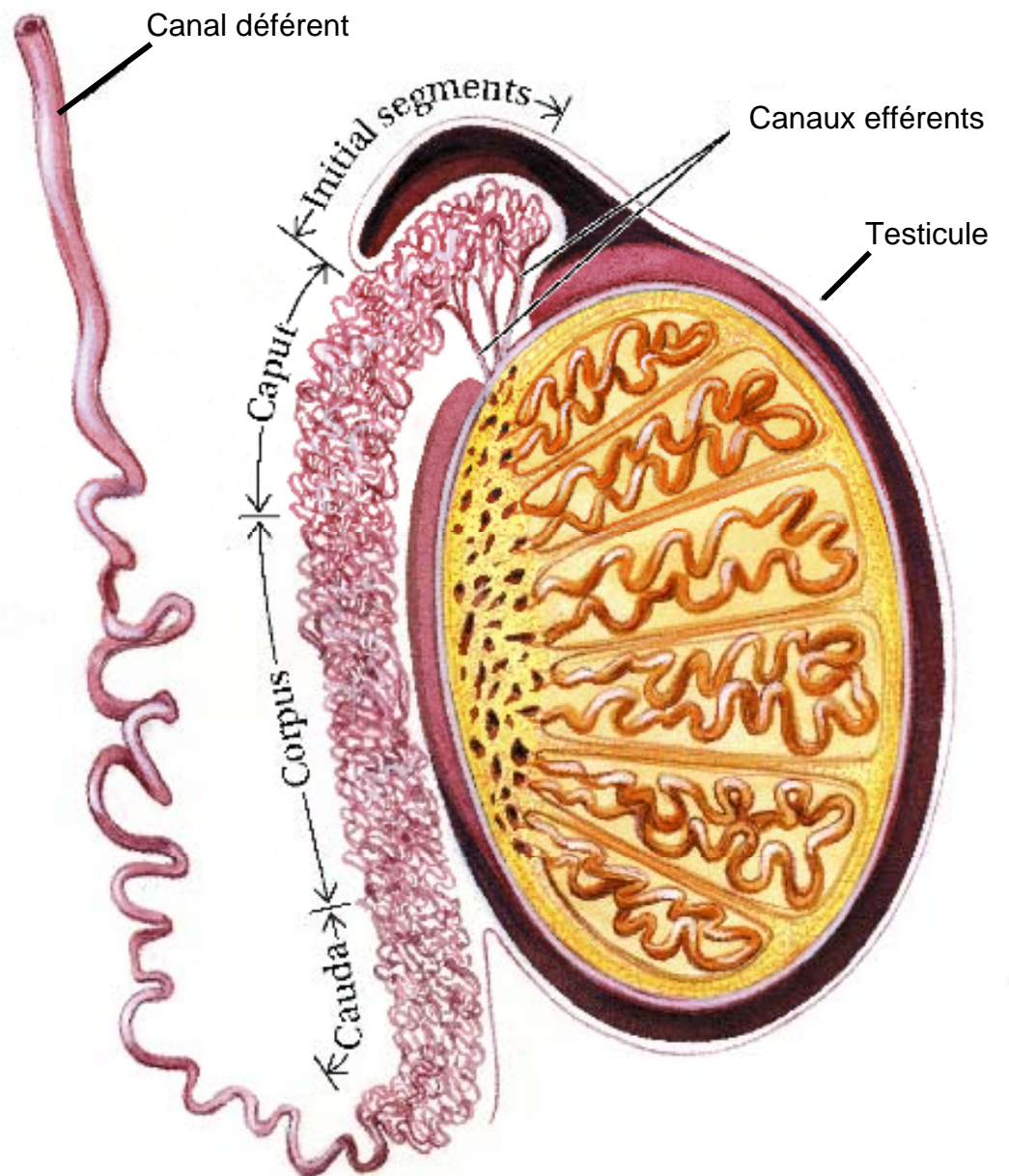
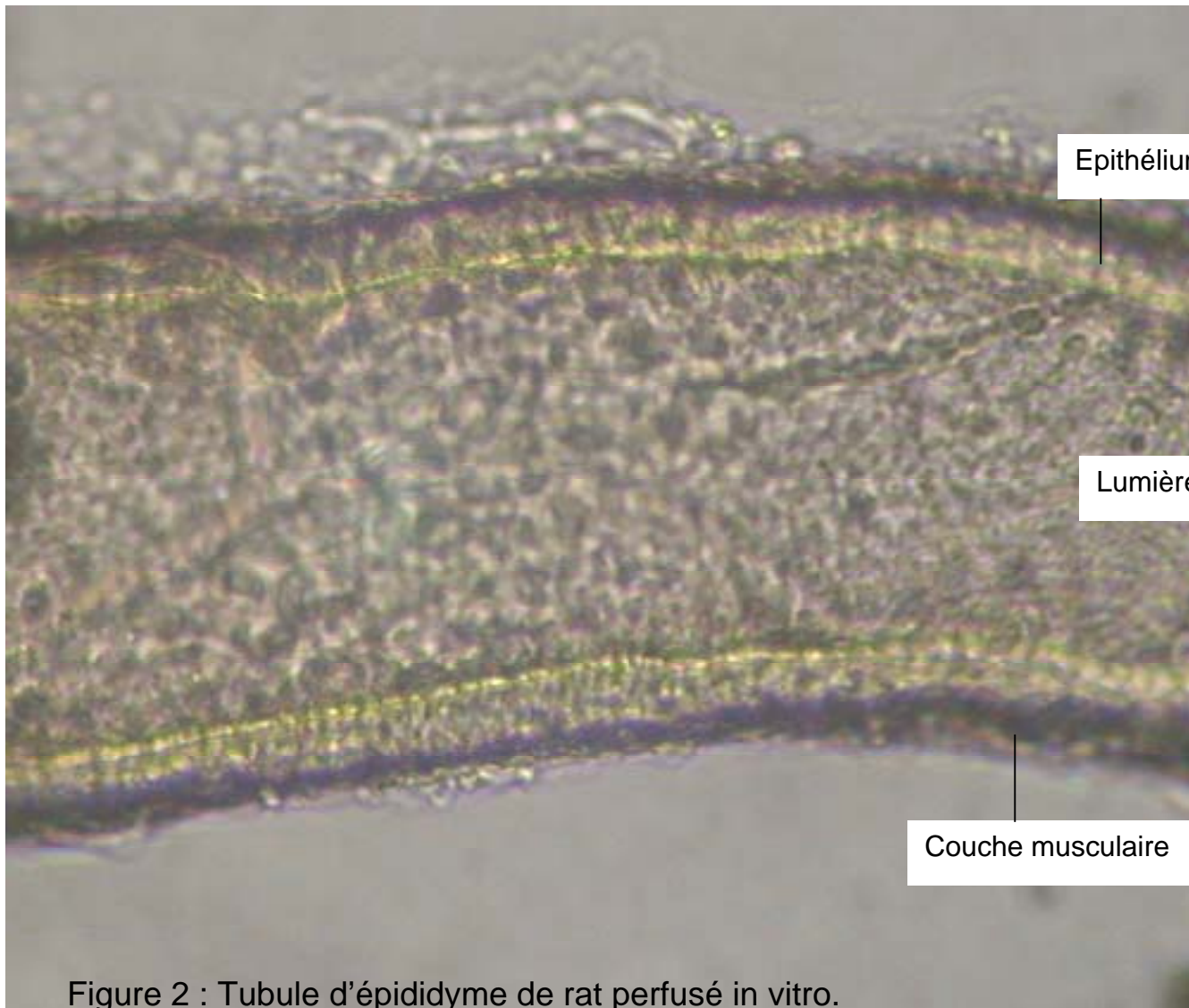


Figure 1 : Schéma de l'épididyme. *Initial segments* = segments initiaux, *caput* = tête, *corpus* = corps, *cauda*=queue. D'après la référence 14.

Figure  
2





### 1-1-2 L'épithélium

Le revêtement épithélial de l'épididyme subit une transition graduelle passant de la forme proximale cylindrique, haute, pseudo-stratifiée, à la forme distale plus basse, pseudo-stratifiée. Sa composition est hétérogène, on y distingue quatre types cellulaires [15-18]. La spécificité de chaque cellule va concourir à l'établissement d'un milieu optimal pour les spermatozoïdes.

Les **cellules principales** sont prépondérantes et localisées tout au long du tube (Figure 3). Elles sont de grande taille, en colonne, très actives en terme de transport et de sécrétion.

Dans la plupart des espèces, les **cellules étroites** et les **cellules claires** sont intercalées entre les cellules principales. Chez la souris, parcontre, il existe des rangées de cellules claires. Les cellules étroites sont relativement peu nombreuses et sont localisées dans les segments initiaux. Les cellules claires, qui sont plus nombreuses que les cellules étroites, sont situées dans la tête, le corps et la queue. Il s'agit de grandes cellules prenant toute la hauteur de l'épithélium. Elles contiennent de nombreuses vésicules dans leur région apicale, des lysosomes à leur partie médiane et des vésicules contenant des gouttelettes lipidiques (Figure 3).

Les **cellules basales** sont situées à la base de l'épithélium et ne sont pas en contact direct avec la lumière. Elles sont de petite taille, allongées, avec des projections vers les cellules basales adjacentes et vers la lumière (Figure 3). Elles pourraient avoir un rôle dans l'élimination des radicaux libres, des produits de dégradation des spermatozoïdes, et interagir avec le système immunitaire.

Les **cellules halo** sont présentes tout au long de l'épididyme, dans des zones variées de l'épithélium, mais sans l'occuper dans toute sa hauteur. Ces cellules font partie du système immunitaire, il peut s'agir de lymphocytes T, B, de monocytes ou de macrophages.

### 1-1-3 Fonctions de l'épididyme

Les cellules principales, étroites et claires ont un rôle essentiel dans l'établissement d'un environnement optimal pour la maturation et le stockage des spermatozoïdes [9, 19-22]. Ces cellules épithéliales créent un micro environnement dans lequel les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité, leur capacité de fécondation

Figure 3 [23]

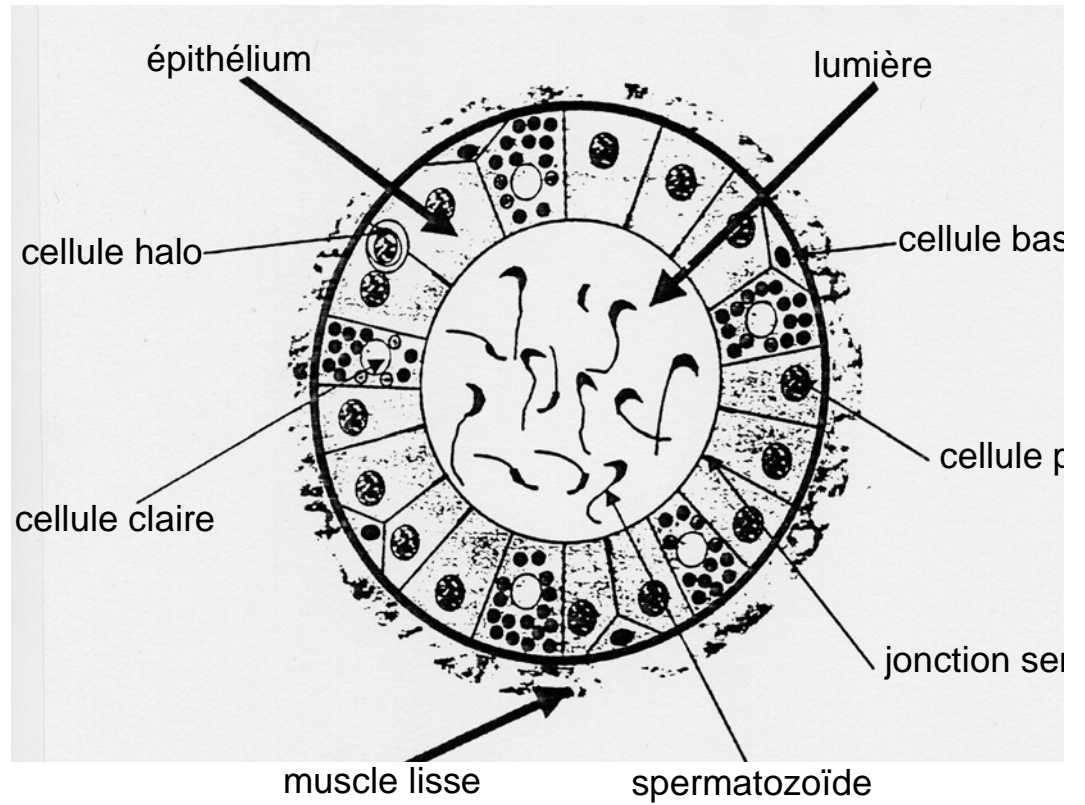


Figure 3 : Schéma de l'épithélium de l'épididyme. D'après la référence 23.

des ovocytes, et dans lequel ils sont stockés dans un mode quiescent [1, 3, 9, 13, 19, 21].

Dans les canaux efférents, les mouvements ciliaires des cellules réparties le long de la lumière assurent le transport du sperme [20]. Dans l'épididyme, chez l'homme, la durée du **transport** des spermatozoïdes peut atteindre douze jours. Leur progression est sous la dépendance de la pression intra-luminale qui décroît de la tête à la queue et des contractions des cellules musculaires lisses de la tunique musculo-conjonctive. Au cours du réflexe éjaculatoire, ils sont émis par contractions adrénérurgiques de la musculature.

Le **stockage** des spermatozoïdes s'effectue dans la partie distale de l'épididyme. Dans la plupart des espèces, les spermatozoïdes sont potentiellement mobiles mais en réalité immobiles dans la queue [24]. La composition ionique, le pH, la présence de macromolécules comme l'immobiline permettent l'établissement d'un état de dormance du sperme [25, 26]. Les spermatozoïdes qui ne sont pas éjaculés s'altèrent en vieillissant, puis sont lysés et phagocytés.

La différenciation finale des spermatozoïdes a lieu en dehors des gonades, dans l'épididyme. Ces dernières étapes de **maturation** ne sont pas sous le contrôle du génome des cellules germinales, mais c'est l'interaction des spermatozoïdes avec l'environnement particulier de la lumière de l'épididyme qui est responsable de ces dernières phases [1-3, 8-10, 27]. Cet environnement favorable est créé par les cellules étroites, claires et principales [9, 19-22]. Ce processus de maturation est un phénomène actif en ce sens que les spermatozoïdes doivent être exposés aux différentes parties de l'épididyme pour devenir matures. Il a été proposé que différentes protéines spécifiquement produites par les cellules principales de l'épididyme seraient essentielles dans ce processus de maturation [28, 29]. La mobilité des spermatozoïdes au cours de la traversée de l'épididyme a été évaluée par des analyses quantitatives (CASA : Computer Assisted Sperm Analysis) et a permis de montrer une acquisition progressive de cette motilité du sperme entre la tête et la queue de l'épididyme [30, 31]. De même des prélèvements de sperme à différents endroits de l'épididyme suivis d'essais de fécondation ont montré que les spermatozoïdes acquièrent cette capacité fécondante au cours de leur passage dans l'épididyme [32, 33]. Le nombre total de protéines sécrétées par l'épithélium de l'épididyme a pu être évalué par des techniques de protéomique [12, 34, 35]. Ces protéines sont caractérisées par une restriction spatiale de leur sécrétion. Ce

phénomène est, en partie, à l'origine de la modification continue de la composition du fluide de l'épididyme au cours de son cheminement dans cet organe. Ainsi différentes zones sont présentes dans l'épididyme permettant de créer cet environnement particulier essentiel à la bonne maturation du sperme. Chaque zone exprime un groupe particulier de gènes ou de famille de gènes, ce qui indique qu'elles ont des rôles complémentaires mais distincts et hautement régulés, dans la maturation, le transport et le stockage du sperme. Cette régionalisation est présente dans toutes les espèces étudiées [8, 36]. Chez l'homme, la sécrétion et la composition protéique du contenu de l'épididyme ne sont pas aussi strictement régionalisées comparativement à d'autres espèces de mammifères. La régionalisation y est plus subtile. Il s'agit de modulation de l'activité sécrétoire plutôt que de la présence ou l'absence de protéines spécifiques de certaines régions [37]. Bien que certaines étapes de ces processus ainsi que des molécules aient été identifiées, beaucoup d'inconnu persiste.

## **1-2 Origine embryologique de l'épididyme [38]**

L'origine embryologique de l'épididyme est étroitement liée à celle du rein. En effet, si sur le plan fonctionnel l'appareil génital et l'appareil urinaire peuvent être divisés en deux parties entièrement distinctes - l'appareil urinaire qui excrète les produits de déchets et l'eau en excès par l'intermédiaire du système tubulaire complexe du rein, et l'appareil génital qui assure la continuité de l'espèce humaine en produisant et stockant les cellules germinales - sur le plan embryologique et anatomique, cependant, les deux appareils interfèrent. Tous deux se développent aux dépens d'une crête commune formée par la prolifération du mésoblaste le long de la paroi postérieure de la cavité abdominale, le mésoderme intermédiaire (Figure 4).

### **1-2-1 Une origine commune avec le rein**

Pendant la vie intra-utérine il se forme trois appareils rénaux différents qui se chevauchent légèrement dans le temps : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros ou rein définitif.

Figure 4 [38]

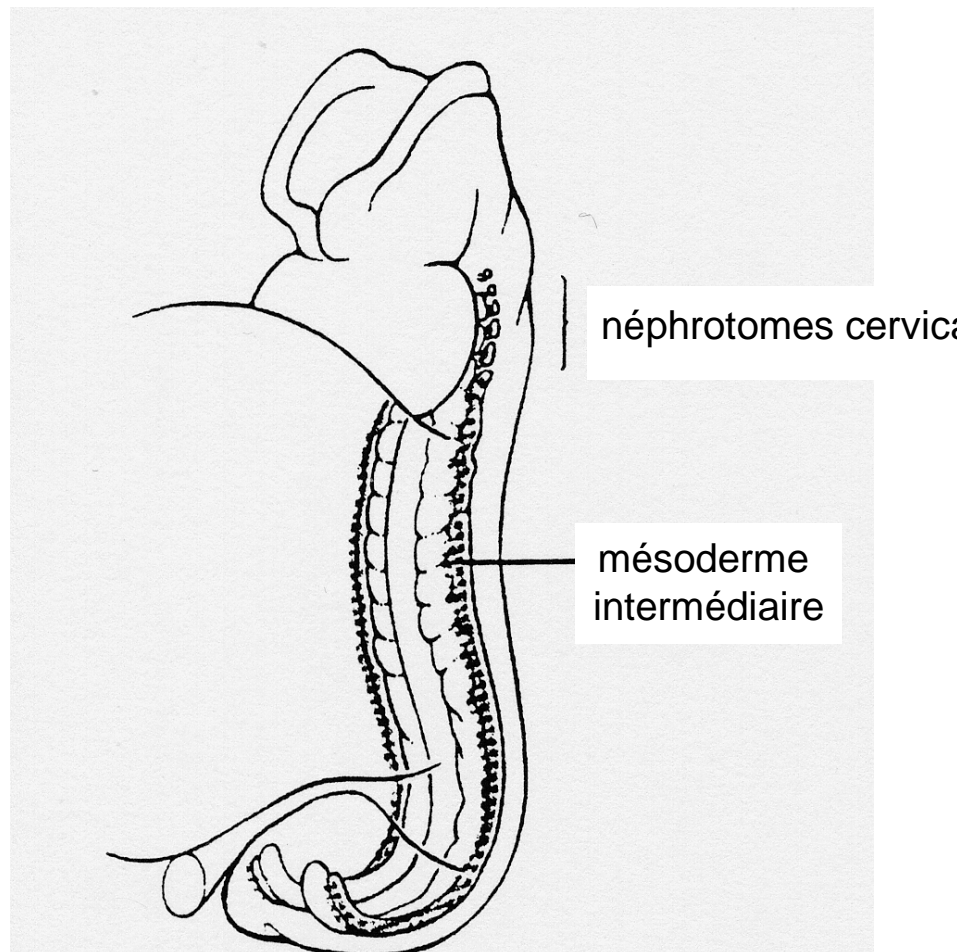


Figure 4 : Schéma d'un embryon humain de 23 jours. Le mésoderme intermédiaire est à l'origine de l'appareil urinaire et de l'appareil génital. Le pronéphros est composé de néphrotomes cervicaux non fonctionnels. D'après la référence 38.

### 1-2-1.a Le pronéphros

Dans l'espèce humaine, le pronéphros est représenté par 7 à 10 néphrotomes cervicaux, non fonctionnels (Figure 4). Les premiers apparus sont déjà disparus lors de la formation des derniers d'entre eux. La régression de ces néphrotomes est complète à la fin de la quatrième semaine. Les structures suivantes à se mettre en place dans le mésoderme intermédiaire sont le mésonéphros et les conduits mésonéphriques associés (Figure 5).

### 1-2-1.b Le mésonéphros et les conduits mésonéphriques

Au début de la quatrième semaine les premiers tubules du mésonéphros font leur apparition. Environ quarante tubules mésonéphriques sont produits en une suite cranio-caudale avec une régression progressive des tubules crâniens au cours de la différenciation des tubules caudaux. Ces tubules mésonéphriques se différencient en unités excrétrices ressemblant à une version simplifiée du néphron de l'adulte.

Les conduits mésonéphriques apparaissent pour la première fois aux environs du jour 24, sous la forme d'une paire de cordons solides qui se condensent dans le mésoderme intermédiaire de la région thoracique dorso-latéralement aux tubules mésonéphriques en formation (Figure 5). Ces cordons croissent en direction caudale, par prolifération et migration des cellules disposées à leur extrémité caudale. Lorsque les cordons atteignent la région lombaire basse, ils s'écartent du mésoderme intermédiaire et se développent alors vers les parois ventro-latérales du cloaque auquel ils fusionnent au jour 26. Cette région de fusion deviendra une partie de la paroi postérieure de la future vessie. Au moment où ils s'unissent au cloaque, les cordons commencent à se creuser à leur extrémité distale, ce processus de canalisation progresse en direction crâniale transformant les cordons en conduits mésonéphriques ou canaux de Wolff.

L'extrémité latérale de chaque tubule mésonéphrique rejoint le conduit mésonéphrique. Ces unités, les tubules mésonéphriques, sont fonctionnelles et produisent de petites quantités d'urine entre les semaines 6 et 10, puis elles deviennent inactives et involuent. Chez le mâle quelques tubules mésonéphriques persistent et vont former avec les conduits mésonéphriques les éléments importants

Figure 5 [38]

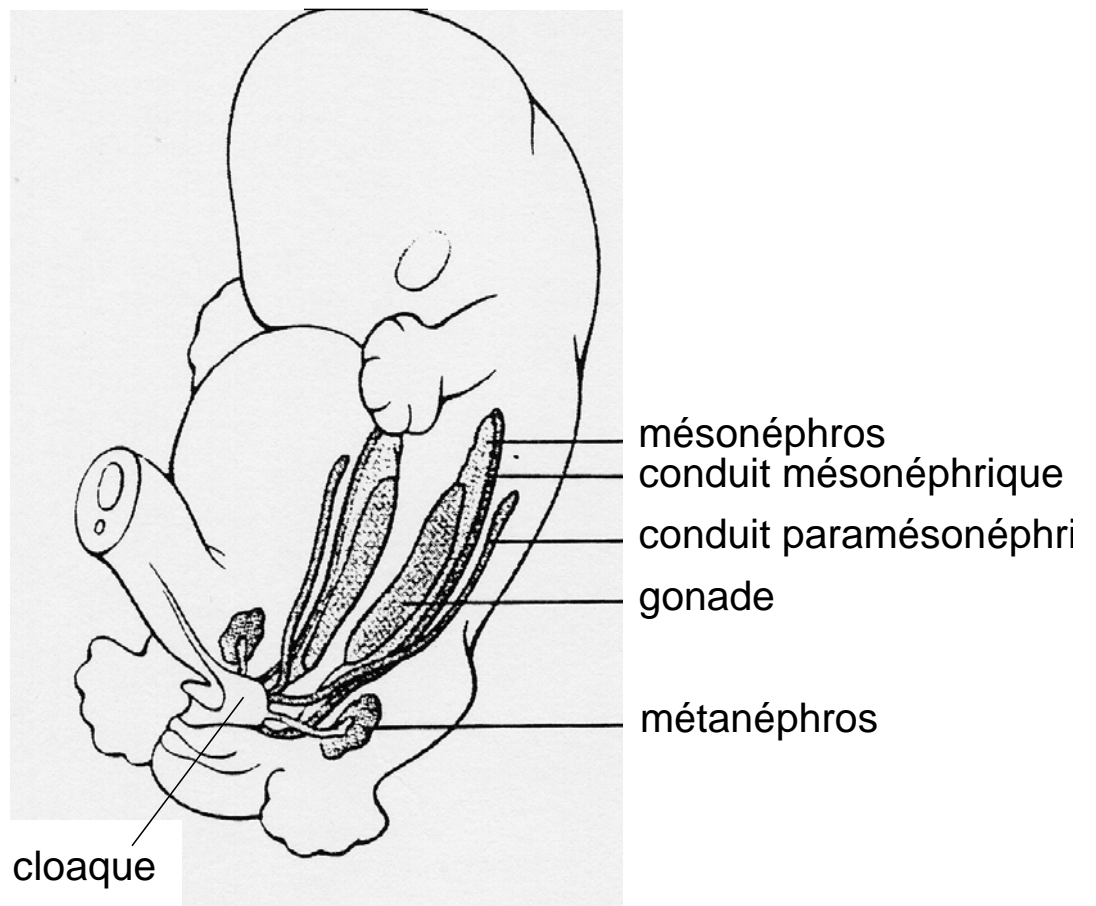


Figure 5 : Schéma d'un embryon humain de 6 semaines. Le mésoderme intermédiaire se différencie après la quatrième semaine en mésonephros et conduits mésonephriques. Dans le mésonephros apparaissent les tubules mésonephriques. Les crêtes génitales sont à l'origine des gonades. D'après la référence 38.

du système excréteur génital. Pendant la régression de l'appareil mésonéphrique apparaît un troisième organe urinaire, le métanéphros ou rein définitif.

#### 1-2-1.c Le métanéphros

Le métanéphros est induit dans le mésoderme intermédiaire de la région sacrale, par une paire de nouvelles structures, les bourgeons urétériques, qui émergent de la portion distale des conduits mésonéphriques, aux environs du jour 28 (Figure 6). A peu près au jour 32, chaque bourgeon urétérique pénètre dans une portion du mésoderme intermédiaire du niveau sacral, appelée blastème métanéphrique (Figure 6). Par la suite les uretères et le système des conduits collecteurs se différencient à partir du bourgeon urétérique alors que les néphrons naissent du blastème métanéphrique. La séparation entre les uretères et les conduits mésonéphriques (canaux de Wolff) se fait par exstrophie dans la paroi vésicale. Entre les semaines 4 et 6, la racine des conduits mésonéphriques s'exstrophie dans la paroi postérieure de la vessie en formation. Ce processus amène les ostiums des bourgeons urétériques dans la paroi vésicale alors que l'ouverture du conduit mésonéphrique est déplacée vers le bas au niveau de l'urètre pelvien en dessous du col de la vessie (Figure 7).

#### 1-2-2 Développement des testicules

Les gonades apparaissent chez l'embryon humain de quatre semaines sous forme d'une crête longitudinale bilatérale, la crête génitale, située de chaque côté de la ligne médiane (Figure 5). A la sixième semaine, les cellules germinales primordiales pénètrent dans les crêtes génitales qui vont devenir les cordons sexuels primitifs. Chez le mâle, les cellules de ces cordons vont se différencier en cellules de Sertoli qui s'organisent en cordons testiculaires. A la puberté ces cordons testiculaires associés aux cellules germinales vont se canaliser et se différencier en tubes séminifères. Les cordons testiculaires distaux par rapport aux futurs tubes séminifères se creusent et se différencient à la puberté en conduits à paroi mince : le rete testis.



Figure 6 [38]

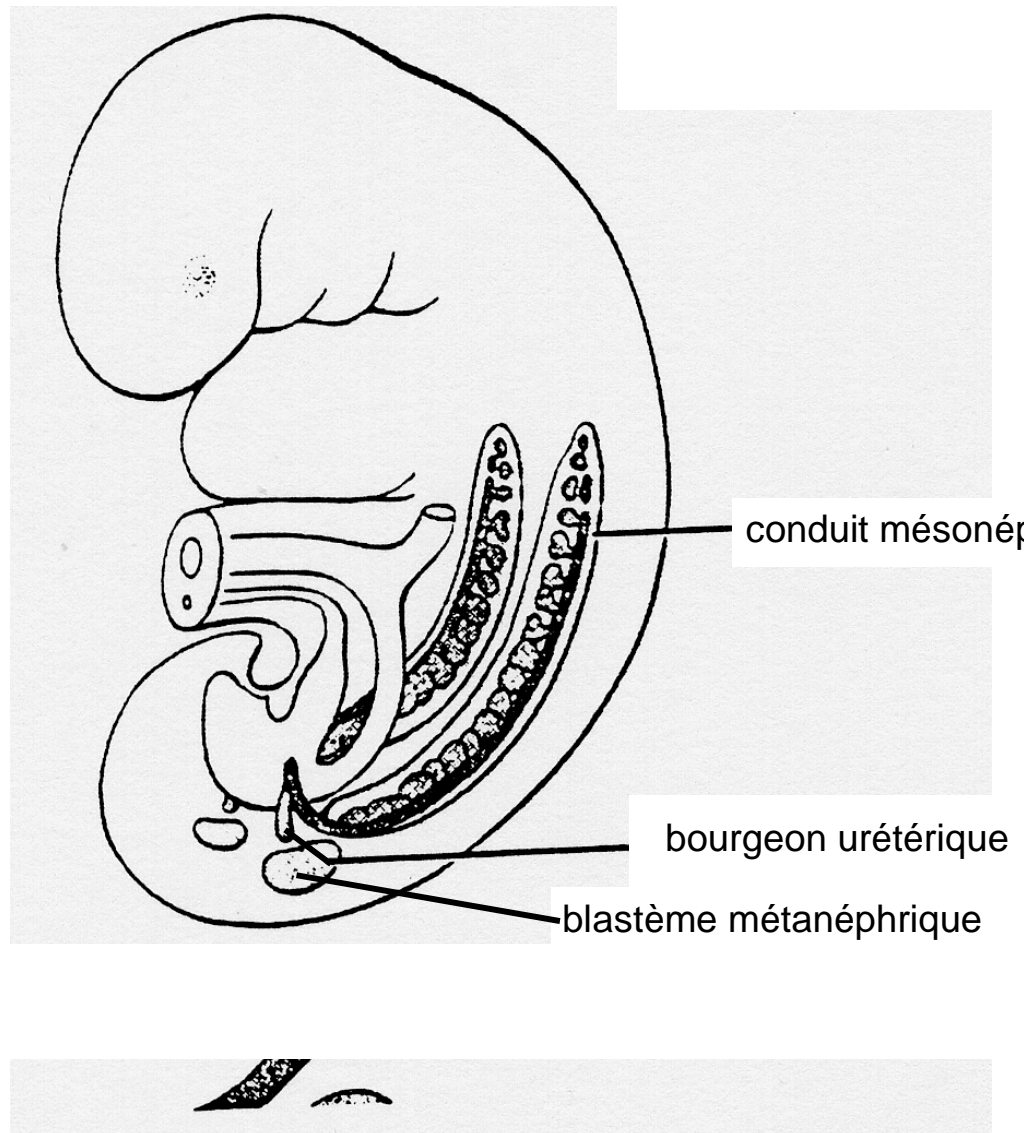


Figure 6: Schéma d'un embryon humain de 28 jours. Induction du métanéphros : les bourgeons urétériques émergent des conduits mésonéphriques et pénètrent dans le blastème métanéphrique. D'après la référence 38.

Figure 7 [38]

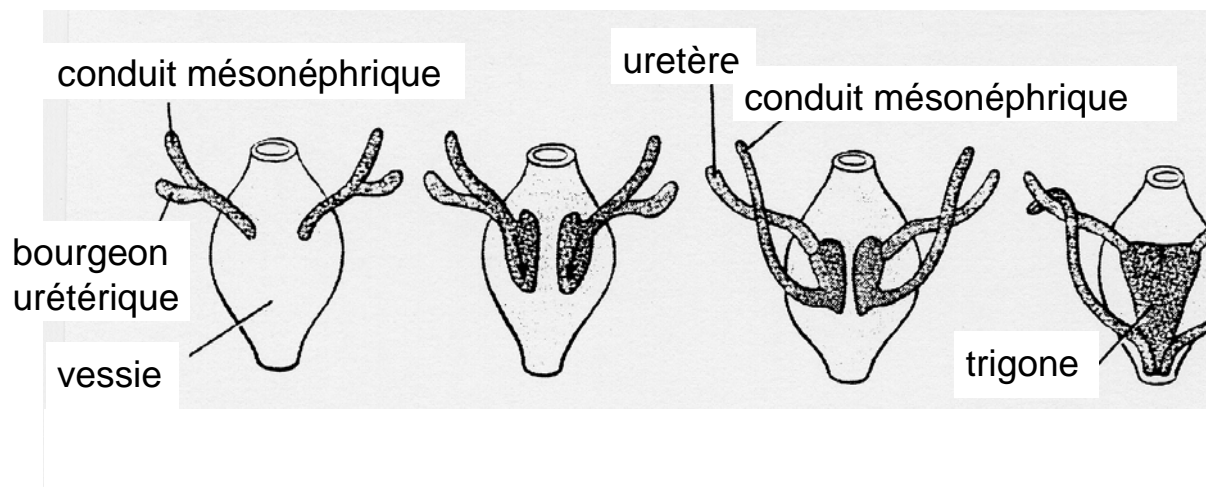


Figure 7 : Schéma d'un embryon humain entre les semaines 4 et 6. Les conduits mésentériques et les uretères s'exstrophient dans la paroi vésicale, ce qui conduit à leur séparation. D'après la référence 38.

### 1-2-3 Formation de l'épididyme

Au cours de la neuvième semaine, cinq à douze tubules mésonéphriques épargnés lors de la régression du mésonéphros, les tubes épigénitaux, entrent en connexion avec les cordons cellulaires du futur rete testis. Ce n'est pas avant le troisième mois que ces tubules mésonéphriques épigénitaux s'unissent réellement avec le futur rete testis. Par la suite ces tubules sont appelés canaux efférents, ils réalisent une communication entre les tubes séminifères et le rete testis d'une part, et le conduit déférent (au niveau du futur épидидyme) d'autre part (Figure 8).

Dans le même temps il y a dégénérescence, au pôle inférieur du testicule en formation, des conduits mésonéphriques (appelés tubules mésonéphriques paragénitaux) ne laissant persister qu'un petit résidu le paradidyme (Figure 8).

Entre les semaines 8 et 12, la sécrétion initiale de testostérone stimule la transformation des conduits mésonéphriques (canaux de Wolff) en voies spermatiques appelées conduits déférents (Figure 8). L'extrémité craniale de chaque conduit mésonéphrique dégénère, laissant persister un petit résidu : l'appendice épидидymaire. La région du conduit déférent adjacente au futur testicule se différencie en un conduit tortueux, qui s'allonge considérablement et décrit de nombreuses circonvolutions, et qui forme l'épididyme.

De la queue de l'épididyme à l'émergence de la vésicule séminale, le canal de Wolff s'entoure d'une épaisse tunique musculaire et constitue le canal déférent. Au delà de la vésicule séminale il constitue le canal éjaculateur.

### 1-3 L'équilibre acido-basique dans l'épididyme

Afin de créer un environnement particulier tout au long de l'épididyme, propice au stockage et à la maturation des spermatozoïdes, le fluide intra-luminal est considérablement modifié entre le moment où il quitte les tubes séminifères du testicule et son arrivée dans le canal déférent. Ces modifications comprennent une **réabsorption nette d'eau**, de sodium, de chlore et d'ions bicarbonate, une sécrétion de potassium et une **acidification** [39, 40].

En effet, l'une des caractéristiques du fluide contenu dans l'épididyme est d'être maintenu à un pH acide [41, 42]. La concentration en bicarbonate et le pH bas interviennent dans le maintien du sperme dans un état quiescent, immobile pendant

Figure 8 [38]

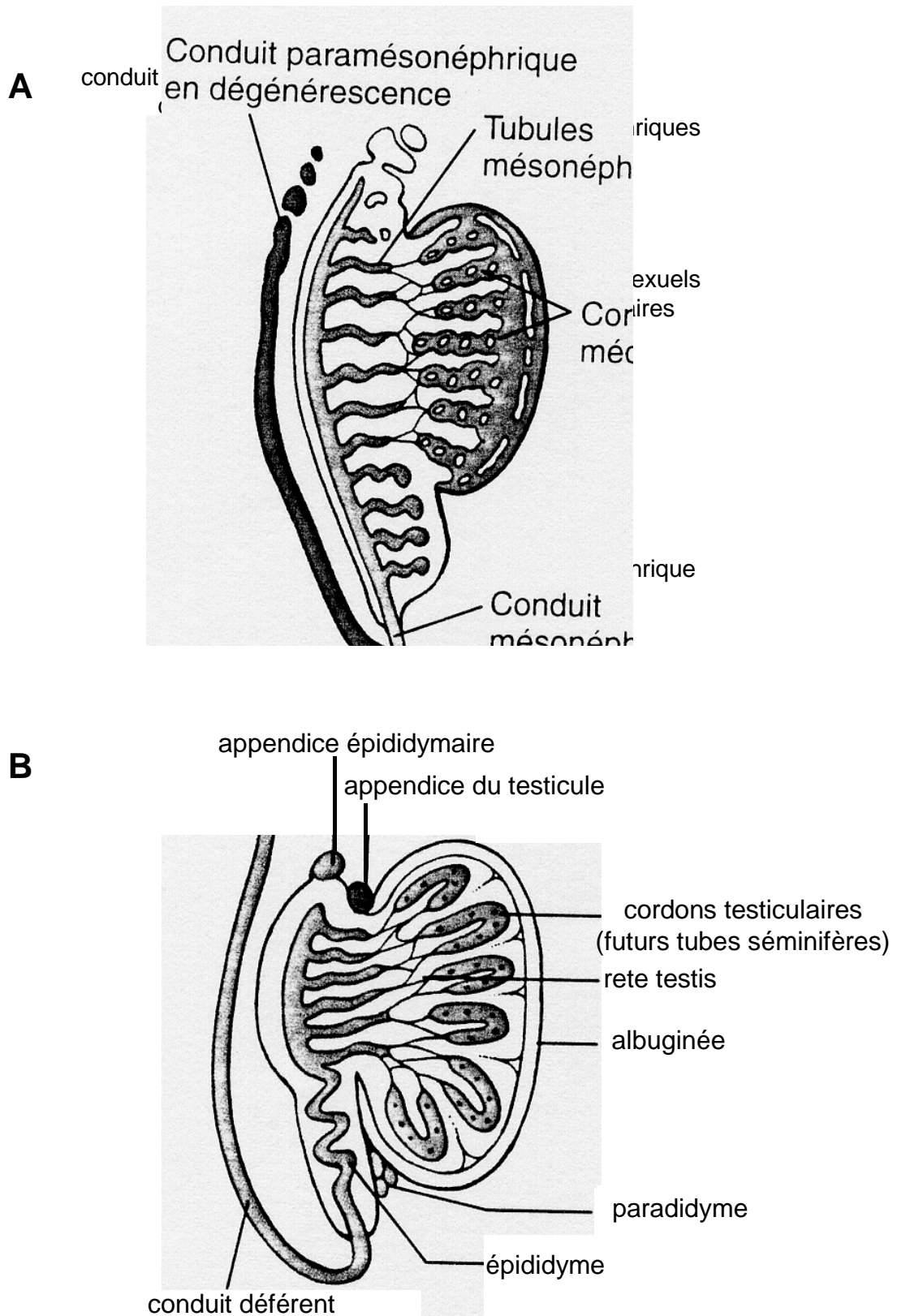


Figure 8 : A) Les canaux efférents issus des tubules mésonéphriques vont connecter le futur rete testis à l'épididyme. B) Le conduit déférent adjacent au futur testicule s'allonge et va former l'épididyme. D'après la référence 38.

la maturation et le stockage dans l'épididyme [1, 19, 43, 44]. Différents éléments sont en faveur d'un transport transépithélial acido-basique au niveau de l'épithélium de l'épididyme : i) la concentration intra-luminale d'ions bicarbonate devient significativement plus basse que la concentration sanguine lors du passage des canaux efférents aux zones proximales de l'épididyme [42], ii) la concentration intra-luminale d'ions bicarbonate reste basse dans les zones plus distales de l'épididyme et dans le canal déférent [42]. Ceci s'accompagne d'une acidification importante du fluide intra-luminal [41, 42, 45, 46].

### **1-3-1 Réabsorption des bicarbonates dans la partie proximale de l'épididyme**

La partie proximale de l'épididyme est caractérisée par une réabsorption des ions bicarbonate. Différentes études ont montré une réabsorption d'eau couplée à celle du sodium et du bicarbonate dans les canaux efférents et dans les segments initiaux [14, 42, 47-49]. Tel que mentionné plus haut, ces tissus ont une origine embryologique commune avec le rein avec qui ils partagent des mécanismes communs [50].

#### **1-3-1.a L'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ NHE3**

Dans le rein l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHE3 joue un rôle majeur dans l'équilibre acido-basique et l'équilibre sodé [51]. Il est abondamment exprimé à la membrane apicale des cellules tubulaires proximales du rein, où il sert à la réabsorption du chlorure de sodium et du bicarbonate [52-54].

Dans les voies excrétrices masculines, NHE3 est abondamment exprimé dans la membrane apicale des cellules non ciliées des canaux efférents et des cellules principales de l'épididyme, il est absent des cellules claires et étroites [55-57].

Le degré d'expression de NHE3 varie d'une région à l'autre de l'épididyme de rat [55]. Dans les zones proximales, NHE3 est plus abondant dans les segments initiaux et dans la tête proximale de l'épididyme. Dans les régions distales, NHE3 est exprimé uniquement dans la partie proximale de la queue, il est absent de la queue distale et du canal déférent.

#### 1-3-1.b L'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ NHE2

Un autre échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , NHE2, a été décrit dans la membrane apicale des cellules principales de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme mais n'a pas été retrouvé dans les segments initiaux [58]. En fait, des études fonctionnelles réalisées avec différents inhibiteurs ne permettent pas de conclure formellement sur la nature de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) présent au niveau des segments initiaux, il pourrait s'agir de NHE2 ou bien d'un variant de NHE3 [55, 58, 59].

#### 1-3-1.c Les échangeurs $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ NBCe1-A et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE2

Des études en immunofluorescence, on montré que le co-transporteur électrogénique  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  NBCe1-A (appelé initialement NBC) [60] et l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  AE2 sont exprimés dans la membrane basolatérale de toutes les cellules épithéliales de l'épididyme, alors que AE1 n'est pas présent dans ce tissu [61]. Les niveaux d'expression de NBCe1 et AE2 sont plus élevés dans les régions proximales de l'épididyme, où une concentration luminale basse de bicarbonate est établie, indiquant leur rôle potentiel dans la réabsorption du bicarbonate [41, 42].

#### 1-3-1.d Anhydrase carbonique

Les cellules principales de l'épididyme ont une forte activité anhydrase carbonique cytosolique en particulier dans les régions proximales [62]. L'anhydrase carbonique-IV est exprimée dans les membranes apicales et basolatérales [63, 64]. Plus récemment d'autres isoformes d'anhydrase carbonique ont été identifiées dans le rein et les cellules de l'épithélium de l'épididyme. Dans le rein, l'anhydrase carbonique XII est présente dans la membrane basolatérale des cellules épithéliales de la branche ascendante large de l'anse de Henlé, du tube contourné distal et du tube collecteur [65]. Dans l'épididyme humain, l'anhydrase carbonique XII co-localise avec l'anhydrase carbonique II dans les cellules riches en mitochondries à leur partie apicale (correspondant aux cellules claires et aux cellules étroites de rat) [66, 67]. Plus récemment une distribution plus complexe a été rapportée dans l'épididyme de rat [68] : l'anhydrase carbonique XII a été localisée dans la membrane basolatérale des cellules étroites des segments initiaux et dans les cellules principales du corps et de la queue de l'épididyme, et l'anhydrase carbonique XIV dans les membranes apicales et basolatérales des cellules principales.

### 1-3-1.e Modèle de réabsorption des bicarbonates

Les cellules principales des régions proximales de l'épididyme sont donc équipées pour effectuer une réabsorption nette d'ions bicarbonate, et utilisent des voies de transport similaires à celles présentes dans les tubes proximaux du rein [69]. Dans les segments initiaux de l'épididyme, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apical NHE3 ou un échangeur « NHE3-like » sécrète des protons dans la lumière. Ces ions  $\text{H}^+$  se combinent aux ions bicarbonate présents dans la lumière pour former  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  sous l'action des anhydrases carboniques CA-IV et CA-XIV. Le  $\text{CO}_2$  nouvellement formé diffuse alors à travers la membrane apicale et est hydraté par l'anhydrase carbonique intra-cytoplasmique CA-II pour former un proton et un ion bicarbonate. Les protons retournent dans la lumière via NHE3, et le bicarbonate traverse la membrane basolatérale à travers le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  NBCe1-A ou l'échangeur d'anions AE2. Le résultat de ce processus est une réabsorption nette d'ions bicarbonate sans sécrétion nette de protons [14]. Il a été proposé que les anhydrases carboniques basolatérales pourraient faciliter le cotransport  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  en empêchant le développement d'un déséquilibre alcalin du pH dans l'interstitium [63, 70, 71]. Ce modèle est synthétisé sur la figure 9, d'après [14].

### 1-3-2 Sécrétion nette de protons dans la partie distale de l'épididyme

Le contenu de la lumière de l'épididyme de rat est maintenu à un pH acide de 6.8 [41, 42] indiquant une sécrétion active de protons à ce niveau.

#### 1-3-2.a Rôle de la $\text{H}^+$ -ATPase vacuolaire dans la sécrétion de protons

Des études ont montré que les cellules claires et les cellules étroites expriment fortement la  $\text{H}^+$ -ATPase vacuolaire à leur membrane apicale et dans des vésicules intracellulaires [72-78]. La sécrétion de protons dans le canal déférent est inhibée par les inhibiteurs spécifiques de la  $\text{H}^+$ -ATPase vacuolaire : la bafilomycine et la concanamycine [72, 79].

#### 1-3-2.b Rôle de l'anhydrase carbonique dans la sécrétion de protons

L'anhydrase carbonique de type II est fortement exprimée dans les cellules claires et les cellules étroites de l'épididyme et du canal déférent [67, 72, 79].



Figure 9 [80]

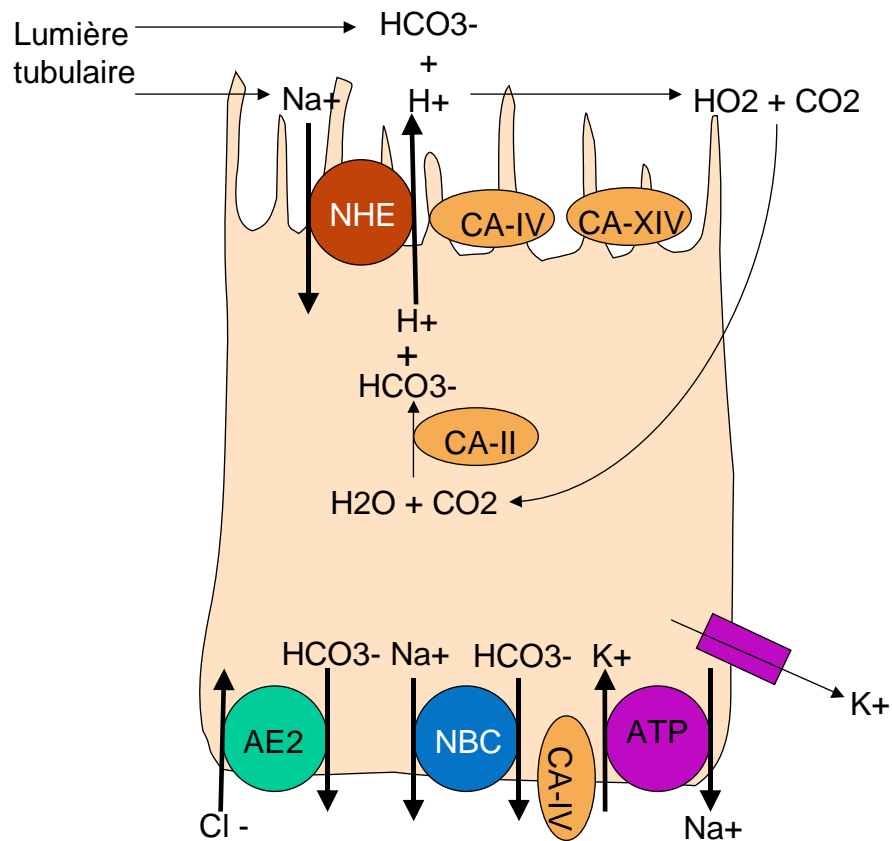


Figure 9 : Modèle de réabsorption des bicarbonates dans les régions proximales de l'épididyme. Les protons sont excrétés par l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> situé au pôle apical. Le « moteur » de la sécrétion des protons est la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase située au pôle basal qui maintient une concentration intracellulaire faible de Na<sup>+</sup>. Le K<sup>+</sup> est recyclé par un canal potassique situé en basolatéral. Dans la lumière tubulaire, les ions H<sup>+</sup> se combinent au HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> présent grâce aux anhydrases carboniques IV et XIV (CA-IV, CA-XIV) pour former CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. Le CO<sub>2</sub> luminal diffuse dans la cellule au niveau apical et forme H<sup>+</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sous l'action de l'anhydrase carbonique II (CA-II). Le bicarbonate nouvellement formé est transporté vers l'interstitium au pôle basolatéral par le transporteur Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NBC), ou par l'échangeur d'anions Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (AE). L'anhydrase carbonique IV (CA-IV) située au pôle basolatéral facilite la dissipation du HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans l'interstitium. D'après la référence 14.

La co-expression de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire et de l'anhydrase carbonique de type II dans les mêmes sous populations cellulaires indique la participation de l'anhydrase carbonique de type II dans la sécrétion nette de protons. Il faut préciser cependant que l'absence de l'anhydrase carbonique de type II dans les cellules claires a déjà été aussi rapportée [68], les différences de méthode de fixation des tissus et d'anticorps peuvent être à l'origine de ces résultats divergents.

Il a été montré que la perfusion in vivo de la queue de l'épididyme par de l'acétazolamide, inhibiteur de l'anhydrase carbonique, entraîne une réduction du taux d'acidification de la lumière [39], contrairement à ce qui se passe dans les régions proximales [45]. L'acétazolamide réduit très nettement la sécrétion de protons inhibée par la bafilomycine (inhibiteur de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire) dans le canal déférent isolé [79]. Ainsi, il apparaît que l'anhydrase carbonique joue un rôle dans l'acidification de la lumière des segments distaux de l'appareil reproducteur masculin (queue de l'épididyme, canal déférent).

#### 1-3-2.c Transport de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Un mécanisme d'échange Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> basolatéral a été décrit sur des cultures primaires de cellules de l'épididyme [81]. Dans le canal déférent isolé, le taux de sécrétion de protons est indépendant de l'ion chlore mais est fortement inhibé par SITS, inhibiteur des transporteurs de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, dans des conditions normales et dans des conditions excluant la présence de Cl<sup>-</sup> [79]. Une faible expression de AE2 (échangeur Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et de NBCe1-A (échangeur Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a été détectée dans la membrane basolatérale des cellules épithéliales de la queue de l'épididyme et du canal déférent [60, 61]. Cependant, étant donné que la sécrétion nette de protons dans ce segment est indépendante de Cl<sup>-</sup> [79], AE2 ne semble pas être en jeu, et NBCe1-A est le candidat le plus plausible pour assurer le transport basolatéral de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

#### 1-3-2.d Modèle de sécrétion des protons

Ainsi l'acidification luminale nette dans la queue de l'épididyme et le canal déférent semble assurée par la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, en conjonction avec les transporteurs basolatéraux de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pour coupler la sécrétion de protons avec la réabsorption de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> [14] (Figure 10).

Figure10

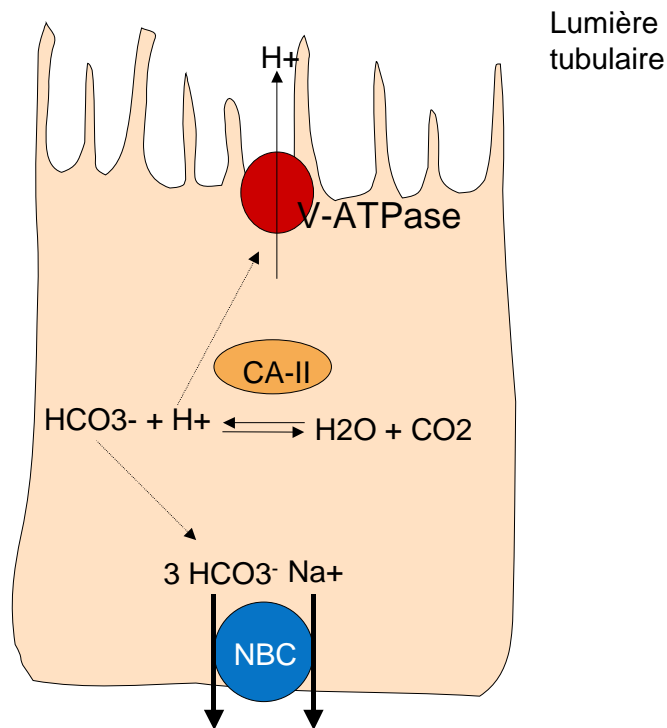


Figure 10 : Modèle de sécrétion des protons par les cellules claires dans la partie distale de l'épididyme. L'anhydrase carbonique intracellulaire permet l'obtention du proton qui est sécrété dans la lumière par la  $H^+$ -ATPase vacuolaire. Le bicarbonate est éliminé dans l'interstitium via la transporteur  $Na^+-HCO_3^-$  (NBC) au pôle basolatéral.

### **1-3-3 Dynamique de l'équilibre acido-basique**

Le pH acide et la concentration faible en bicarbonate de la lumière, qui permettent le stockage des spermatozoïdes dans un état quiescent, semble se modifier au moment de l'excitation sexuelle. L'augmentation des bicarbonates pourrait permettre d'activer les spermatozoïdes avant qu'ils ne soient en contact avec les sécrétions des organes sexuels accessoires. Il a été montré chez le porc que l'épithélium du canal déférent, qui est innervé, est sensible à plusieurs neurotransmetteurs et hormones stéroïdiennes qui stimulent une sécrétion d'anions [82]. Les cellules principales peuvent sécréter du bicarbonate via CFTR [83, 84]. L'accumulation intracellulaire de bicarbonate dans les cellules claires active l'adényl cyclase soluble (sAC) ce qui entraîne la production d'AMP cyclique. Cette accumulation d'AMP cyclique conduit à une accumulation de H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire au pôle apical des cellules claires et en conséquence à une augmentation de la sécrétion nette de protons [85]. Le co-transporteur NBC3 pourrait être la voie d'entrée apicale du bicarbonate dans la cellule claire. Ainsi, Sylvie Breton propose une inter-relation étroite entre les cellules claires et les cellules principales dans la partie distale de l'épididyme : la sécrétion de bicarbonate par les cellules principales, au cours de l'excitation sexuelle, pourrait secondairement stimuler la sécrétion de protons par les cellules claires pour retrouver l'état d'équilibre antérieur avec un pH intraluminal acide (Figure 11).

## **1-4 H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires**

### **1-4-1 Rôle des H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires**

Les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires sont des complexes ubiquitaires faits de plusieurs sous-unités qui assurent le transport transmembranaire des protons en utilisant de l'ATP. Ces complexes sont théoriquement exprimés dans toutes les cellules eucaryotes dans les membranes intracellulaires ou pour certaines cellules spécialisées également dans la membrane plasmatique.

Alors que le pH intracellulaire est généralement régulé par des échangeurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> et des échangeurs Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dépendants et non dépendants du Na<sup>+</sup>, l'acidification de plusieurs compartiments intracellulaires comme les lysosomes, l'appareil de Golgi, les vésicules sécrétoires et les endosomes est régulée par les H<sup>+</sup>-

Figure 11

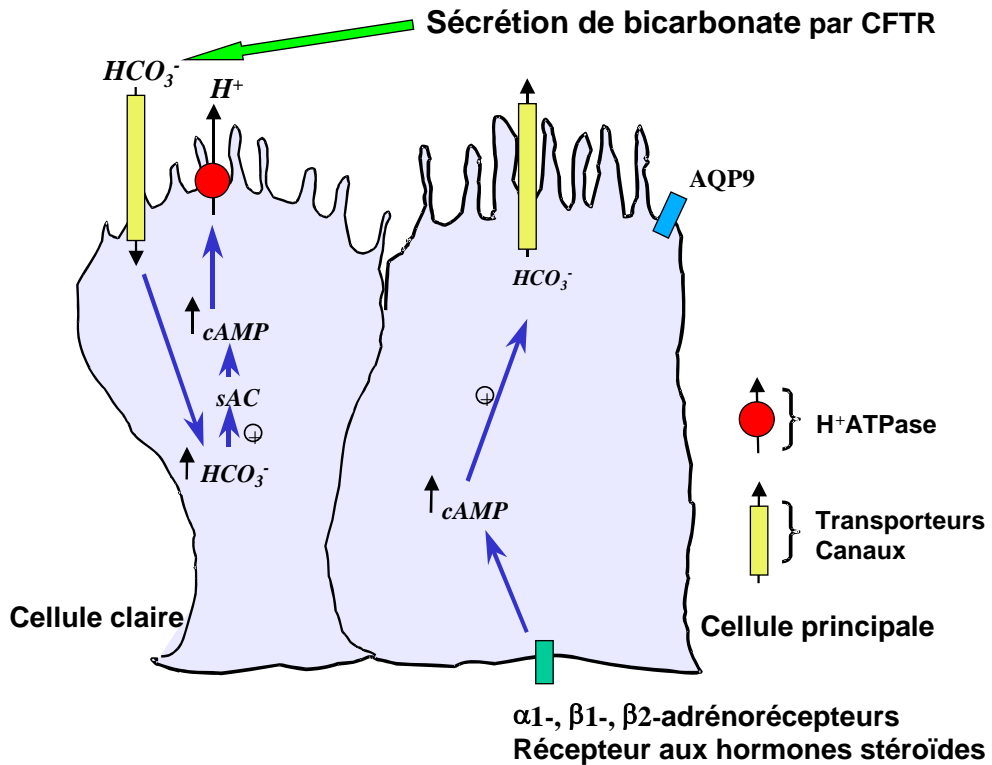


Figure 11 : Modèle de la relation entre cellule claire et cellule principale dans la partie distale de l'épididyme. Au cours de l'excitation sexuelle, sous l'effet de la stimulation hormonale et neurologique, les cellules principales sécrètent des bicarbonates via CFTR. L'accumulation de bicarbonate dans la lumière tubulaire puis dans la cellule claire stimule l'adényl cyclase soluble, ce qui a pour conséquence une augmentation de l'AMP cyclique. Cette augmentation entraîne une accumulation de  $H^+$ -ATPase vacuolaire à la membrane apicale et en conséquence une augmentation de la sécrétion de protons qui concourt au retour à un pH acide dans la lumière de l'épididyme.

ATPases vacuolaires. Ces organelles ont besoin d'un pH interne acide afin de maintenir fonctionnels les enzymes qu'elles contiennent. Un changement de pH dans ces compartiments intracellulaires conduit à une perturbation de leur fonction et à terme à la mort de la cellule. L'acidification de ces organelles intervient également dans le processus de recrutement des protéines d'enrobage qui servent au ciblage intracellulaire des vésicules [86-89]

Au niveau des neurones, les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires jouent également un rôle dans la transmission synaptique [90]. Les neurotransmetteurs libérés dans l'espace synaptique sont stockés dans des vésicules acidifiées par les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires. Le gradient de protons ou le potentiel membranaire généré par les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires est ensuite utilisé par les protéines de transport des neurotransmetteurs vésiculaires afin d'accumuler les neurotransmetteurs dans les vésicules de stockages.

Enfin, les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires localisées dans la membrane plasmique permettent l'extrusion de protons de la cellule. L'acidification de l'environnement cellulaire est étroitement lié à une fonction cellulaire spécialisée comme par exemple dans les ostéoclastes où les protons générés par les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires sont utilisés pour dissoudre la matrice osseuse [91, 92], ou dans les macrophages pour lesquels le pH acide fait partie des moyens de tuer et de digérer les cellules environnantes ou les pathogènes [93]. Dans d'autres cellules les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires servent à la régulation du pH extra-cellulaire de compartiments fermés tel que dans l'oreille interne contenant l'endolymphe où son rôle est de maintenir une concentration élevée en ions potassium indispensable à une audition normale [94-96]. Dans le rein, les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires ont un rôle dans les échanges acido-basiques, en particulier au niveau des cellules intercalaires du tube collecteur, et contribuent ainsi à l'homéostasie de l'ensemble de l'organisme [80, 97, 98]. Enfin, dans l'épididyme les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires exprimées à la membrane apicale des cellules claires et des cellules étroites permettent le maintien de l'acidification du fluide séminal [19, 39, 72, 74, 79]. L'étude de ces H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires est l'objet de la première partie de notre travail.

### 1-4-2 Structure générale des H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires

Les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires appartiennent à la superfamille des ATPases qui est subdivisée en trois sous classes :

- 1) les F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPases mitochondriales
- 2) les H<sup>+</sup>-ATPases de type V (vacuolaires)
- 3) les ATPases de type P comme les Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPases, les Ca<sup>2+</sup>-ATPases et les H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPases

#### 1-4-2.a Les F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPases mitochondriales

Les F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPases mitochondriales et les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires ont des caractéristiques communes comme leur composition en sous-unités, le haut degré de similitudes dans la séquence en acides aminés de leurs sous-unités et l'arrangement de ces sous-unités [99, 100].

Fonctionnellement elles sont cependant distinctes : les F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPases mitochondriales utilisent un gradient de protons pour la synthèse de l'ATP, alors que les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires hydrolysent de l'ATP pour créer un gradient de protons. Pourtant, des exemples montrent, dans la vessie de tortue ou dans des vacuoles de levures, que la fonction de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire peut être inversée et agir comme une synthétase d'ATP dépendante d'un gradient de protons [101, 102].

La structure, et en particulier la structure tridimensionnelle du secteur F<sub>1</sub>, les changements structuraux s'opérant au cours des différents états d'activité de l'enzyme, ainsi que la fonction des F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPases ont été étudiés en détail au cours de ces dernières années [103, 104]. En conséquence, la structure et la fonction des H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires ont été modélisées sur la base des données obtenues pour les F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPases [80, 100]. De plus, la plus grande partie des connaissances acquises sur la structure et la fonction des H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires proviennent d'expériences réalisées sur les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires de levure. Le nom d'H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire provient d'ailleurs de la levure en raison du rôle de cette catégorie de pompes dans l'acidification de leurs vacuoles [100, 105, 106].

#### 1-4-2.b Les domaines de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire

Les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires sont composées de nombreuses sous-unités organisées en deux principaux domaines (Figure 12) [80, 86, 100, 107, 108]. Le domaine V<sub>0</sub> est responsable de la translocation des protons. Il est composé de protéines transmembranaires désignées par des lettres minuscules a, c, c', c'' et d. Le domaine V<sub>1</sub> est un grand domaine cytoplasmique composé de huit sous-unités désignées par des lettres majuscules selon la stoechiométrie A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>CDEFG<sub>2</sub>H. Ces deux domaines forment un complexe protéique d'environ 900 kDa [99, 100, 105, 109-113]. Des données récentes obtenues chez la levure sont en faveur de l'organisation en au moins deux tiges de la structure, appartenant à V<sub>1</sub>, et reliant la zone catalytique composée des sous-unités A et B au domaine V<sub>0</sub> membranaire [106].

#### 1-4-2.c Les sous-unités de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire (Tableau 1)

La fonction précise de nombreuses de ces sous-unités reste inconnue bien que des études de délétion de certaines sous-unités, réalisées chez la levure, aient permis la description de différents effets sur l'assemblage et la fonction de l'enzyme dans son ensemble [114-116]. Certaines de ces sous-unités ont plus d'une isoforme, chaque isoforme étant alors codée par un gène particulier et ayant une expression tissulaire et subcellulaire qui lui est propre [78, 80, 117-120].

Une seule isoforme a été identifiée pour la **sous-unité A** de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire humaine [120]. Cette sous-unité est ubiquitaire. Dans les tissus de bovin elle est exprimée fortement dans la médullaire et le cortex rénal, à des niveaux plus modérés dans le cerveau et la glande surrénale, et elle est faiblement exprimée dans le foie, le muscle et le cœur [121]. Un marquage des cellules étroites et des cellules claires de l'épididyme de souris a été obtenu avec un anticorps dirigé contre la sous-unité A exprimée dans la levure *Neurospora Crassa* [76]. Elle possède un site de liaison aux nucléotides, et semble être la sous-unité catalytique de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire.

La **sous-unité B** comporte deux isoformes : B1 appelée initialement l'isoforme rénale de la sous-unité de 56 kDa et l'isoforme B2 initialement appelée l'isoforme du cerveau de la sous-unité de 56 kDa [122, 123]. L'expression des sous-unités B1 et B2 a été décrite dans les cellules claires et les cellules étroites de l'épididyme du



Figure 12bis ref [124]

Figure 12 [124]

Tableau 1 d'après [80]

canal déférent chez l'homme et chez le rat [72-75, 77]. L'isoforme B1 a été décrite également dans d'autres tissus dont l'œil [125], l'oreille interne [94], le poumon et le placenta [123]. L'isoforme B2 est exprimée dans la plupart des tissus et est considérée comme la forme ubiquitaire de la sous-unité. Mais, contrairement aux autres cellules spécialisées dans la sécrétion de protons c'est la sous-unité B2 qui est exprimée en grande quantité au niveau de la zone de résorption osseuse des ostéoclastes. La comparaison des séquences d'acides aminés des isoformes B1 et B2 humaines et bovines révèle que les 469 acides aminés centraux sont très hautement conservés, alors que les 20-25 acides aminés des extrémités amino et carboxy terminales sont très différents, ce qui suggère que ces régions terminales donnent à la fonction de la sous-unité B une spécificité et une spécialisation selon l'isoforme [122, 123]. Les deux isoformes de la sous-unité B pourraient ainsi conférer à la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire des activités enzymatiques différentes, ou elles pourraient avoir des capacités différentes de réguler la densité de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire à la membrane [122]. L'extrémité carboxy terminale de la sous-unité B1, mais pas celle de la sous-unité B2, se termine par la séquence d'acides aminés D-T-A-L. Ce motif est un site de fixation pour les protéines contenant un domaine PDZ (Psd-95, Disc large, ZO-1). Ces protéines sont des molécules qui permettent de mettre en relation d'autres protéines entre elles, et ainsi de créer des complexes multiprotéiques (*scaffolding proteins*) favorisant les interactions entre protéines. Il a été suggéré que l'interaction avec une protéine PDZ pourrait permettre l'interaction de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire contenant la sous-unité B1 avec d'autres protéines, spécifiquement selon les tissus, permettant le trafic et l'adressage du complexe enzymatique [126]. Cependant aucune des mutations non sens du gène *ATP6V1B1*, codant pour la sous-unité B1, identifiées jusqu'à présent dans l'acidose tubulaire rénale distale, n'a été localisée dans la région carboxy terminale de la protéine [127-129]. Ainsi les études génétiques des sujets ayant une acidose tubulaire distale par mutation du gène *ATP6V1B1* n'ont pas permis l'identification de la région de B1 indispensable à la sécrétion des protons par les H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires exprimées par les cellules intercalaires rénales. Les études chez la levure suggèrent que la sous-unité B joue un rôle essentiel dans la fonction de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire. Chez la levure *Saccoromyces cerevisiae*, dans laquelle la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire acidifie la vacuole, l'altération du gène codant pour la sous-unité B conduit à un phénotype létal, les mutants ne pouvant croître que dans un milieu ayant un pH très peu différent de 5,5

[130, 131]. De la même façon, le remplacement par recombinaison homologue du gène *vha55* codant pour une sous-unité homologue à la sous-unité B chez *Drosophila* conduit à un phénotype larvaire létal [132].

Les **sous-unités A et B** sont arrangées de manière alternée en une "tête" pseudo hexagonale [99]. Les comparaisons de séquences démontrent que les sous-unités B de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire partagent 20 à 25% d'identité en acides aminés non seulement avec la sous-unité A de la H<sup>+</sup>-ATPase, mais aussi avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPases mitochondriales, ce qui suggère que toutes ces quatre protéines ont évoluées à partir d'une protéine commune, ancestrale se liant aux nucléotides. Comme prédit par l'homologie avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPases [133], il a été montré que les sous-unités A et B de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire participent toutes les deux à la fixation des nucléotides [134], cependant des éléments génétiques et biochimiques suggèrent que c'est le site de liaison au nucléotide de la sous-unité A qui est le site catalytique [135, 136]. Néanmoins, la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire est aussi inactivée après la modification d'un seul site non catalytique de la sous-unité B par un analogue de nucléotide non hydrolysable photoactivé. Ceci suggère que le site de fixation des nucléotides sur la sous-unité B pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'activité de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire [137].

Les **sous-unités C, G et E** font partie de la tige cytoplasmique qui connecte les domaines V<sub>1</sub> et V<sub>0</sub> de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire (figure 12 et 12bis) [80, 106, 109]. Deux isoformes sont connues pour la sous-unité C humaine. C1 est exprimée de manière ubiquitaire, alors que C2 n'a jusqu'à présent été détectée que dans le rein et le poumon [117, 119]. Trois isoformes de la sous-unité G ont été décrites : G1, G2 et G3. G1 est exprimée de manière ubiquitaire, G2 est exprimée spécifiquement dans le cerveau et G3 a été localisée dans le rein [117, 119, 138, 139]. Deux isoformes de la sous-unité E ont été identifiées : la sous-unité E1 spécifique des spermatozoïdes, et la sous-unité E2 ubiquitaire (appelée initialement la sous-unité 31 kDa ou la sous-unité E) [140, 141].

La **sous-unité a** est la plus grosse sous-unité de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire et fait partie du domaine V<sub>0</sub> (Figure 12). Quatre isoformes de la sous-unité a ont été identifiées dans la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire humaine : a1, a2, a3 et a4 [80]. La sous-unité a1 est exprimée de manière ubiquitaire [142, 143]. La sous-unité a2 a été retrouvée dans le rein, le poumon, la rate [144]. La sous-unité a3 est localisée dans

les ostéoclastes [92, 145], où elle est essentielle à la résorption osseuse, son altération pouvant conduire à une forme maligne autosomique récessive d'ostéopétrose [146]. La sous-unité a4 a été détectée dans le rein, l'oreille interne, et l'épididyme de souris [147, 148]. Des mutations de la sous-unités a4 sont responsables d'une forme d'acidose tubulaire distale [127].

Deux isoformes de la **sous-unité d** ont été identifiées dans la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire humaine. d1 est ubiquitaire tandis que d2 est présente dans le rein, le poumon, et les ostéoclastes [117].

#### 1-4-2.d Le « canal » à protons

Le « canal » par lequel sont transportés les protons est formé du domaine V<sub>0</sub> qui contient les sous-unités protéolipidiques c' et c'' (Figure 12 et 12bis) [149]. Des études récentes d'analyse de mutations fonctionnelles de la sous-unité Vph1 de levure (analogue chez la levure de la sous-unité a des mammifères) suggèrent l'implication de la sous-unité a dans cette structure [144, 150]. La délétion dirigée de la sous-unité protéolipidique ATP6V0C, sous-unité c (Tableau 1), de la souris conduit à une létalité embryonnaire secondaire à une anomalie de la nidification de l'embryon [151]. La translocation du proton à travers le « canal » est potentiellement inhibée par les antibiotiques de type macrolides (bafilomycine A<sub>1</sub> et concanamycine) à des doses de l'ordre de la nanomole [152, 153]. Ces inhibiteurs sélectifs de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire pourraient agir par interaction avec les sous-unités protéolipidiques c' et c'' [154-156] de même qu'avec la sous-unité a de 100 kDa [157].

#### 1-4-2.e La tige

Les sous-unités A et B sont connectées au domaine V<sub>0</sub> par plusieurs sous-unités regroupées en une ou plusieurs tiges [106]. Cette structure appartient au domaine V<sub>1</sub> (Figure 12 et 12bis). L'homologie avec la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase mitochondriale, et des études chez la levure, suggèrent que les sous-unités G et E font partie de la périphérie de la tige qui connecte V<sub>1</sub> et V<sub>0</sub>, alors que la sous-unité D serait à la partie centrale de la tige [109]. D'autres éléments provenant de la cristallisation de la sous-unité C de la V-ATPase de *Thermus thermophilus*, homologue de la sous-unité D de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire eucaryote, suggèrent que cette sous-unité appartient à la tige et pourrait aider à l'attachement de la partie centrale de la tige au domaine V<sub>0</sub>

[158]. Des interactions directes protéine protéine ont été démontrées pour les sous-unités E et H. La délétion de l'extrémité carboxy terminale de la sous-unité E diminue l'activité d'hydrolyse d'ATP et de transport de protons [159]. De plus, au moins la partie amino terminale de la sous-unité a (Vph1 de la levure), qui appartient au domaine  $V_0$ , interagit aussi avec les sous-unités A et H formant une structure semblable à un stator. Des mutations dans la partie amino terminale de la sous-unité a de levure abolissent la translocation de protons mais pas l'hydrolyse de l'ATP, suggérant que la structure ressemblant à un stator pourrait être importante pour le couplage de l'hydrolyse de l'ATP à la translocation du proton [160, 161].

Sur la base d'expériences où les secteurs  $F_1$  ou  $V_1$  sont immobilisés et marqués avec une bille sur la tige, des rotations de la  $F_1F_0$ -ATPase et d'une  $V_1$ -ATPase bactérienne ont été observées [99, 104, 162, 163]. De la même façon, le marquage de la sous-unité c de la  $H^+$ -ATPase vacuolaire de levure a permis de mettre en évidence des rotations dans le sens inverse des aiguilles d'une montre des sous-unités c par rapport à la sous-unité G de la tige [164, 165].

Ainsi, le modèle actuel est que l'accrochage de l'ATP à la sous-unité B puis son hydrolyse par la sous-unité A, conduit à la rotation de la structure centrale par rapport au domaine composé de trois sous-unités A et de trois sous-unités B [99, 104]. Ce changement de conformation pourrait ensuite induire le mouvement de la structure en anneau formée par les sous-unités c, et ainsi induire le transfert de protons à travers la membrane, entre la sous-unité a et l'anneau formé par les sous-unités c [99, 100].

#### 1-4-2.f Protéines associées

En plus des sous-unités propres à la  $H^+$ -ATPase vacuolaire, des protéines associées ont été identifiées. Certaines de ces protéines sont exprimées uniquement dans certains tissus, suggérant qu'elles pourraient avoir un rôle dans la spécificité de la fonction de la  $H^+$ -ATPase vacuolaire dans ces tissus ou bien qu'elles pourraient intervenir dans l'adressage de la pompe dans des structures intracellulaires particulières [166, 167].

La perturbation ciblée de la protéine accessoire Ac45 chez la souris conduit à une mort précoce au stade des blastocystes [168].

Chez la levure, quatre protéines homologues Vtc (vacuolar transporter chaperones) ont été identifiées en association avec les protéines SNARE et le

domaine  $V_0$  de la  $H^+$ -ATPase vacuolaire. La fonction de ces protéines n'est jusqu'à présent pas totalement comprise, cependant, la délétion de ces protéines produit des lignées de levures ayant des anomalies de la fusion de la membrane vacuolaire et de l'acidification passant par la voie de la  $H^+$ -ATPase [169].

### **1-4-3 Distribution cellulaire des $H^+$ -ATPases vacuolaires**

Alors que la  $H^+$ -ATPase vacuolaire est généralement considérée comme une protéine intracellulaire, il est maintenant clairement démontré qu'elle est insérée à la membrane plasmique de plusieurs types cellulaires où elle joue un rôle dans différents processus physiologiques impliquant le stockage et la maturation du sperme, la régulation de l'équilibre acido-basique systémique, la résorption osseuse, l'audition [88].

#### **1-4-3.a Epididyme et canal déférent**

L'épididyme et le canal déférent de l'appareil reproducteur masculin contiennent une sous-population de cellules épithéliales, les cellules claires et les cellules étroites, qui expriment très fortement la  $H^+$ -ATPase vacuolaire à leur membrane apicale ainsi que dans des vésicules intracellulaires [72, 73]. Jusqu'à notre travail, seule la localisation des sous-unités B1, B2, E2, A (70kD) et a4 avait été précisément décrite dans ces cellules épithéliales. L'expression des sous-unités B1, B2, et E2 a été établie dans les cellules claires et les cellules étroites de l'épididyme de rat et d'humain [72-75, 77, 170]. La localisation de la sous unité a4 a été rapportée dans l'épididyme de souris [78]. Le marquage des cellules claires et des cellules étroites de l'épididyme de souris a également été obtenu avec un anticorps dirigé contre la sous-unité A de 67kDa de la  $H^+$ -ATPase vacuolaire exprimée dans la levure *Neurospora Crassa* [76]. Ces cellules épithéliales ressemblent aux cellules intercalaires rénales de type A et aident au maintien d'un pH bas et d'une faible concentration en bicarbonate dans la lumière ce qui est essentiel pour la maturation et le stockage des spermatozoïdes. La mobilité du sperme est déclenchée, pendant l'éjaculation, par la neutralisation du fluide de l'épididyme par le fluide prostatique et celui des vésicules séminales.



#### 1-4-3.b Le rein

Si la présence de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire à la membrane apicale des cellules intercalaires rénales est essentielle au maintien de l'équilibre acido-basique de l'organisme, cette molécule est aussi présente dans d'autres types cellulaires : les cellules épithéliales du tubule proximal, de la branche ascendante large de Henle, du tube contourné distal. Dans le tubule proximal la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire est localisée à la membrane plasmique et dans les organelles intracellulaires des cellules épithéliales [80]. Les sous-unités E2, et B2 y ont été isolées [77]. La sous-unité B2 est présente dans la branche ascendante large de Henle [77]. B1 est présente à la membrane apicale des cellules du tube contourné distal [171]. Les cellules intercalaires sont celles qui expriment la plus grande quantité de H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, on y retrouve la sous-unité B1 mais aussi les sous-unités A, B2, E2, G1, G3, a4, d1 [77, 118, 119, 171, 172]. La sous-unité B1 est également retrouvée en faible quantité dans les cellules principales des tubes collecteurs où elle est associée aux endosomes qui contiennent l'aquaporine 2 [173].

#### 1-4-3.c L'oreille interne

Dans l'oreille interne, l'acidification active de l'endolymphe par la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire est essentielle à une fonction auditive normale. Des données immunocytochimiques montrent que les cellules épithéliales du sac endolymphatique et les cellules interdentes de la cochlée expriment les sous-unités B1, E2, et a4 de la pompe à proton à leur membrane apicale [94, 174, 175]. Des mutations des sous-unités B1 et a4 ont été rattachées à une surdité de perception probablement secondaire à une alcalinisation de l'endolymphe ayant pour conséquence une altération de la réponse contractile des cellules sensorielles aux mécanostimuli [127, 128].

#### 1-4-3.d Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des macrophages spécialisés dans le remodelage osseux. Les ostéoclastes s'attachent eux-mêmes à la matrice osseuse et réabsorbent l'os minéralisé en créant un environnement acide entre leur membrane plasmique apicale qui fait face à l'os et la surface osseuse. Leur bordure en brosse apicale contient de très grandes quantités de H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires, qui travaillent en parallèle avec un échangeur Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> basolatéral AE1 [176]. La sous-unité B de 56kDa de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire exprimée dans les ostéoclastes est l'isoforme B2,

retrouvée également dans le cerveau et surnommée *brain isoform* [177] alors que pour la sous-unité  $\alpha$  de 116kDa il s'agit de l'isoforme  $\alpha_3$  (ATP6V0A3). Des mutations dans le gène codant pour la sous-unité  $\alpha_3$  ont été identifiées chez des patients porteurs d'une forme autosomique récessive maligne d'ostéopétrose infantile, une pathologie au cours de laquelle la cavité médullaire n'est pas présente en raison d'une anomalie de la fonction des ostéoclastes [146]. La  $H^+$ -ATPase vacuolaire est ainsi un acteur majeur dans la résorption osseuse et est une cible potentielle dans la recherche d'une solution thérapeutique à l'ostéopétrose et à l'ostéoporose.

## **1-5 Transport de l'eau dans l'appareil reproducteur masculin**

### **1-5-1 Réabsorption d'eau tout au long de l'appareil reproducteur masculin**

Les capacités d'absorption et de sécrétion des cellules épithéliales réparties le long de la lumière des voies excrétrices de l'appareil reproducteur masculin créent un environnement approprié pour les spermatozoïdes qui deviennent matures et restent quiescents dans cet organe [9, 19, 21]. Entre 50 et 90% du fluide intraluminal, sécrété dans les tubes séminifères du testicule, est réabsorbé par les cellules épithéliales non ciliées des canaux efférents sous la dépendance des mouvements de NaCl [42, 178-181]. L'augmentation de la concentration du sperme au fur et à mesure de son cheminement le long de l'épididyme vers les régions distales, de même que l'établissement d'un fluide hypertonique, indique qu'une quantité considérable de liquide est réabsorbée dans l'épididyme [40, 42, 182-185]. Les cellules épithéliales présentes le long de la lumière du canal déférent maintiennent également un environnement dans lequel le sperme continue à devenir mature et à être stocké. Dans la portion distale de l'épididyme et dans le canal déférent, la sécrétion d'eau sous la dépendance de la sécrétion de chlore par CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) a été proposée comme mécanisme de contrôle de la fluidité du contenu intraluminal [186].

Les cellules épithéliales du tractus reproducteur masculin permettent des mouvements de fluide transépithéliaux par l'insertion à leur membrane plasmique de différents transporteurs. Parmi ces nombreux transporteurs, les aquaporines sont maintenant reconnues comme étant des acteurs majeurs du transport à travers les membranes biologiques [187, 188]. Depuis l'identification de l'aquaporine 1 au début

des années 1990, de nombreux groupes de recherche ont rapporté l'expression de divers membres de la famille des aquaporines dans les différents segments de l'appareil reproducteur masculin. Ainsi, beaucoup de travaux ont été réalisés ayant pour but de mieux comprendre la fonction des aquaporines présentes dans l'appareil reproducteur masculin et d'envisager leur intérêt comme cible potentielle dans le contrôle de la fertilité masculine.

### **1-5-2 Rôle de CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) dans les mouvements d'eau**

La protéine CFTR est un canal chlore activé par l'AMP cyclique. Cette protéine membranaire est composée de cinq domaines : deux domaines transmembranaires, deux domaines de fixation des nucléotides (NBF) et un domaine de régulation. L'augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire conduit à la phosphorylation de CFTR par la protéine kinase A. Cette activation du canal entraîne une sécrétion de chlore et secondairement d'eau. CFTR a été localisé au pôle apical des cellules non ciliées des canaux efférents de rat [189]. Il a été identifié de manière fonctionnelle dans l'épithélium de l'épididyme [22]. Son ARN messager a été localisé principalement dans les zones proximales de l'épididyme et dans le canal déférent [190]. Des études immunohistochimiques l'ont mis en évidence au niveau du pôle apical des cellules principales au niveau du corps et de la queue de l'épididyme [191]. Les travaux de Cheung et al ont montré que CFTR pourrait servir à réguler l'aquaporine 9 [192, 193]. Ainsi, le contrôle du transport de l'eau par CFTR, directement via la sécrétion de chlore, ou bien par une modulation directe de l'activité de l'aquaporine 9 pourrait être une étape clé de la régulation de la fluidité du contenu luminal. Wong propose que CFTR pourrait avoir un effet d'activation de l'aquaporine 9 dans les parties proximales de l'épididyme là où les phénomènes de réabsorption sont les plus importants, et notre travail apporte des arguments dans ce sens, alors qu'en distal son rôle serait plutôt de contre balancer le risque d'une réabsorption excessive, il interviendrait à ce niveau plus comme un canal sécrétant des anions et secondairement de l'eau [186, 193].

## 1-6 La famille des aquaporines

L'identification de la famille des protéines MIP (Major Intrinsic Proteins) a profondément modifié la compréhension du phénomène de transport de l'eau à travers les membranes plasmiques. Les MIP sont des protéines transmembranaires, qui forment un canal aqueux dans la bicouche lipidique et en conséquence régulent la perméabilité de la membrane à l'eau.

Plus de 450 MIP sont connues chez les êtres vivants et parmi elles 13 aquaporines ont été identifiées chez les vertébrés (AQP0 à AQP12) [194]. Cependant, l'analyse des séquences des aquaporines 11 et 12 montre que ces protéines appartiennent seulement de loin à la famille des MIP. Chez les mammifères, deux sous-groupes d'aquaporines ont été identifiés selon les caractéristiques de leur perméabilité : les aquaporines (AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 et 8) très sélectives pour l'eau, et les aquaglycéroporines perméables également au glycérol (AQP3, 7, 9, 10) ou encore à l'urée, au mannitol, au sorbitol pour l'aquaporine 9 quand elle est exprimée dans des ovocytes [195].

Les aquaporines sont largement exprimées dans les organes sécrétoires et ceux contenant des fluides : au moins sept aquaporines différentes ont été identifiées dans le rein [196, 197], cinq dans les yeux [198], quatre dans le tractus respiratoire [199, 200], elles sont également retrouvées dans les glandes salivaires, sudoripares et lacrymales et d'autres tissus [188].

Les aquaporines sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Des mutations dans les gènes codant pour ces protéines peuvent être responsables de pathologies comme par exemple le diabète insipide néphrogénique autosomique récessif (mutation dans le gène de l'aquaporine 2) [196, 201-205] ou certaines formes de cataracte héréditaire (mutation dans le gène de l'aquaporine 0) [206].

Ainsi de nombreux travaux ont été débutés au cours de la dernière décennie afin d'élucider la fonction des aquaporines dans l'appareil reproducteur masculin. Ces aquaporines pourraient être des cibles potentielles pour contrôler la fertilité masculine [207].

## **1-6-1 Structure des aquaporines [188]**

### 1-6-1.a Structure du monomère

Les aquaporines sont des protéines membranaires d'une taille voisine de 30kDa caractérisées par six domaines transmembranaires et des extrémités C- et N-terminales situées dans la partie cytoplasmique des cellules (Figure 13). Chaque domaine transmembranaire est formé d'une chaîne peptidique en hélice. Cinq boucles (A, B, C, D, E) relient les domaines membranaires entre eux. Les molécules d'aquaporine présentent une symétrie inverse autour de deux motifs NPA, caractéristiques de ces protéines, composés chacun de trois acides aminés, l'asparagine, la proline et l'alanine (Figure 13). Le positionnement de ces deux motifs crée une configuration spatiale favorable au passage des molécules d'eau au centre de la molécule. Le pourcentage d'homologie entre les séquences d'acides aminés de l'ensemble des membres de la famille des aquaporines varie entre 25 et 40%. Ce pourcentage d'homologie est beaucoup plus important quand les séquences flanquant les motifs NPA sont comparées.

### 1-6-1.b Structure en tétramère

Les aquaporines sont présentes à la membrane sous forme de tétramère [188]. Dans ces structures le canal à eau n'est pas situé au centre du tétramère, mais chaque monomère contient un canal hydrique. Les hélices de chaque monomère qui sont situées à la face externe du tétramère sont hydrophobiques alors que celles placées au centre sont hydrophiles. Les études de cryodécoupage (*freeze-fractures*) ont permis de mieux appréhender cette structure en tétramère [208].

## **1-6-2 Sélectivité du canal et régulation de son ouverture**

Les aquaporines sont extrêmement sélectives pour l'eau, elles sont en particulier imperméables aux ions  $H^+$  et  $H_3O^+$ . Différents mécanismes semblent concourir à cette sélectivité : la taille du canal (il se rétrécit à un diamètre de 2,8 Å, approximativement 8 Å au dessus du centre de la bicouche lipidique), la localisation des chaînes latérales hydrophobiques des acides aminés, des interactions spécifiques des molécules d'eau avec un acide aminé chargé situé au site de constriction maximal de chaque canal [188, 209]. La partie la plus étroite du canal GlpF de *E Coli* est plus large de 1 Å par rapport au canal de l'aquaporine 1. Cette

Figure 13

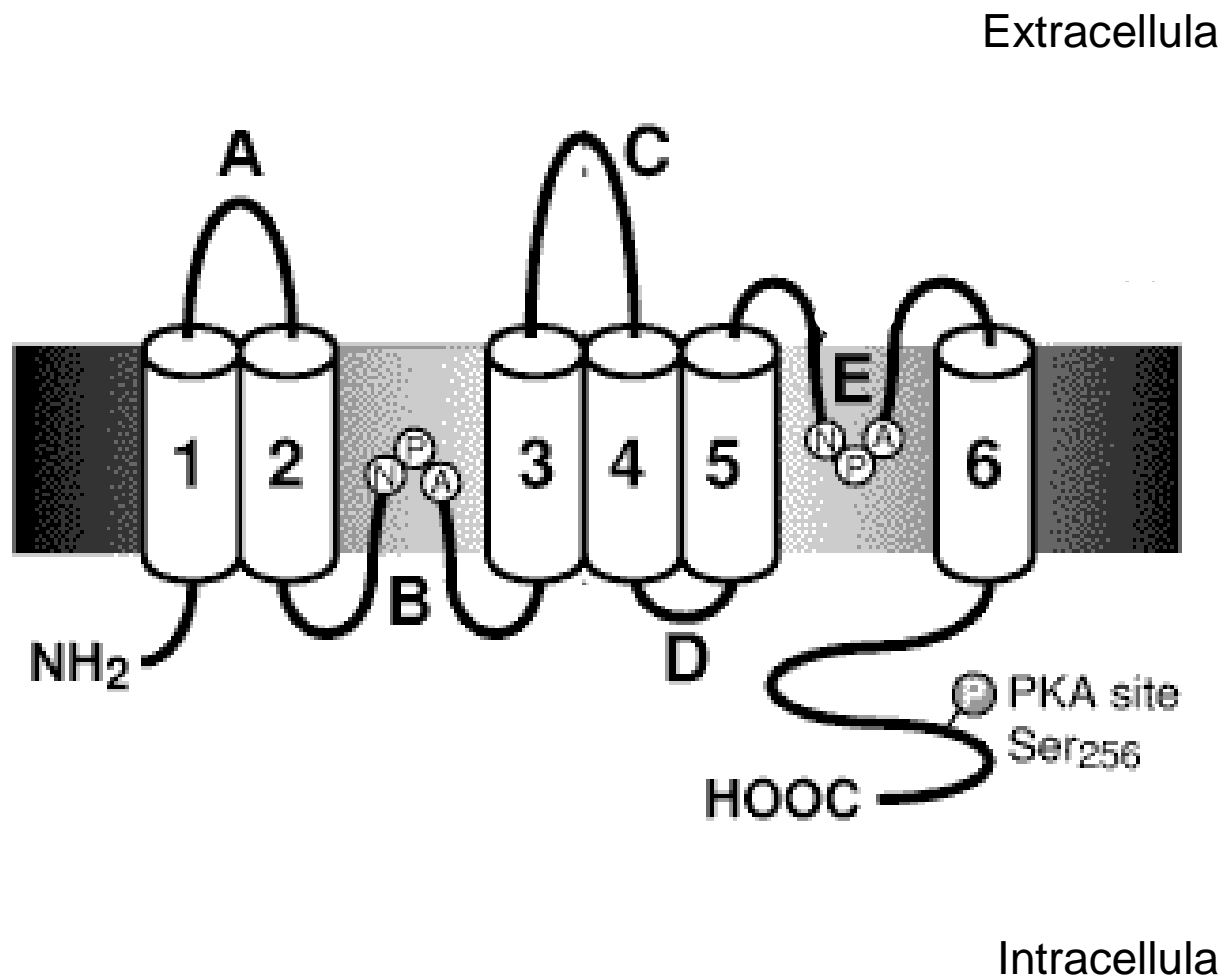


Figure 13 : Schéma général d'une aquaporine. Six domaines transmembranaires sont reliés par cinq boucles (A, B, C, D et E). Les extrémités N et C terminales sont intracytoplasmiques. D'après <http://homepages.uni-tuebingen.de/beitz/aqpe.html>

petite différence de diamètre est suffisante pour permettre le passage du glycérol à travers le canal GlpF. Il est supposé qu'il existe ce même type d'élargissement du canal dans les molécules de la sous-famille des aquaglycéroporines qui sont perméables aux petites molécules telles que le glycérol ou l'urée.

Pour plusieurs aquaporines la régulation de l'ouverture du canal est importante. Cette régulation fait intervenir différents mécanismes. Le pH intervient sur la perméabilité de l'aquaporine 0, de l'aquaporine 3, de l'aquaporine 6. La perméabilité de l'aquaporine 4 est réduite après son activation par la protéine kinase C. Le GMP cyclique modifie la perméabilité de l'aquaporine 1 [188].

### **1-6-3 Les aquaporines dans les canaux efférents**

Les canaux efférents vont du rete testis jusqu'aux segments initiaux de l'épididyme. L'épithélium de ces canaux est constitué de deux types cellulaires : les cellules ciliées et les cellules non ciliées [20]. Une abondante sécrétion de liquide accompagne la production de spermatozoïdes dans le testicule [210]. La réabsorption de ce liquide a lieu essentiellement dans les canaux efférents et permet une augmentation de la concentration du sperme d'un facteur 25 [179]. De ce point de vue les canaux efférents ressemblent aux tubules proximaux du rein, dont ils partagent la même origine embryologique, puisque eux réabsorbent jusqu'à 80% de l'ultra filtrat glomérulaire [179]. Les très nombreuses données publiées sur le rein apportent des éclaircissements sur la réabsorption liquidienne qui a lieu dans les canaux efférents.

#### **1-6-3.a L'aquaporine 1**

Cette aquaporine est la première à avoir été décrite, son expression dans des ovocytes de *Xenopus* a permis de démontrer sa perméabilité sélective à l'eau [211]. Il a été montré que l'aquaporine 1 est un élément majeur de la perméabilité membranaire constitutive des érythrocytes, des cellules épithéliales des tubules proximaux et de la branche descendante de l'anse de Henle du rein.

L'aquaporine 1, qui est exprimée dans les membranes basolatérales et apicales des cellules épithéliales des tubes proximaux du rein, est également présente dans les membranes basolatérales et apicales des cellules non ciliées des canaux efférents de rat [187, 212, 213]. La présence de l'aquaporine 1 a été également rapportée dans les cils des cellules ciliées des canaux efférents [213],

mais dans cette étude les cellules ciliées n'ont pas été spécifiquement identifiées. Alors que l'aquaporine 1 est abondamment exprimée dans l'épithélium des canaux efférents, la morphologie des ces canaux chez les souris n'exprimant pas cette protéine est normale, de même la fertilité des mâles ne semble pas altérée [214]. La présence d'une autre aquaporine à ce niveau pourrait expliquer l'absence d'anomalie chez les souris déficientes. L'aquaporine 1 est la seule aquaporine à avoir été localisée dans la membrane plasmique basolatérale d'un type cellulaire du tractus reproducteur masculin.

#### 1-6-3.b Autres aquaporines

Les mécanismes de la réabsorption de liquide dans les canaux efférents ne sont pas encore totalement élucidés, cependant un nombre croissant de transporteurs a été décrit dans les cellules épithéliales de ce segment. Parmi ces transporteurs on trouve la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHE3, CFTR et deux autres membres de la famille des aquaporines : aquaporine 9 et 10.

L'aquaporine 9 a été identifiée dans la membrane apicale des cellules non-ciliées des canaux efférents [213-216]. Cependant, la localisation immunocytochimique de cette aquaporine apparaît restreinte à la membrane apicale et ne pourrait donc pas complètement compenser l'absence de l'aquaporine 1 chez des souris mutées pour cette protéine et préserver leur fertilité.

L'aquaporine 10 a été récemment identifiée à la membrane apicale des cellules non-ciliées des canaux efférents, mais, comme pour l'aquaporine 9, pas au niveau des membranes basolatérales [217]. L'aquaporine 10 est aussi localisée dans les cellules ciliées.

L'ensemble de ces données indique que les cellules épithéliales non-ciliées des canaux efférents expriment au moins trois membres de la famille des aquaporines (aquaporines 1, 9 et 10). La co-expression de plusieurs aquaporines dans le même type cellulaire, au niveau du même domaine membranaire d'un type cellulaire donné, a été rapportée dans divers épithéliums très actifs dans le transport de l'eau, comme par exemple les tubes collecteurs du rein. Leur expression redondante suggère que les aquaporines, en plus de faciliter les mouvements rapides d'eau à travers les épithéliums, pourraient également avoir d'autres fonctions. De ce point de vue, il est intéressant de remarquer que les aquaporines 9 et 10 sont des canaux à solutés neutres en plus d'être des canaux à eau. En



particulier, elles permettent le passage de glycérol, qui pourrait être un substrat métabolique du sperme [218]. En effet, les spermatozoïdes expriment l'aquaporine 7 [219] une autre aquaglycéroporine, et ont ainsi la capacité de transporter le glycérol.

#### **1-6-4 Les aquaporines dans l'épididyme**

Bien que la majeure partie du liquide sécrété par le testicule soit réabsorbée par les canaux efférents, une réabsorption significative a lieu également au niveau de l'épididyme [40, 42, 182-185]. Jusqu'à présent la présence de six membres de la famille des aquaporines a été décrite dans les cellules principales et les cellules basales [187]. Par contre l'expression de la plupart des membres de cette famille de protéines n'a pas été rapportée de façon systématique dans les cellules claires.

##### **1-6-4.a Aquaporine 1**

L'aquaporine 1 est absente des cellules épithéliales mais est exprimée dans les cellules musculaires lisses adjacentes ainsi que dans les cellules endothéliales [212, 213]. L'aquaporine 1 est aussi détectée dans les cellules endothéliales des canaux efférents et pourrait ici avoir un rôle dans l'élimination de l'eau de ces tissus après sa réabsorption par les cellules épithéliales depuis la lumière.

##### **1-6-4.b Aquaporine 9**

L'aquaporine 9 est exprimée dans toutes les régions de l'épididyme [213, 216, 220, 221]. Elle est clairement l'aquaporine prédominante dans ce tissu. Dans les segments initiaux, le marquage de l'aquaporine 9 est concentré au pôle apical des cellules principales, lesquelles sont caractérisées par la présence de longs stéréocils apicaux. Les quelques cellules étroites présentes à ce niveau ne sont pas marquées [216] de même que l'ensemble des membranes basolatérales de tous les types cellulaires. En immunofluorescence, l'aquaporine 9 reste abondante à la membrane apicale des cellules principales de la tête, du corps et de la queue (Figure 14). Alors que l'expression de l'aquaporine 9 dans les cellules principales a été observée par plusieurs laboratoires [213, 216, 220], son expression dans les cellules claires a été aussi rapportée par Bradan et Hermo par la technique de marquage utilisant l'immunoperoxydase [213].

Figure 14 [222]

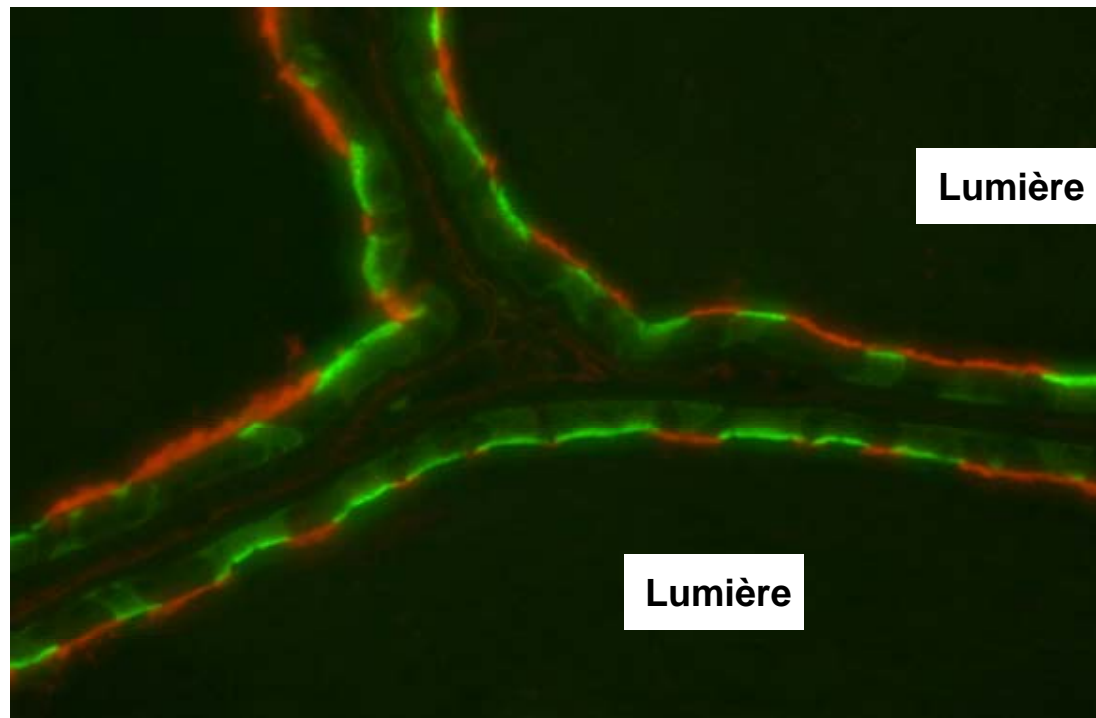


Figure 14 : Partie distale de l'épididyme avec double marquage en rouge pour l'aquaporine 9, en vert pour la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire. Les cellules principales expriment l'aquaporine 9 à leur pôle apical, alors que les cellules claires, positives pour la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, ne l'expriment pas. D'après la référence 222.

#### 1-6-4.c Autres aquaporines

Par ailleurs, des études récentes ont rapporté l'expression des aquaporines 3, 4 et 8 dans une sous-population cellulaire des cellules épithéliales de l'épididyme. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus pour les aquaporines 3 et 8. L'aquaporine 3 a été détectée par immunocytochimie dans les cellules basales de toutes les régions de l'épididyme [217]. Nos données indiquent l'absence d'ARN messager de l'aquaporine 3 dans les cellules épithéliales isolées par microdissection laser et l'absence dans ces cellules de marquage en immunofluorescence [223]. Dans certaines études, l'ARN messager de l'aquaporine 8 ainsi que la protéine elle-même ne sont pas détectés dans les cellules épithéliales [213, 223, 224] alors qu'ils le sont dans d'autres [225].

Nous avons montré récemment que l'aquaporine 5 est co-exprimée avec l'aquaporine 9 à la membrane apicale d'une sous-population de cellules principales dans le corps et la queue de l'épididyme [223]. Le rôle potentiel de l'aquaporine 5 dans la réabsorption d'eau dans l'épididyme reste à élucider.

Nous avons aussi rapporté l'expression de l'aquaporine 2 dans l'épididyme de rat, selon des modalités complexes tant sur le plan spatial que temporel [223]. L'ARN messager de l'aquaporine 2 est détecté à la naissance et sa quantité augmente très nettement au cours du développement post-natal, avec une expression maximale après 4 semaines. La protéine correspondante est exprimée transitoirement dans la queue de l'épididyme pendant le développement post-natal puis alors que l'ARN messager reste détectable encore à l'âge adulte, la protéine elle n'est plus immunologiquement détectée. Cette variation temporelle dans l'expression de l'aquaporine 2 pourrait indiquer un rôle important de cette aquaporine au cours du développement post-natal.

#### **1-6-5 Les aquaporines dans le canal déférent**

Le canal déférent peut être divisé en 3 régions (proximale, médiane et distale), chaque région a des fonctions qui lui sont propres et est caractérisée par une expression génique et protéique particulière. L'épithélium du canal déférent contient, comme l'épithélium de l'épididyme, des cellules principales et des cellules claires.

#### 1-6-5.a Aquaporine 1

L'aquaporine 1, aquaporine très abondante dans le tubule proximal du rein et dans les canaux efférents, a été détectée à la membrane plasmique des cellules épithéliales de la portion la plus distale du canal déférent appelée ampoule [212]. Cependant, l'aquaporine 1 est absente des parties proximales et médianes du canal déférent.

#### 1-6-5.b Aquaporine 2

La distribution de l'aquaporine 2 est hétérogène le long du canal déférent. Chez le rat adulte, l'aquaporine 2 n'est pas détectée dans la partie proximale qui contient aussi des cellules claires riches en H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire. L'expression de l'aquaporine 2 augmente progressivement vers la portion médiane, et finalement toutes les cellules épithéliales de la partie distale l'expriment [226, 227].

#### 1-6-5.c Aquaporine 9

L'aquaporine 9 est aussi présente dans le canal déférent, où elle est détectée sur l'ensemble de la longueur du canal [216]. Elle est abondamment exprimée dans la membrane apicale des cellules principales, et est co-exprimée avec les aquaporines 1 et 2 dans la partie distale du canal.

Ainsi, trois aquaporines ont jusqu'à maintenant été identifiées dans le canal déférent, ces trois canaux à eau sont présents dans le même domaine membranaire des cellules épithéliales de la région la plus distale, suggérant que la composition du contenu luminal dans lequel les spermatozoïdes terminent leur maturation et sont stockés est l'objet d'une régulation complexe du transport transépithélial de l'eau et de solutés.

### **1-6-6 Régulation de l'expression et de la fonction des aquaporines dans le tractus reproducteur masculin**

L'expression et la fonction des aquaporines peuvent être régulées à différents niveaux [187].

#### 1-6-6.a ARN messagers

L'expression des ARN messagers de l'aquaporine 2 est augmentée dans le rein et le canal déférent par la déshydratation, cependant l'augmentation de l'expression de la protéine correspondante n'est accrue que dans le rein [227].

#### 1-6-6.b Glycosylation

L'état de glycosylation de l'aquaporine 2 est différent selon qu'elle est présente dans le rein ou le canal déférent : 38 à 59% de l'aquaporine 2 exprimée dans le rein est glycosylée contre 0 à 5% dans le canal déférent [227]. Le degré de glycosylation de l'aquaporine 2 pourrait avoir un rôle dans l'adressage intracellulaire ou la stabilité de la protéine, comme cela a été décrit pour d'autres protéines comme la thyroperoxydase [228], la GD3 synthase [229].

#### 1-6-6.c Recyclage ou rétention à la membrane

Les aquaporines contiennent un signal qui peut être interprété spécifiquement par chaque type cellulaire et qui permet de diriger la protéine vers le domaine membranaire souhaité et de contrôler soit sa rétention à la membrane, soit son recyclage. L'aquaporine 2 a été initialement identifiée dans les tubes collecteurs du rein [230]. La stimulation des reins par la vasopressine a pour conséquence l'accumulation d'aquaporine 2 à la membrane plasmique des cellules principales et conduit à une augmentation très importante de la résorption transépithéliale de l'eau [196, 204, 231]. Dans le canal déférent, l'aquaporine 2 est constitutivement insérée à la membrane apicale des cellules principales, et contrairement à l'aquaporine 2 des cellules rénales, elle n'est pas régulée par la vasopressine, il n'y a d'ailleurs pas de récepteur à la vasopressine détectable dans les cellules épithéliales du canal déférent [227]. L'aquaporine 9 est, elle aussi, une protéine membranaire apicale constitutive dans l'appareil reproducteur masculin. La destruction du réseau de microtubules par la colchicine n'affecte pas la distribution de l'aquaporine 9 dans l'épididyme de rat, ce qui est en faveur du non recyclage ou du recyclage très peu intense de cette protéine de la membrane à des vésicules intracellulaires [216]. Par contre, dans les cellules épithéliales de la prostate, l'aquaporine 9 a été localisée dans des structures intracellulaires [216].

#### 1-6-6.d Régulation hormonale

La réabsorption des fluides dans les canaux efférents est contrôlée par les androgènes [183] et par les oestrogènes [232]. Les androgènes sont convertis en oestrogènes par l'aromatase du cytochrome P450, qui est exprimée dans les cellules de Leydig du testicule adulte, et également dans les cellules germinales et les spermatozoïdes [233]. Les cellules épithéliales des canaux efférents expriment à la fois des récepteurs aux androgènes et aux oestrogènes [234, 235]. La caractérisation de la souris  $\alpha$ ERKO, chez qui il manque le récepteur aux oestrogènes  $\alpha$ (ER), a mis en évidence une altération de la structure de la surface apicale de l'épithélium des canaux efférents, cette altération entraîne une anomalie de la réabsorption du liquide luminal qui a pour conséquence son accumulation dans la lumière, et une perte de fertilité [236]. Un phénomène similaire a été décrit chez des rats traités avec l'anti-oestrogène ICI 182,780 [215]. La concentration du sperme et la motilité des spermatozoïdes sont diminués dans ces souris  $\alpha$ ERKO ce qui pourrait être la conséquence d'une diminution de l'expression des aquaporines 1 et 9 dans les canaux efférents [237]. Les androgènes et les oestrogènes régulent l'expression de l'aquaporine 9 dans les canaux efférents [213, 238], mais seuls les androgènes modulent l'expression de l'aquaporine 9 dans l'épididyme [213, 221, 238].

#### 1-6-6.e Interaction protéique

La régulation de la fonction des aquaporines peut aussi être contrôlée par une interaction directe avec d'autres protéines. L'aquaporine 9 contient un motif « SVIM » dans sa partie carboxy terminale. La présence de ce motif qui est d'une part un domaine potentiel de liaison aux protéines possédant un domaine PDZ (Psd-95, Disc large, ZO-1), et qui est d'autre part conservé dans cette protéine au travers des espèces dont l'homme, le rat, la souris, indique que l'aquaporine 9 pourrait interagir directement avec ce type de protéines. L'aquaporine 4 possède également un site d'interaction avec les protéines PDZ. Les domaines PDZ font partie des séquences les plus fréquemment retrouvées, chez l'homme, dans les interactions protéine-protéine. Les protéines ayant un domaine PDZ sont des molécules qui permettent de mettre en relation d'autres protéines entre elles, et ainsi de créer des complexes multiprotéiques (*scaffolding proteins*) processus essentiel pour la phosphorylation de

transporteurs, canaux et récepteurs [239, 240]. La classe majeure de protéines PDZ identifiée à la bordure en brosse des cellules épithéliales est la famille NHERF.

**\*NHERF1 une protéine PDZ (Psd-95, Disc large, ZO-1) [240, 241]**

Les protéines NHERF sont présentes à la bordure en brosse de l'intestin grêle, du colon et des tubules proximaux ainsi que dans d'autres cellules des mammifères. NHERF1 et NHERF2 contiennent trois domaines d'interaction : domaine PDZ-1, domaine PDZ-2 localisés en N-terminal et une séquence localisée en C-terminal qui peut se lier à la famille des protéines merlin/ezrin/radixin/moesin (MERM) qui se lie à l'actine [242-245]. NHERF1 a un rôle dans la régulation dépendante de l'AMP cyclique de différents transporteurs dont NHE3, CFTR ou Npt2 [239, 240, 243, 246, 247] et ROMK [248]. Nous montrons dans notre travail que NHERF1 est retrouvé en grande abondance au pôle apical des cellules principales de l'épididyme.

La localisation dans l'épididyme de NHERF1 et la présence de la séquence « SVIM » à l'extrémité c-terminale de l'aquaporine 9, zone potentielle de liaison à un domaine PDZ, nous a conduit à l'hypothèse de l'existence d'une interaction entre NHERF1 et l'aquaporine 9, qui fait l'objet de la seconde partie de notre travail.

L'aquaporine 4 contient un domaine PDZ qui se lie à la syntrophine [249]. Cette interaction contrôle l'adressage de l'aquaporine 4 à un large complexe protéique qui a un rôle dans l'établissement de la barrière hémato-encéphalique. Le contenu luminal du tractus reproducteur masculin est également protégé immunologiquement par l'établissement d'une barrière sang-tissu, mais jusqu'à présent, les aquaporines n'ont pas été retrouvées impliquées dans ce phénomène.

**\*CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)**

Les travaux de Cheung et al ont montré que CFTR, qui se lie également à des domaines PDZ, pourrait servir à réguler l'aquaporine 9 [192]. Quand elle est co-exprimée avec CFTR dans des ovocytes de *Xenopus*, l'aquaporine 9 induit une augmentation significativement plus grande de la perméabilité membranaire en présence d'AMP cyclique que lorsqu'elle est exprimée seule [193]. D'autre part, au cours de ces mêmes travaux, il a été montré une réduction significative du flux d'eau dans l'épididyme de rat quand celui-ci est perfusé en intraluminal avec une solution hypotonique en présence d'inhibiteur de CFTR (lonidamine) ou de l'aquaporine 9 (phlorétine) indiquant que l'aquaporine 9 est responsable du flux d'eau à travers

l'épithélium de l'épididyme et que CFTR pourrait réguler son activité. Ces résultats sont particulièrement intéressants car des mutations du gène codant pour CFTR sont fréquemment associées à des infertilités masculines, secondaires à des azoospermie d'origine obstructive, absence congénitale de canal déférent, obstruction bilatérale des canaux éjaculatoires, ou obstruction bilatérale des canaux de l'épididyme [250, 251].



## **2-Questions posées et objectifs**

Les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité et leur capacité de fertilisation de l'ovule au cours de leur passage dans les canaux excréteurs de l'appareil génital masculin qui comprend l'épididyme. Les cellules épithéliales de l'épididyme interviennent dans le maintien d'un environnement adéquat pour la maturation et le stockage des spermatozoïdes [9, 21, 40, 227, 252]. La composition du contenu intraluminal de cet organe est précisément régulée.

La lumière de l'épididyme est maintenue à un pH acide en comparaison au pH plasmatique (6,6 dans la tête, 6,8 à l'extrémité distale). Ces conditions permettent la maturation des spermatozoïdes, et leur stockage dans un état quiescent [19, 39]. La H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire exprimée à la membrane apicale des cellules claires et des cellules étroites intervient dans le maintien de cet environnement acide [72-74]. De plus, elle est impliquée de façon ubiquitaire dans l'acidification des organelles intracellulaires. La H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire est composée de treize sous-unités différentes, dont le nom est abrégé par une simple lettre majuscule ou minuscule selon sa position au sein du complexe protéique A, B, C, D, E, F, G, H, a, c, c', c'', d (Tableau 1). La fonction de chacune de ces sous-unités n'est pas encore clairement établie. Certaines de ces sous-unités possèdent plusieurs isoformes codées par des gènes différents et dont l'expression est variable selon leur localisation tissulaire, cellulaire et intracellulaire [78, 80, 117-120]. Des études ont montré que la fonction de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire peut être modulée par le type d'isoforme impliqué. Les différentes associations d'isoformes déterminent la localisation spécifique de la molécule, à la membrane cellulaire ou dans des structures membranaires intracellulaires, le degré de rétention de la pompe à la membrane, la qualité du pompage des protons, le degré de dissociation/association des secteurs V<sub>0</sub> et V<sub>1</sub> [92, 119, 139, 140]. Une connaissance précise de la composition des H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires selon leur site d'expression est une étape nécessaire pour mieux appréhender le rôle de chacune des sous-unités et de leurs isoformes dans le ciblage et la fonction de la pompe à protons. L'étude systématique de l'expression des sous-unités pourrait conduire à la mise en évidence d'une expression dans un site inattendu et ouvrir de nouvelles perspectives sur leur fonction. La mise en évidence d'une localisation unique, très spécifique d'une isoforme pourrait amener cette dernière à devenir la cible de recherche sur des molécules dirigées contre elle, à visée thérapeutique. La H<sup>+</sup>-ATPase de l'épididyme représente ainsi un modèle d'étude qui peut apporter d'une part des informations transposables aux autres épithéliums qui sécrètent des protons

en particulier l'épithélium tubulaire rénal en raison de leur origine embryologique commune, et d'autre part éclairer de manière plus générale sur les phénomènes ubiquitaires d'acidification des organelles intracellulaires, l'appareil de Golgi des cellules de l'épithélium de l'épididyme étant particulièrement développé.

Parallèlement à son rôle dans la détermination et le maintien de la composition acido basique du contenu intra luminal de l'épididyme, l'épithélium de cet organe intervient également dans les mouvements d'eau et de solutés transépithéliaux. En effet, une réabsorption abondante de liquide qui a lieu dans l'épididyme conduit à une augmentation conséquente de la concentration du sperme [42, 179, 185, 253]. Il existe aussi une accumulation de glycérol dans l'épididyme, sa concentration pouvant atteindre jusqu'à 1,15 mM dans la lumière [218]. Il a été proposé que le glycérol serve de substrat aux spermatozoïdes dans l'épididyme. Alors qu'une partie du glycérol était supposée provenir d'un processus de dégradation des lipides de l'épididyme, une diffusion passive significative a été observée. Dans la région distale de l'épididyme, des mouvements d'eau seraient sous la dépendance du canal CFTR par sa sécrétion de chlore contrôlant ainsi la fluidité du contenu intra luminal [186]. L'aquaporine 9 a été identifiée comme étant l'aquaporine principale de l'épididyme [216, 220, 221, 223]. Elle est exprimée de manière constitutive dans les stéréocils de la membrane apicale des cellules principales tout le long de l'épididyme ainsi qu'à la membrane apicale des cellules non ciliées des canaux efférents [216]. Il s'agit d'une aquaglycéroporine qui permet le passage d'un grand nombre de solutés dont le glycérol, l'urée, le mannitol et le sorbitol en plus de l'eau quand elle est exprimée dans des ovocytes [195]. Le contrôle à court terme de l'activité de l'aquaporine 9 n'a jusqu'à présent pas été très bien caractérisé, l'interaction de l'aquaporine 9 avec d'autres protéines pourrait être une voie de régulation. L'aquaporine 9 contient dans ses quatre derniers acides aminés c-terminaux la séquence « SVIM », un domaine potentiel de liaison aux protéines possédant un domaine PDZ. Ces dernières ont pour fonction la mise en relation d'autres protéines entre elles, la création de complexes multiprotéiques (*scaffolding proteins*), processus intervenant dans la phosphorylation de transporteurs, canaux et récepteurs [239, 240]. NHERF1 est une protéine ayant des domaines PDZ, elle a un rôle dans la régulation dépendante de l'AMP cyclique de différents transporteurs dont NHE3, CFTR ou Npt2 [239, 240, 243, 246, 247] et ROMK [248]. Des travaux ont montré que CFTR, qui se lie également à NHERF1,

pourrait servir à réguler l'aquaporine 9 : quand elle est co-exprimée avec CFTR dans des ovocytes de *Xenopus*, l'aquaporine 9 induit une augmentation significativement plus grande de la perméabilité membranaire en présence d'AMP cyclique que lorsqu'elle est exprimée seule ; il existe une réduction significative du flux d'eau dans l'épididyme de rat quand celui-ci est perfusé en intraluminal avec une solution hypotonique en présence d'inhibiteur de CFTR (lonidamine) ou de l'aquaporine 9 (phlorétine) [192, 193]. La connaissance des mécanismes de régulation de la fonction de l'aquaporine 9 dans l'épididyme pourrait permettre dans le futur leur manipulation dans un but de contrôle de la fertilité masculine. L'identification d'une interaction fonctionnelle entre l'aquaporine 9 et CFTR pourrait permettre de mieux appréhender les problèmes de stérilité chez les patients porteurs de mutations de CFTR.

Ce travail de thèse a porté sur l'étude de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire et de l'aquaporine 9, deux protéines membranaires de l'épithélium de l'épididyme, essentielles au maintien de l'homéostasie hydro-électrolytique et acido-basique du sperme. Nous avons étudié :

1) La localisation cellulaire et intra cellulaire des sous unités A, C1, C2, G1, G3, a1, a2, a4, d1 et d2 dans l'épididyme de rat afin de déterminer leur rôle respectif dans le ciblage sélectif des pompes soit dans les organelles intracellulaires soit à la membrane plasmique, de déterminer quelles sont les sous-unités et les isoformes responsables de la sécrétion des protons.

2) La régulation de la fonction de l'aquaporine 9 via l'AMP cyclique et son interaction potentielle avec NHERF1 et CFTR.

### **3-Matériels et méthodes**

Une approche multidisciplinaire incluant des techniques de biologie cellulaire, de biochimie et des études fonctionnelles sur des tubules perfusés *in vitro* a été utilisée afin de caractériser la localisation cellulaire et intra cellulaire des sous-unités A, C1, C2, G1, G3, a1, a2, a4, d1 et d2 de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, d'analyser la régulation à court terme de la fonction de l'aquaporine 9 via l'AMP cyclique et son interaction potentielle avec NHERF1, de rechercher une interaction entre l'aquaporine 9 et CFTR dans l'épididyme de rat.

### **3-1 Biologie cellulaire**

#### **3-1-1 Anticorps et peptides**

Des anticorps polyclonaux de lapins, immunopurifiés, dirigés contre les isoformes des sous-unités C1, C2, G1, G3, a1, a2, a4, d1 et d2 de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire ont été utilisés. Ces anticorps avaient été caractérisés lors d'une étude précédente [118]. Un anticorps polyclonal de poulet immunopurifié dirigé contre la sous-unité E2 de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire a servi à l'identification des cellules claires et des cellules étroites [55, 75, 126]. Un nouvel anticorps de lapin, immunopurifié, dirigé contre les 10 derniers acides aminés (CMQNAFRSLE) de la partie c-terminale des la sous-unité A de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire a été caractérisé et employé au cours de ce travail. Un anticorps polyclonal de lapin, immunopurifié, dirigé contre un peptide correspondant aux 15 derniers acides aminés de la partie c-terminale de l'aquaporine 9 de rat (PSENNLEKHELVSIM), caractérisé lors d'études précédentes [216, 221] a été utilisé pour l'immunocytochimie et les immunoprécipitations. Un anticorps immunopurifié de poulet dirigé contre l'aquaporine 9 de rat (Chemicon International, Temecula, CA, États-Unis) a servi à révéler au cours de la technique de *western* l'aquaporine 9 précipitée par l'anticorps anti-aquaporine 9 de lapin. Un anticorps polyclonal de poulet, immunopurifié, dirigé contre la protéine de fusion GST-NHERF1, correspondant aux acides aminés 270-358 (IC270), a été généré de la même façon que l'anticorps de lapin dirigé contre la même protéine, décrit dans une étude précédente [245]. Un anticorps monoclonal, dirigé contre le domaine NBF2 du CFTR humain (NeoMarkers, CA, États-Unis)) a été employé pour l'immunocytochimie, les *western blots* et les immunoprécipitations. Un anticorps anti-CFTR de lapin, immunopurifié, dirigé contre la partie N-terminale de CFTR a également été utilisé dans les *western blots*. L'anticorps monoclonal de souris dirigé

contre la protéine TGN38 utilisé pour identifier le réseau trans-Golgi provient de chez BD Transduction Laboratories, États-Unis. Les anticorps secondaires suivants, immunopurifiés, ont été utilisés : un anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de lapin conjugué à la fluorescéine isothiocyanate (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, États-Unis), un anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de lapin conjugué à l'indocarbocyanine (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, États-Unis), un anticorps d'âne dirigé contre les IgY de poulet conjugué à l'indocarbocyanine (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, États-Unis), un anticorps d'âne dirigé contre les IgY de poulet conjugué à la fluorescéine isothiocyanate (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, États-Unis), un anticorps d'âne dirigé contre les IgG de souris conjugué à l'indocarbocyanine (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, États-Unis). Un peptide correspondant aux 15 derniers acides aminés de l'extrémité c-terminale de l'aquaporine 9 de rat a été synthétisé par l'unité Peptide/Protein Core Facility du Massachusetts General Hospital et a été biotinylé, pour partie, en N-terminal.

### **3-1-2 Immunofluorescence : microscopie conventionnelle et confocale**

Des rats Sprague-Dawley de sexe masculin, adultes (achetés chez Charles River laboratories, Wilmington, MA, États-Unis) ont été anesthésiés avec du Nembutal (0,5 ml par voie intrapéritonéale, Abbott Laboratories, North Chicago, IL, États-Unis) et perfusés via le ventricule gauche avec un tampon phosphate salin (NaCl 0.9% dans du phosphate de sodium 10mM, pH 7.4) puis avec un fixateur contenant 4% de paraformaldéhyde, 10mM de périodate de sodium, 75 mM de lysine et 5% de saccharose dans un tampon de 0.1M de phosphate de sodium (PLP), comme cela a été décrit dans des travaux précédents [55, 67, 72]. L'épididyme et le canal déférent ont été immergés dans une solution de 30% de saccharose dans du tampon phosphate salin (cryoprotection) puis inclus, pour section au froid, dans du Tissue-Tek OCT compound 4583 (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, États-Unis) et rapidement congelés. Des coupes de 5  $\mu$ m ont été réalisées avec un cryostat (Reichert-jung 2800 Frigocut cryostat de chez Leica Microsystems, Inc., Bannockburn, IL, États-Unis) et placées sur des lames (Superfrost/Plus microscope slides, Fisher Scientific, Pittsburg, PA, États-Unis). Pour la microscopie en immunofluorescence indirecte, les coupes ont été hydratées 15 min dans du tampon

phosphate salin et traitées pendant 4 min avec du SDS à 1%, une procédure permettant de révéler les antigènes décrite antérieurement [254]. Les coupes ont ensuite été lavées dans du tampon phosphate salin (3 fois 15 min) puis saturées dans du tampon phosphate salin contenant 1% d'albumine pendant 15 min. Les coupes ont été incubées avec les anticorps primaires, dans une chambre humide, pendant 90 min à température ambiante ou pendant une nuit à 4<sup>0</sup>C. Puis les coupes ont été lavées dans du tampon phosphate salin enrichi en NaCl (2.7% NaCl dans du phosphate de sodium 10mM, pH 7.4) deux fois 5 min et une fois dans du tampon phosphate salin standard. Puis les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire pendant une heure à température ambiante, puis à nouveau lavées comme précédemment. Les lames ont été montées avec du Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, États-Unis). Certaines coupes ont été doublement marquées par une incubation supplémentaire avec un anticorps primaire d'une espèce différente de la première, suivie d'une incubation avec l'anticorps secondaire approprié.

Des images numérisées ont été obtenues avec un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse 800, Nikon Instruments, Inc., Malville, NY, États-Unis) équipé d'un appareil photo Hamamatsu Orca 100 CCD (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, États-Unis), analysées avec le programme IPLab (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA, États-Unis), et importées dans le programme Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, États-Unis). Certaines images ont été prises en utilisant un microscope confocal Radiance 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, États-Unis), en utilisant le programme LaserSharp 2000 version4.1 et importées dans Adobe Photoshop sous forme de fichiers TIFF.

### **3-1-3 Immunomarquage à l'or et microscopie électronique**

Les rats ont été perfusés comme décrit précédemment avec une solution contenant du paraformaldéhyde-lysine-périodate (PLP) et 0,01% de glutaraldéhyde. Pour obtenir une cryoprotection, des petits morceaux de tissu ont été immergés dans une solution de saccharose (saccharose 2,3M dans du tampon phosphate salin). Des coupes ultra-fines ont été réalisées sur un cryo-ultra-microtome Leica EM FCS à -80<sup>0</sup>C et collectées sur des grilles de nickel recouvertes de Formvar. Les sections ont été bloquées pendant 10 min avec une goutte contenant 5% (v/v) de sérum de chèvre et 1% d'albumine bovine (poids/v) dans du tampon phosphate salin.



L'anticorps contre la sous-unité A a été appliqué à une concentration finale de 1/100 dans du DAKO (DAKO Corp., Carpinteria, CA, États-Unis) pendant une heure à température ambiante. Après plusieurs lavages dans du tampon phosphate salin, l'anticorps a été marqué avec un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à des particules d'or (Ted Pella, Inc, Redding, CA, États-Unis) utilisé à une concentration finale de 1/20 dans du DAKO, pendant une heure à température ambiante. Après plusieurs lavages dans de l'eau distillée, les sections ont été colorées avec des gouttes glacées d'une solution d'uranyl acétate/tylose pendant 10 minutes suivi d'un séchage à l'air. Les sections ont été examinées dans un microscope électronique Philips CM 10 à 80kV.

## **3-2 Biochimie**

### **3-2-1 Extraction protéique**

Des épididymes ont été prélevées sur des rats. Les tissus ont été coupés en petits morceaux et lavés plusieurs fois dans du tampon phosphate salin, contenant des inhibiteurs de protéase, afin de retirer le maximum de sperme. Les tissus ont été homogénéisés dans un tampon (10 ml par g de tissu) contenant 250mM de saccharose, 18mM de Tris, 1 mM d'EDTA, et des inhibiteurs de protéases (Complete Proetase Inhibitor, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, États-Unis), ajusté au pH 7.4 avec de l'HEPES, à l'aide d'un homogénéisateur PRO 200 équipé d'un pilon (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, États-Unis) en téflon ajusté à la taille d'un flacon en verre. La concentration en protéine a été déterminée par la technique utilisant l'acide bicinchoninic (BCA protein determination kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, États-Unis), l'albumine servant de standard. Avant électrophorèse les extraits protéiques ont été dilués dans du tampon Laemmli et bouillis pendant 1 min.

### **3-2-2 Préparation des membranes apicales**

Les membranes apicales des cellules épithéliales ont été isolées par la technique de précipitation au magnésium des bordures en brosse, comme cela a déjà été décrit [216, 221]. Après anesthésie des rats, les épididymes ont été prélevés, lavés, broyés et homogénéisés selon le procédé décrit précédemment dans le paragraphe 3-2-1 Extraction protéique. L'homogénat obtenu a été incubé avec du  $MgCl_2$  à 10mM, sur de la glace, pendant 20 min, puis centrifugé pendant 15

min à 7700 g. Seul le surnageant a été gardé et à nouveau centrifugé à 20000 g pendant 30 min. Le précipité formé a été remis en suspension dans 200  $\mu$ l d'une solution de resuspension (KCl 50mM, Tris 5mM, ajusté à un pH 7,4 avec de l'HEPES) à l'aide d'une aiguille de 25G5/8 montée sur une seringue de 1 ml. L'échantillon obtenu a été dilué dans la solution de suspension (volume égal au volume initial) et homogénéisé à nouveau avec le même matériel que précédemment. Le nouvel homogénat a été centrifugé à 1900g pendant 15 min, seul le surnageant a été gardé et centrifugé une dernière fois à 30900g pendant 15 min. Ce dernier culot, enrichi en bordure en brosse, a été remis en suspension avec 150 $\mu$ l de solution de suspension à travers une aiguille de 25G5/8 montée sur une seringue de 1 ml puis congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. Le laboratoire de Sylvie Breton a déjà montré que le contenu en aquaporine 9 était significativement augmenté dans les préparations de bordure en brosse d'épididyme [216]. La concentration en protéine a été déterminée selon le procédé décrit précédemment dans le paragraphe 3-2-1 Extraction protéique.

### **3-2-3 Immunoprécipitations (IP) et co-immunosprécipitations (co-IP)**

L'anticorps de lapin anti-aquaporine 9 a été conjugué à des billes magnétiques recouvertes de protéine A (Dynabeads Protein A, Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway) selon les instructions du fabricant. Les préparations de bordures en brosse ont été pré-incubées deux fois 30 min, consécutivement, avec des billes magnétiques seules, non conjuguées. Les immuno-précipitations ont été effectuées avec 100 $\mu$ l de billes magnétiques conjuguées à l'anticorps anti-aquaporine 9 dans 1 ml de solution « IP » (Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, Tris pH 7,4 10mM, EDTA 1 mM, EGTA 1mM, Na-orthovanadate 0,2mM, IGEPAL Ca-630 0,5mM, glycérol 10%, sérumalbumine bovine 1%, inhibiteurs de protéases) pendant 2 heures à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après trois lavages avec 1ml de la solution « IP » les billes ont été remises en suspension dans 50 $\mu$ l de tampon Laemmli et incubées à température ambiante pendant 45 min. Les billes ont été séparées du surnageant en utilisant un portoir magnétique (DyNeal Magnetic Particle Concentrator, DyNeal Biotech ASA, Oslo, Norvège). L'immunoprécipité (25 $\mu$ l) a été ensuite soumis à électrophorèse. Pour certaines expériences, l'anticorps anti-aquaporine 9 a été pré-incubé avec le peptide d'aquaporine 9 non biotinylé, avant son immobilisation sur les billes magnétiques.

### **3-2-4 Technique de *Western blot***

Les différents échantillons protéiques ont été déposés dans un gel de Tris-glycine polyacrylamide 4%-20% (PAGEr Duramide Precast Gels, 4%-20% Tris-Glycine Gels, Cambrex, Rockland, ME, États-Unis). Après séparation des protéines par électrophorèse en présence de SDS, elles ont été transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (Immuno-Blot Polyvinylidene difluoride membrane, Bio-Rad Laboratories, États-Unis). Les membranes ont été saturées dans un tampon contenant du TRIS et 5% de lait écrémé puis incubées la nuit à 4<sup>0</sup>C avec les anticorps primaires dilués à une concentration de 0,5 µg/ml dans un tampon contenant du TRIS et 2,5% de lait écrémé. Après trois lavages dans un tampon contenant du TRIS et 0,1% de Tween 20, et une saturation de 15 min dans un tampon contenant du TRIS et du lait, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire (anticorps d'âne dirigé contre les IgG de lapin, ou anticorps de chèvre dirigé contre les IgY de poulet) conjugué à la peroxydase du raifort (Jackson ImmunoResearch laboratories, États-Unis) pendant une heure à température ambiante. Après cinq autres lavages, la fixation de l'anticorps a été révélée par chémoluminescence en utilisant un Kit ECL (Western Lightning Chemiluminescence reagent, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, États-Unis) et des films Kodak-X-Omat blue XB-1.

### **3-2-5 Déglycosylation**

Après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-aquaporine 9, 10µl du précipité a été incubé en présence de soit la N-GlycosidaseF (5U, PNGaseF *Chryseobacterium* (Flavobacterium) meningosepticum, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, États-Unis) soit un mélange contenant à la fois de la Neuraminidase (1mU) et de la O-Glycosidase (0,5 mU ; Roche, Indianapolis, IN, États-Unis), dans un volume final de 21µl. Les réactions des endoglycosidases ont été incubées à 37°C toute la nuit, et arrêtées par l'ajout d'un tampon dénaturant. Le *western blot* a été réalisé en utilisant l'anticorps anti-aquaporine 9 de poulet.

### **3-2-6 Déphosphorylation**

Un homogénat d'épididyme total (330µg/50µl) a été incubé avec 100µl d'une solution contenant (TRIS 1mM, TRIS-HCl pH 7,5 50mM) pendant 10 min à 30°C. De

la phosphatase alcaline d'intestin de veau (30U/30 $\mu$ l, Calbiochem, Darmstadt, Allemagne) a ensuite été ajoutée (de l'eau a été ajoutée dans le contrôle) et la solution a été incubée pendant 15 min à 30°C. La déphosphorylation a été stoppée par l'ajout de 180 $\mu$ l de tampon de Laemmli (2X). Une électrophorèse et un *western blot* ont ensuite été réalisés à partir de 30 $\mu$ l (soit 27  $\mu$ g de protéine) de la solution finale.

### **3-2-7 Préparation des protéines recombinantes dérivées de la protéine NHERF1**

La protéine NHERF1 humaine entière (acides aminés 1-358), et les protéines NHERF1 tronquées, de fusion, contenant PDZ1 (acides aminés 11-97), PDZ2 (acides aminés 149-236), PDZ1 et PDZ2 (acides aminés 11-236), PDZ2 et la partie c-terminale (acides aminés 149-358), et la protéine NHERF1 amputée des deux domaines PDZ (acides aminés 270-358) ont été amplifiées par PCR, sous-clonées dans les sites *Bam*HI-*Not*I de pGEX4T (Amersham Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ, États-Unis) et exprimées dans *Escherichia coli* comme décrit dans une étude antérieure [244]. Après une première phase de purification avec des billes de glutathion (Glutathione-Sepharose 4B, Amersham Biosciences Piscataway, NJ, États-Unis), les protéines fusionnées à la GST ont été déposées dans un gel de TRIS-glycine polyacrylamide 4%-20% (PAGEr Duramide Precast Gels, 4%-20% Tris-Glycine Gels, Cambrex, Rockland, ME, États-Unis). Après séparation des protéines par électrophorèse en présence de SDS, elles ont été transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (Immuno-Blot Polyvinylidene difluoride membrane, Bio-Rad Laboratories, États-Unis). Après coloration au Rouge Ponceau (Ponceau S Stain, Boston Bioproduct, Ashland, MA, États-Unis), les bandes d'intérêt ont été découpées et leur contenu élué dans une solution d'éluion (TrisHCl 50mM, pH 9, 2% (w/v) SDS, Triton X-100 1% (v/v), 0,2 ml/cm<sup>2</sup> de membrane). Cette préparation protéique pure était ensuite congelée à -20°C jusqu'à utilisation.

### **3-2-8 Analyses de recouvrement (*overlay*)**

Les différentes protéines de fusion dérivées de la protéine NHERF1 ont été soumises à électrophorèse et transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène. Les membranes ont ensuite été saturées dans un tampon contenant

du TRIS et 10% de lait écrémé, puis incubées deux fois une heure. La première heure avec de l'avidine (0,02mg/ml, avidine de blanc d'oeuf, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis), et la deuxième avec de la biotine (0,1 mg/ml, d-Biotine, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis) afin de bloquer les sites avidine et biotine. Les membranes ont été ensuite incubées avec le peptide biotinylé correspondant à l'extrémité c-terminale de l'aquaporine 9 (25µg/ml) toute la nuit à 4°C, puis lavées. Elles ont finalement été incubées avec de l'avidine conjuguée à la peroxydase du raifort (dilution 1/2000, ExtrAvidin Peroxydase conjugate, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis). L'accrochage éventuel du peptide était révélé par chémoluminescence en utilisant un Kit ECL (Western Lightning chemiluminescence reagent, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, États-Unis) et des films Kodak-X-Omat blue XB-1. Tous les lavages et incubations ont été réalisés dans un tampon contenant du TRIS et 0,1% de Tween 20. Après le développement, les membranes ont été colorées avec du Bleu de Coumassie afin de confirmer la pureté des protéines de fusion.

### **3-2-9 Préparation des protéines recombinantes dérivées de la partie c-terminale de l'aquaporine 9**

Un fragment (paires de bases 1055-1163) d'ADN complémentaire d'aquaporine 9 de rat (Gen Bank accession number AF016406, fourni par Dr Matthias Hediger), correspondant à la partie c-terminale cytosolique (acides aminés MKAEPSENNLEKHEL SVIM) de l'aquaporine 9 de rat [195] a été amplifié par PCR (AQP9-c-ter). Le fragment a ensuite été digéré et inséré dans les sites Pst1 et Spe1 du c-vecteur d'expression pET41a (Novagen, San Diego, CA, États-Unis). La GST a été fixée à la partie N-terminale de AQP9-c-ter. Dans certaines protéines de constructions, le motif SVIM de la partie c-terminale de AQP9-c-ter a été muté en GGGG ou en SAKH. La séquence SAKH correspond aux quatre derniers acides aminés de la sous-unités B2 de la H<sup>+</sup> ATPase vacuolaire dont il a été montré qu'elle n'interagissait pas avec NHERF1 [126], cette séquence est ainsi un contrôle négatif. SVIM a aussi été supprimé (GST-AQP9-truncated) afin d'obtenir une protéine tronquée. Les mutations ont été réalisées en utilisant un kit (QuickChange Site-directed mutagenesis kit(Statagene, La Jolla, CA, États-Unis). Pour l'expression protéique, les cellules compétentes BL21(DE3)pLysS ont été transformées avec les différents produits de constructions. La fidélité des produits de construction a été

confirmée par analyse de leur séquence. Des cultures à petite échelle, sur la nuit, ont été débutées à partir de stock de glycérol et ont été cultivées dans du bouillon LB à 37°C. Deux ml de la culture de la nuit ont été ajoutés à 200ml de bouillon LB contenant 30µg/ml de kanamycine. Quand les cultures ont atteints une OD<sub>600</sub> de 0,4-0,6, elles ont induites avec 0,4mM de ITPG pendant 4 heures à 37°C. Les bactéries ont été lavées et remises en suspension dans 25 ml de solution saline froide contenant 2,5mM d'EDTA. La lyse a été obtenue avec une *French press*, à 100lb/in<sup>2</sup>. Le lysat obtenu a été centrifugé à 10000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a été aliquoté et stocké à -80°C.

### **3-2-10 Co-précipitation (*Pull down*)**

Les différentes protéines dérivées de l'aquaporine 9 fusionnées à la GST ont été immobilisées sur des billes de sépharose recouvertes de glutathion (Amersham biosciences). Des bordures en brosse d'épididyme (150µg) ont été remises en suspension dans une solution (TRIS 20mM, EDTA 0,1 mM, NaCl 100mM, Triton X-100 1%, IGEPAL 1%, pH 7,40) et incubées avec les protéines de fusion immobilisées sur les billes, dans un rotateur pendant deux heures à 4°C. Après récupération par centrifugation, les billes ont été lavées et remises en suspension dans du tampon Laemmli. Les échantillons ont été chauffés pendant 5 min puis soumis à un *western blot* en utilisant l'anticorps anti-NHERF1 de poulet.

## **3-3 Etudes fonctionnelles sur des tubes d'épididyme perfusés in vitro**

Des tubes ont été disséqués à partir des segments initiaux de l'épididyme dans une solution de préservation réfrigérée contenant 56 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 140 mM de saccharose, comme décrit précédemment [55]. Ils ont ensuite été transférés dans une chambre de perfusion placée sur le plateau d'un microscope inversé Olympus IMT-2 et des perfusions intratubulaires et péri-tubulaires ont été réalisées (solutions de perfusions décrites dans le tableau 2). La qualité de la solution péri-tubulaire était basée sur le plasma normal, le résultat des études de micro-ponctions d'épididymes ont servi de base à l'établissement de la nature de la perfusion intratubulaire [42]. Cette solution contrôle contenait 120 mM de raffinose ( $\alpha$ -D-galactopyrannosyl (1->6) $\alpha$ -D-glucopyrannosyl (1->2) $\beta$ -D-fructofurannoside) soluté auquel les cellules de

l'épididyme sont imperméables. Après une période contrôle initiale, la perméabilité apicale au glycérol de la membrane était estimée à partir de l'augmentation initiale de volume cellulaire induite par le remplacement du raffinose de la solution intratubulaire par du glycérol, sans modification de la tonicité de la solution. Des images digitalisées des tubules perfusés ont été prises toutes les 15 à 30 secondes, avec un appareil photo Nikon Coolpix 995 et ont été analysées avec le logiciel IPLab (Scanalytics, Fairfax, VA, États-Unis). A chaque temps relevé, la hauteur des cellules épithéliales a été mesurée à 5 ou 6 endroits différents le long du tube et la moyenne en a été faite. Le volume cellulaire a été évalué à partir de ces valeurs et a été exprimé en pourcentage par rapport au volume contrôle initial. Cette technique a déjà été utilisée avec des tubules proximaux de rein [255]. Le taux initial de gonflement cellulaire a été déterminé par quatre valeurs de volume cellulaire mesurées à 15 secondes d'intervalle pendant la première minute de perfusion de glycérol. Les effets de l'ajout à la perfusion de 500 $\mu$ M de Phlorétine, un inhibiteur de l'aquaporine 9, ou de 1mM de chlorophénylthio AMP cyclique (cpt-AMPC), forme d'AMP cyclique qui peut pénétrer dans les cellules, sur l'oedème cellulaire induit par le glycérol ont été examinés. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test t-Student pour des expériences appariées et non appariées.

**Tableau 2** : Composition des solutions intraluminale et basolatérale utilisées pour la perfusion des épидидymes in vitro.

	<b>Solution intraluminale de contrôle (mM)</b>	<b>Solution avec glycérol (mM)</b>	<b>Solution basolatérale (mM)</b>
<b>NaCl</b>	55	55	55
<b>Kcl</b>	5	5	5
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	-	-	1,2
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1	1	1
<b>GlucamineCl</b>	-	-	10
<b>Raffinose</b>	<b>120</b>	<b>0 (ou 60)</b>	-
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1,8	1,8	1,8
<b>MgCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O</b>	1,2	1,2	-
<b>Na acétate</b>	4	4	4
<b>Na<sub>3</sub> Citrate</b>	1	1	1
<b>Glucose</b>	5,5	5,5	5,5
<b>Alanine</b>	6	6	6
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	3	3	3
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	5	5	25
<b>Glycérol</b>	-	<b>120 (ou60)</b>	-
<b>Na Cyclamate</b>	25	25	-
<b>Osmolalité (mOsm/kg H<sub>2</sub>O)</b>	<b>331</b>	<b>334</b>	<b>297</b>
<b>pH</b>	6,85	6,85	7,41



## **4-Résultats**

#### **4-1 Description des localisations différentes des isoformes de plusieurs sous-unités de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire dans l'épididyme de rat**

*Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymidis*

C. Pietrement, G-H. Sun-Wada, N. Da Silva, M. McKee, V. Marchansky, D. Brown, M. Futai, S. Breton

Biology of Reproduction, 2006, 74 : 185-94

Dans l'épididyme et le canal déférent, la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, localisée au pôle apical des cellules étroites et des cellules claires, est nécessaire à l'établissement d'un pH intraluminal acide. La présence d'un pH bas est importante pour la maturation des spermatozoïdes et leur stockage dans un état quiescent. La H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire participe également à l'acidification d'organelles intracellulaires. La H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire est composée de nombreuses sous-unités et plusieurs de ces sous-unités ont plusieurs isoformes. Jusque là, uniquement les sous-unités ATP6V1B1, ATP6V1B2, ATP6V1E2, appelées précédemment les sous-unités B1, B2 et E ont été décrites dans l'épididyme de rat. Dans cette étude, nous rapportons la localisation des isoformes des sous-unités ATP6V1A, ATP6V1C1, ATP6V1C2, ATP6V1G1, ATP6V1G3, ATP6V0A1, ATP6V0A2, ATP6V0A4, ATP6V0D1 et ATP6V0D2, appelées précédemment A, C1, C2, G1, G3, a1, a2, a4, d1 et d2 dans les cellules épithéliales de l'épididyme et du canal déférent de rat. Un marquage fort du pôle apical des cellules claires et des cellules étroites a été mis en évidence pour toutes les sous-unités sauf pour l'isoforme ATP6V0A2. Les sous-unités ATP6V0A2 et ATP6V1A ont été détectées dans des structures intra-cellulaires très proches, mais distinctes, du réseau trans-Golgi dans les cellules principales, les cellules étroites et les cellules claires, enfin la présence de la sous-unité ATP6V0D1 a été détectée au pôle apical des cellules principales en l'absence des autres sous-unités à ce niveau. En conclusion, plus d'une isoforme des sous-unités ATP6V1C, ATP6V1G, ATP6V0A et ATP6V0D de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire sont présentes dans l'épithélium de l'épididyme et du canal déférent. Nos résultats confirment que les cellules claires et les cellules étroites sont bien équipées pour sécréter activement

des protons. De plus, les fonctions diverses de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire pourraient être établies à travers l'utilisation spécifique de certaines isoformes. Dans les cellules principales, l'isoforme ATP6V0D1 pourrait avoir une fonction physiologique différente de son rôle dans le transport de proton au sein de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire.

Figure 15 ref [124]

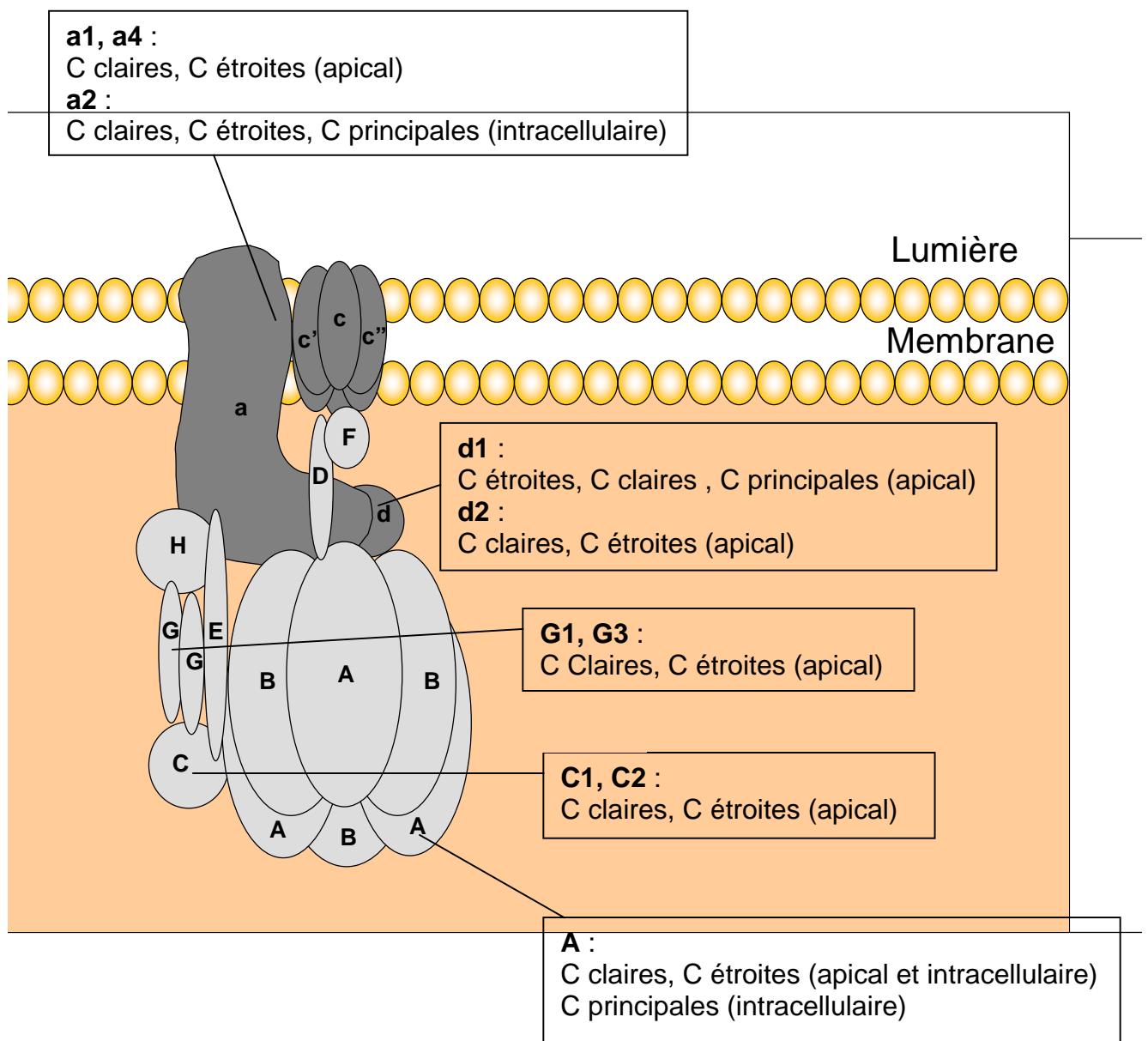


Figure 15: Schéma de la  $H^+$ -ATPase vacuolaire avec l'indication de la localisation des isoformes des sous-unités que nous avons étudiées. (C remplace cellule). D'après la référence 124.

## **4-2 L'aquaporine 9 est une protéine qui se lie aux protéines ayant des domaines PDZ, elle interagit avec NHERF1 et est activée par l'AMP cyclique**

*Aquaporin 9 is a PDZ binding protein that interacts with NHERF1 and is activated by cAMP*

C. Pietrement, C. Silberstein, M. James, M. Marsolais, N. Da Silva, A. Van Hoek, D. Brown, R. Laprade, V. Ramesh, S. Breton

Article actuellement soumis à Journal of Biological Chemistry

Le transport d'eau et de solutés à travers les membranes cellulaires est une fonction biologique cruciale, qui est établie principalement par les aquaporines et les aquaglycéroporines. La régulation de la fonction de ces protéines membranaires est encore imparfaitement comprise. En utilisant l'appareil reproducteur masculin, dans lequel le transport d'eau et de glycérol sont essentiels à l'établissement de la fertilité masculine, comme un système modèle, nous rapportons une nouvelle voie de régulation de l'aquaporine 9. L'aquaporine 9 est l'aquaglycéroporine principale de l'épididyme, du foie et des leucocytes périphériques, sa portion c-terminale contient le motif « SVIM », zone de liaison potentielle aux domaines PDZ. Nous montrons que la protéine NHERF1 et l'aquaporine 9 sont co-localisées à la membrane apicale des cellules principales de l'épididyme et du canal déférent. Des expériences de co-immunoprécipitation et des analyses de recouvrement (*overlays*) indiquent que NHERF1 et aquaporine 9 interagissent l'une avec l'autre et que l'aquaporine 9 se lie à la fois aux domaines PDZ1 et PDZ2 de NHERF1, avec une affinité apparente plus grande pour PDZ1 que pour PDZ2. Des co-précipitations (*pull-down*) montrent que le motif « SVIM » de la partie c-terminale de l'aquaporine 9 est essentielle à l'interaction avec la protéine NHERF1 native. Des expériences fonctionnelles, sur des tubules d'épididyme perfusés *in vitro*, montrent une grande perméabilité de la membrane apicale au glycérol. Cette perméabilité est inhibée par un inhibiteur de l'aquaporine 9, la phlorétine, et est remarquablement activée par l'AMP cyclique. Nous proposons que l'interaction entre l'aquaporine 9 et NHERF1 pourrait faciliter l'activation de l'aquaporine 9 par l'AMP cyclique. L'aquaporine 9 est présente dans d'autres types cellulaires impliqués dans le transport du glycérol et de l'eau et son interaction

potentielle avec des protéines ayant des domaines PDZ pourrait représenter un mécanisme commun de régulation de la fonction de l'aquaporine 9. De plus, d'autres aquaporines, dont l'aquaporine 4 et l'aquaporine 2, possèdent des motifs pouvant se lier à des domaines PDZ dans leur portion c-terminale et pourraient donc aussi interagir avec des membres de la famille NHERF.

### 4-3 L'aquaporine 9 interagit avec CFTR

Des communications affichées ont été réalisées avec les données de l'article précédent et celles exposées dans ce paragraphe. Elles ont été présentées aux congrès suivants : *The futur of male contraception*, Seattle, 2004 ; *Symposium of post-meiotic approaches to male contraception*, Hong-Kong, 2005 ; 4<sup>ème</sup> conférence internationale sur les aquaporines, Bruxelles, 2005.

*Contribution of the major water channel of epididymis, AQP9, to apical water and solute permeability : regulation by cAMP and potential participation of NHERF1 and CFTR.*

C. Pietrement, N. Pastor-Soler, M. James, M. Marsolais, R. Laprade, A. Van Hoek, V. Ramesh, D. Brown, S. Breton.

Il a été proposé que la sécrétion d'eau, dans la portion distale de l'épididyme et dans le canal déférent, serait sous la dépendance de la sécrétion de chlore par CFTR permettant le contrôle de la fluidité du contenu intra luminal [186, 192]. Des travaux antérieurs, basés sur des études fonctionnelles, ont montré que CFTR pourrait intervenir dans la régulation de l'activité de l'aquaporine 9. Quand elle est co-exprimée avec CFTR dans des ovocytes de *Xenopus*, l'aquaporine 9 induit une augmentation significativement plus grande de la perméabilité membranaire en présence d'AMP cyclique que lorsqu'elle est exprimée seule. D'autre part, le flux d'eau dans l'épididyme de rat est réduit significativement quand celui-ci est perfusé en intraluminal avec une solution hypotonique en présence d'inhibiteur de CFTR (lonidamine) ou de l'aquaporine 9 (phlorétine) [193]. Dans le présent travail, nous avons mis en évidence une interaction entre l'aquaporine 9 et CFTR. L'aquaporine 9 et CFTR sont des protéines qui peuvent se lier à des domaines PDZ et en particulier à NHERF1. Nous proposons que la régulation de la fonction de l'aquaporine 9 par l'AMP cyclique pourrait se faire sous la dépendance de CFTR via leur interaction commune avec NHERF1.

#### 4-3-1 Co-localisation de l'aquaporine 9 et de CFTR

Par immunofluorescence, nous avons localisé la protéine CFTR dans les segments initiaux de l'épididyme, à la membrane apicale des cellules principales. Un double marquage a permis de mettre en évidence une co-localisation de l'aquaporine 9 avec CFTR à la base des microvillosités des cellules principales (Figure 16).

#### 4-3-2 Co-immunoprécipitation de CFTR avec l'aquaporine 9

Nous avons d'abord contrôlé la spécificité de nos anticorps dirigés contre CFTR dans d'épididyme de rat. Nous avons réalisé un *western blot* à partir de préparations de membranes apicales, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CFTR a révélé une bande autour de 120kDa correspondant au poids moléculaire attendu (Figure 17-A). Une immunoprécipitation à partir de préparations de membranes apicales, avec l'anticorps monoclonal dirigé contre CFTR, a été suivie d'un *western blot* réalisé avec un anticorps de lapin dirigé contre CFTR (Figure 17-B). Ce *western blot* montre qu'une quantité significative de CFTR a été immunoprécipitée par rapport au contrôle. Nous avons ensuite réalisé une co-immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-aquaporine 9 dans l'immunoprécipitation et un anticorps anti-CFTR dans le *western blot*. La figure 17-C qui montre une bande significative correspondant à CFTR (ligne IP AQP9) et absente du contrôle (ligne IP control) indique que CFTR a été co-immunoprécipité avec l'aquaporine 9 ce qui est en faveur d'une interaction entre ces deux protéines. Les bandes non spécifiques révélées au cours de cette expérience sont pour partie dues à l'anticorps secondaire lui même comme le montre le *western blot* de la figure 17-D.



Figure 16

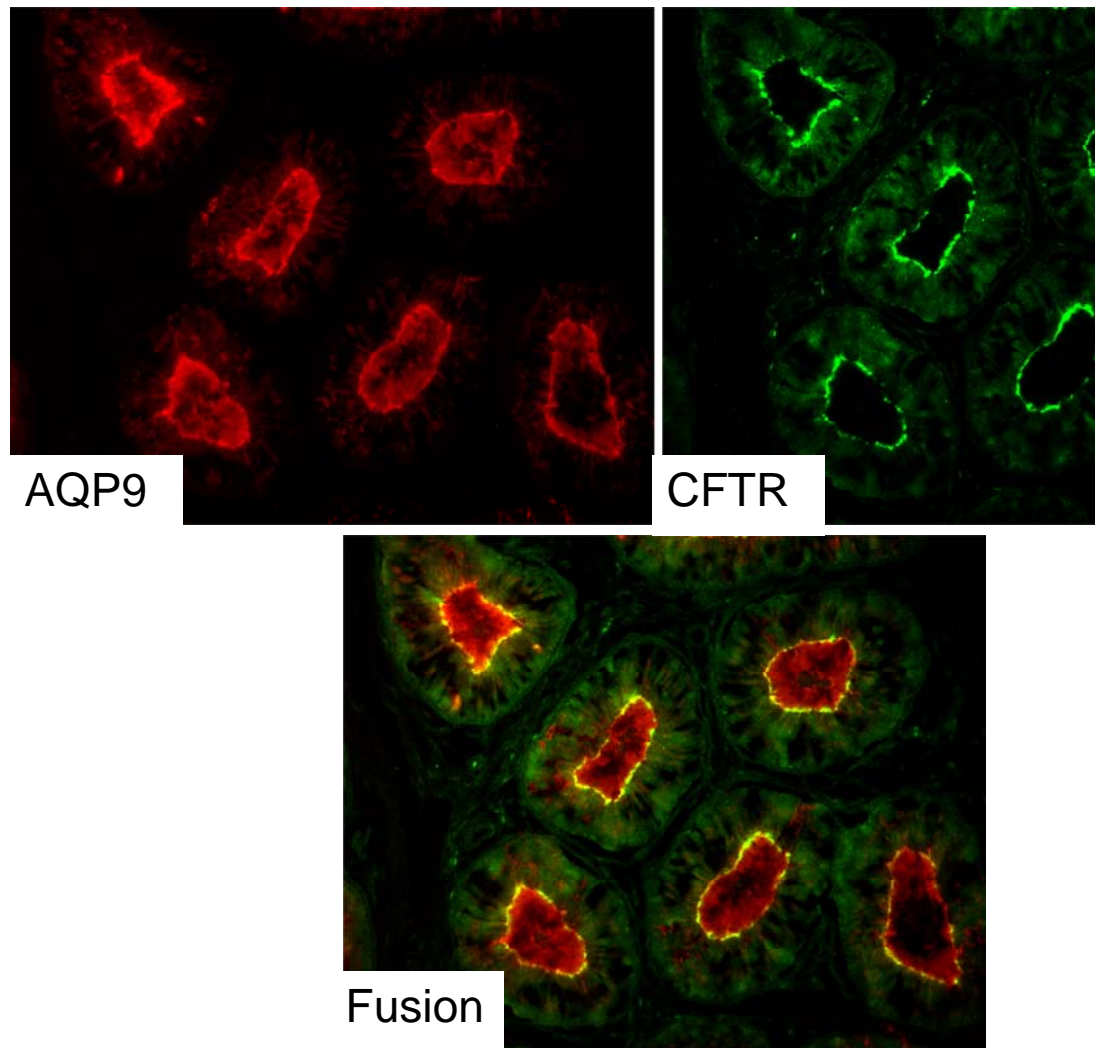


Figure 16 : Coupe au niveau des segments initiaux d'un épидидyme de rat doublement marquée avec des anticorps dirigés contre l'aquaporine 9 (rouge) et CFTR (vert). CFTR est localisé à la base des microvillosités de la membrane apicale des cellules principales où il est co-localisé avec l'aquaporine 9 (en jaune).

**Figure17**

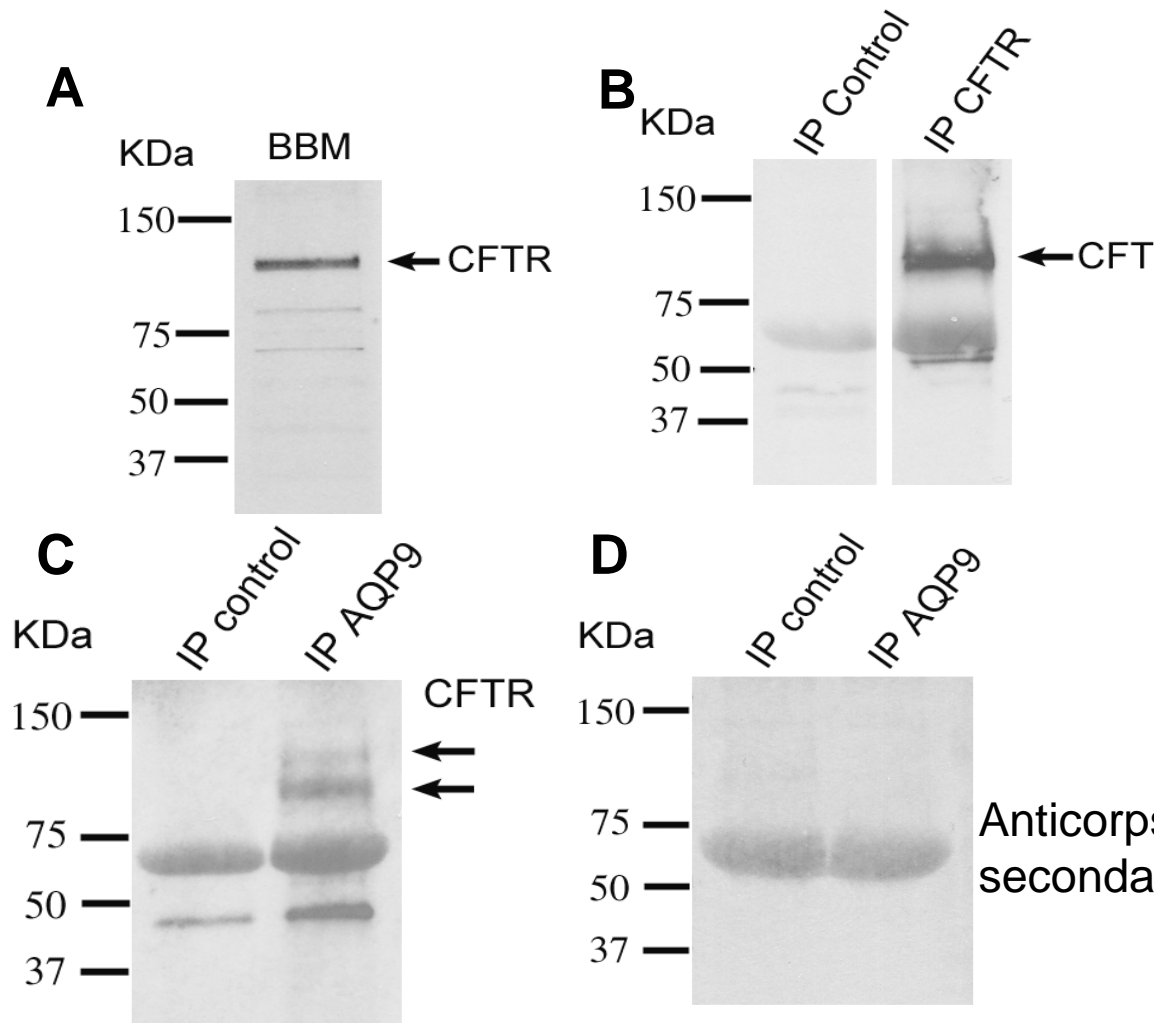


Figure 17 : CFTR est co-immunoprécipité avec l'anticorps dirigé contre l'aquaporine 9. A) *Western-blot* réalisé sur des préparations de membranes apicales d'épididyme de rat (BBM) avec un anticorps anti-CFTR montrant une bande autour de 120kDa. B) Immunoprécipitation de CFTR avec un anticorps monoclonal anti-CFTR sur des préparations de membranes apicales d'épididyme. *Western-blot* réalisé avec un anticorps de lapin anti-CFTR montrant qu'une quantité significative de CFTR est immunoprécipitée (IP CFTR) par rapport au contrôle (IP control). C) CFTR est co-immunoprécipité avec un anticorps anti-aquaporine (IP AQP9), alors que l'immunoprécipitation contrôle (IP control) ne montre pas de CFTR, des bandes non spécifiques de bas poids moléculaire sont vues de manière similaire dans les deux immunoprécipitations, la bande la plus forte est générée par l'anticorps secondaire utilisé pour détecter CFTR (D).

## **5-Discussion**

Le rôle de l'épididyme est de maintenir un environnement adéquat pour les spermatozoïdes afin de leur permettre de devenir matures et d'être stockés dans un état quiescent. Différents types cellulaires concourent à l'élaboration et au maintien de ces conditions optimales. Deux fonctions complémentaires caractérisent cet épithélium : d'une part l'acidification de la lumière tubulaire par les cellules claires, et d'autre part le transport d'eau par les cellules principales. Notre travail a porté sur deux protéines membranaires qui interviennent directement dans ces processus : la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire et l'aquaporine 9. Les cellules étroites et les cellules claires interviennent dans le maintien des spermatozoïdes dans un environnement acide par la sécrétion de protons dans la lumière tubulaire. La H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, exprimée à la membrane apicale de ces cellules, mais également au pôle apical d'autres types cellulaires et de manière plus ubiquitaire dans des organelles intra-cellulaires, est responsable de cette sécrétion acide. Il s'agit d'une protéine composée de 13 sous-unités dont chacune a elle-même un à quatre isoformes. La composition particulière, avec telle ou telle isoforme, de chaque molécule de H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire semble lui conférer des propriétés particulières, notamment en ce qui concerne sa localisation cellulaire ou intra-cellulaire, sa rétention à la membrane, le degré de dissociation entre les secteurs V<sub>1</sub> et V<sub>0</sub>, la qualité du pompage des protons. L'aquaporine 9, l'aquaglycéroporine principale de l'épithélium de l'épididyme, et CFTR, canal chlore dépendant de l'AMP cyclique jouent un rôle dans les mouvements d'eau et de solutés dans l'épididyme. Le contrôle à court terme de l'activité de l'aquaporine 9 n'a jusqu'à présent pas été très bien caractérisé. La présence d'un motif « SVIM » à l'extrémité c-terminale de l'aquaporine 9 suggère que l'interaction de celle-ci avec des protéines ayant un domaine PDZ, comme par exemple NHERF1, pourrait être une voie de régulation. Des travaux ont montré que l'AMPcyclique et CFTR, qui se lie également à NHERF1, pourraient intervenir également dans la régulation de la fonction de l'aquaporine 9.

La première partie de notre travail montre que les sous-unités A, C1, C2, G1, G3, a1, a2, a4, d1 et d2 de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire sont exprimées dans l'épithélium de l'épididyme, la localisation précise de chaque isoforme étant particulière. Nous mettons ensuite en évidence la co-localisation de l'aquaporine 9 avec NHERF1 et CFTR, sa liaison avec ces protéines, son activation par l'AMP cyclique.

Jusqu'à notre travail, seule la localisation des sous-unités B1, B2, E2, A (70kD) et a4 avait été précisément décrite dans les cellules épithéliales de l'épididyme. L'expression des sous-unités B1, B2, et E2 a été établie dans les cellules claires et les cellules étroites de l'épididyme de rat et d'humain [72-74][75, 77, 170]. La localisation de la sous-unité a4 a été rapportée dans l'épididyme de souris [78]. Le marquage des cellules claires et des cellules étroites de l'épididyme de souris a également été obtenu avec un anticorps dirigé contre la sous-unité A de 67kDa de la H<sup>+</sup>ATPase vacuolaire exprimée dans la levure *Neurospora Crassa* [76].

Nous avons d'emblé écarté de notre travail l'étude des isoformes des sous-unités connues pour être exprimées spécifiquement dans des tissus autres que l'épididyme, et le rein : E1, G2, a3, P1, P2 (Tableau 1) [139], ainsi que celles ayant déjà fait l'objet d'une description précise dans l'épididyme de rat (B1, B2) [77]. Etant donné l'origine embryologique commune du rein et de l'épididyme, les similitudes fonctionnelles concernant la sécrétion de protons via la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire entre les cellules intercalaires des tubes collecteurs et les cellules claires et étroites de l'épididyme, nous nous sommes centrés sur l'étude des isoformes connues pour être exprimées dans le rein : C2, G3, a4, a2, d2. Nous avons élargi notre travail aux autres isoformes ubiquitaires de ces mêmes sous-unités : A, C1, G1, a1, d1. La sous-unité E2, sous-unité ubiquitaire qui ne possède pas d'autre isoforme (en dehors de l'isoforme E1 dont l'expression est strictement restreinte au testicule), et la plus anciennement connue du laboratoire de Sylvie Breton, est la « sonde » qui nous a permis de repérer les molécules de H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire. Le but de notre travail était de parvenir à une description précise de la localisation de ces isoformes (A, C1, C2, G1, G3, a1, a2, a4, d1 et d2). Les méthodes utilisant l'amplification des ARN messagers ne permettent que de déterminer la présence ou l'absence de l'expression d'un gène dans un broyat de tissu. Ces méthodes d'amplification associées à la technique de microdissection par laser des tissus permettent de ne préciser que dans quel type cellulaire les gènes sont exprimés. L'utilisation de ces techniques peut également aboutir à des ambiguïtés car il y a parfois une différence entre la mise en évidence de la transcription de certains gènes, par la détection des ARN messagers, et finalement l'expression de la protéine [223]. Les techniques d'immunocytochimie conduisent à la localisation intracellulaire précise de l'expression d'une protéine. Parmi celles-ci la technique utilisant des anticorps révélés par immunofluorescence, sur des coupes fines de 4 à 5 microns, permet

d'obtenir des images nettes des différentes cellules et des structures qui la composent, contrairement à la technique utilisant l'immunoperoxydation qui diffuse à l'intérieur de la cellule. La microscopie confocale permet de préciser la localisation des structures sur l'épaisseur de la coupe. Le microscope électronique est un outil encore plus performant pour l'identification des structures intracellulaires. La technique est limitée par la nécessité de fixer les tissus ce qui parfois conduit à une diminution de leur antigénicité, en particulier en ce qui concerne les méthodes de fixation de microscopie électronique. Ces techniques nécessitent d'avoir à disposition des anticorps purifiés, de haute affinité afin de ne pas faire d'erreur dans l'interprétation des images obtenues. Ainsi elles doivent être complétées par une caractérisation des anticorps en *western blot* afin de vérifier que la protéine détectée est du poids moléculaire adéquat. Il est préférable de faire des contrôles de compétition en utilisant le peptide qui a servi à produire l'anticorps et à le purifier (voir la figure 1 de l'article sur la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire).

Les sous-unités A, C1, C2, G1 et G3 du secteur V<sub>1</sub> de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire ont toutes été trouvées exprimées dans les cellules claires et les cellules étroites où elles ont été localisées au pôle apical. Ces résultats sont concordants avec ceux rapportés précédemment au sujet de l'expression des autres sous-unités du secteur V<sub>1</sub> (B1, B2 et E2) dans ces cellules [72, 79, 256] et confirment encore l'expression élevée de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire dans les cellules claires. Le laboratoire de Sylvie Breton a précédemment montré que ces cellules sécrètent significativement des protons selon une voie sensible à la bafilomycine, un inhibiteur spécifique de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire [72, 79]. La sécrétion nette de protons par ces cellules est régulée par un mécanisme de recyclage des vésicules contenant la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire entre les microvillosités apicales et les vésicules intracellulaires [85, 256, 257]. La co-localisation précise de la sous-unité A avec la sous-unité E2 dans les microvillosités apicales et dans les vésicules sous-apicales est concordante avec l'assemblage de ces isoformes spécifiques pour former le complexe multiprotéique de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire [80]. Ce résultat indique que les cellules claires utilisent la sous-unité A pour la sécrétion nette de protons dans la lumière de l'épididyme. La sous-unité ubiquitaire C1 et la sous-unité moins largement exprimée C2 sont présentes dans les cellules claires. Deux isoformes C2a et C2b qui résultent d'un épissage alternatif, ont été identifiées [118]. C2a a été détectée dans le poumon et C2b dans le rein. Dans cette étude, un anticorps reconnaissant à la fois

l'isoforme C2a et C2b a été utilisé [118]. Nous faisons l'hypothèse que l'isoforme reconnue dans les cellules claires est C2b en raison des similitudes existantes entre les cellules claires et les cellules intercalaires du rein [113] et en raison de l'origine embryologique commune entre le rein et l'épididyme. De manière similaire, la sous-unité G1 ubiquitaire de même que la forme à expression plus restreinte G3 ont été détectées au pôle apical des cellules claires et des cellules étroites. L'ARN messager de G3 a été détecté dans le rein [117, 119] et son expression dans les cellules claires de l'épididyme pourrait également être reliée à l'origine embryologique commune du rein et de l'épididyme. En plus de leur localisation dans la membrane apicale et dans les vésicules sous-apicales, un léger marquage est noté pour les sous-unités A, C1, C2, G1 et G3, de manière similaire à la localisation antérieurement rapportée avec d'autres sous-unités du domaine  $V_1$  dont la sous-unité E2, dans la fraction soluble des cellules claires [72, 75, 77].

De nombreuses sous-unités du secteur  $V_0$  dont les sous-unités a1, a4, d1 et d2 ont été aussi localisées dans les cellules claires et les cellules étroites. a1 et a4 ont été localisées au pôle apical mais avec une distribution intracellulaire différente. a4 montre le marquage le plus fort et la plus proche co-localisation avec la sous-unité E2 dans les vésicules sous apicales et les microvillosités apicales. L'expression de la sous-unité a4 a été décrite dans les cellules claires de l'épididyme de souris [78]. Ainsi a4 semble être l'isoforme prédominante dans les cellules claires et les cellules étroites. L'isoforme a1 exprimée de manière ubiquitaire était présente dans les vésicules sous apicales mais absente des microvillosités apicales. A la fois d1 et d2 ont été trouvées au pôle apical des cellules claires et des cellules étroites où elles pourraient participer à l'acidification des endosomes et/ou à la sécrétion de protons. En raison de son marquage plus fort dans les cellules claires et de sa présence en grande quantité dans les cellules intercalaires rénales [117], d2 semble être l'isoforme prédominante dans le processus de sécrétion de protons par les cellules claires et les cellules étroites.

La sous-unité A a été localisée d'une manière très intéressante dans des structures intracellulaires des cellules principales qui évoquaient le réseau trans-Golgi. Nous avons tenté d'identifier plus précisément ces structures. Dans un premier temps nous avons réalisé des doubles marquages en immunofluorescence en utilisant l'anticorps dirigé contre la sous-unité A et des anticorps commerciaux, élaborés dans des espèces animales différentes, dirigés contre des protéines du



Golgi. Aucune de ces expériences ne nous a permis d'obtenir un marquage de bonne qualité ou une co-localisation parfaite entre la sous-unité A et une protéine du Golgi. C'est avec l'anticorps dirigé contre la protéine TGN38 du réseau trans-Golgi que nous avons obtenu le résultat le plus intéressant, nous montrant une localisation de la sous-unité A dans des structures très proches mais cependant non identiques à celles identifiées par cet anticorps. Nous avons ensuite tenté d'identifier ces structures en microscopie électronique. Mais les essais que nous avons effectués ne nous ont pas permis de conclure précisément, en effet le degré de fixation nécessaire à une bonne préservation de ces structures fragiles est incompatible avec la conservation d'une bonne antigénicité du tissu. Les images obtenues jusqu'à présent ne sont donc pas suffisamment fiables pour tirer une conclusion quant aux structures intracellulaires marquées par l'anticorps dirigé contre la sous-unité A. Les cellules claires ont montré un marquage intracellulaire similaire à celui vu dans les cellules principales mais avec une plus faible intensité. L'isoforme a2 a été également détectée dans des structures tout à fait semblables, dans les cellules principales et, avec un marquage plus faible, dans les cellules claires. Un double marquage avec l'anticorps utilisé contre la protéine TGN38 a permis de montrer que la protéine a2 est exprimée, comme la sous-unité A, dans des structures proches mais non totalement identiques à celles identifiées par l'anticorps dirigé contre la protéine TGN38. Les anticorps dirigés contre les sous-unités A et a2 ayant été élaborés tous les deux dans la même espèce animale, nous n'avons pas pu réaliser de double marquage afin de voir si ces protéines sont situées sur des structures identiques. La localisation de a2 à la fois dans les cellules claires et dans les cellules principales est concordante avec la description du caractère ubiquitaire de la distribution des ARN messagers de a2 [87, 117, 145, 258]. Ces résultats indiquent que A et a2 pourraient avoir un rôle dans l'acidification d'organelles intracellulaires à la fois dans les cellules claires et dans les cellules principales. La grande similitude dans la distribution des protéines A, a2 et TGN38 nous amène à émettre l'hypothèse que les structures marquées par les anticorps anti-A et anti-a2 appartiennent à l'appareil de Golgi. Cette hypothèse est concordante avec la notion que les vésicules provenant du réseau trans Golgi sont acides et que la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire joue un rôle actif dans ce processus. L'acidification des vésicules induit le recrutement de protéines de recouvrement (*coat proteins*) et de petites GTPases de la famille des facteurs d'ADP-ribosylation, du cytosol vers les membranes des endosomes [259-

261]. Les sous-unités a2 et c interviennent directement dans ce processus de recrutement, sensible au pH. Arf6 interagit avec la sous-unité c et ARNO avec l'isoforme a2. La liaison entre a2 et ARNO est dépendante du pH de l'endosome, a2 agissant comme un *pH sensor* responsable du recrutement d'ARNO. L'interruption de cette interaction résulte dans une inhibition réversible de l'endocytose. Ces données démontrent que l'acidification des endosomes précoces et des interactions entre la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire/ARNO/Arf6 ont un rôle majeur dans la régulation des voies d'endocytoses et de dégradation [89].

Il a été très étonnant de mettre en évidence la présence de l'isoforme d1 au pôle apical des cellules principales. Jusque là, la présence d'aucune autre sous-unité n'a été décrite à la membrane apicale des cellules principales, ce qui était concordant avec l'absence de détection de sécrétion de proton par une voie sensible à la bafilomycine comme cela a été rapporté pour ces cellules [72]. Chez la levure, la sous-unité d reste très étroitement associée au domaine V<sub>0</sub> après la dissociation du domaine V<sub>1</sub> [262]. Parce que l'analyse prédictive de cette sous-unité n'est pas en faveur de la présence d'un domaine transmembranaire, sa présence à la membrane apicale des cellules principales est inattendue car la présence d'autres sous-unités du domaine V<sub>0</sub> n'y a pas été décrite. D'autres études seront nécessaires pour déterminer si la sous-unité d1 pourrait être associée à une autre protéine transmembranaire et pourrait ainsi participer à d'autres fonctions que celle de l'activité de sécrétion de protons par la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire. Une fonction similaire a été précédemment suggérée pour la sous-unité de 56kDa (B1), qui a été détectée dans des endosomes non acidificateurs isolés à partir de tubes collecteurs du rein [173]. Une autre possibilité serait l'existence d'une isoforme d'une sous-unité du domaine V<sub>0</sub> encore non identifiée qui serait exprimée à la membrane apicale des cellules principales et qui servirait de protéine d'ancrage à d1.

Notre étude montre que différentes isoformes de la même sous-unité des domaines V<sub>0</sub> et V<sub>1</sub> sont co-localisées au pôle apical des cellules étroites et des cellules claires (C1 et C2, G1 et G3, a1 et a4, d1 et d2). Chez la levure et dans les ostéoclastes, l'adressage de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire est contrôlé par l'assemblage des différentes isoformes de la sous-unité a au sein de l'holoenzyme [92, 115]. Les trois isoformes de la sous-unité a détectées dans les cellules claires pourraient donc avoir un rôle dans l'adressage de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire à un domaine membranaire spécifique : a2 dans les structures associées au réseau trans-Golgi, a1

et a4 dans les endosomes, a4 dans les microvillosités apicales. Des études antérieures ont montrées que les sous-unités d, C et G participent à la stabilité de la H<sup>+</sup>ATPase vacuolaire dans son ensemble [80, 262, 263]. Ces sous-unités pourraient également jouer un rôle dans la stabilisation de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire sur des domaines membranaires spécifiques dans les cellules claires et les cellules étroites. Alternativement, il a été montré que plusieurs sous-unités de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire dont les sous-unités a, d, A et C exerçaient un contrôle de l'activité de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire en modulant le couplage du transport de proton à l'hydrolyse de l'ATP [80, 114-116, 262, 264]. La présence de plusieurs isoformes des sous-unités a, d et C dans les cellules claires pourrait ainsi refléter les différents niveaux d'activité de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire dans les domaines membranaires et dans les compartiments intracellulaires dans lesquels elles sont exprimées.

Il a été montré précédemment dans l'épididyme de rat et de souris que les cellules claires expriment à la fois les sous-unités B1 et B2 [77]. Alors que B1 est totalement co-localisé avec la sous-unité E2 dans les microvillosités apicales et les vésicules sous-apicales, B2 est co-localisé avec E2 uniquement dans les vésicules sous-apicales et est absent des microvillosités. Des expériences de co-immunoprécipitation à partir d'extraits de rein ont montré que C1, G1 et E2 interagissent préférentiellement avec B2 et que C2b, G3 et E2 interagissent avec B1 [118]. A l'extérieur du domaine V<sub>0</sub>, d1 interagit à la fois avec les sous-unités B1 et B2, alors que d2 s'associe exclusivement avec B1. Les sous-unités a1, a2 et a4 se lient toutes à B2, mais seul a4 peut s'associer à B1. Ainsi certaines sous-unités s'assemblent préférentiellement et exclusivement : C2b, E2, G1, G3, a4, d1, d2 avec B1 et C1, E2, G1, a1, a2, a3, a4, d1 avec B2. Ainsi, la mise en évidence dans notre étude des isoformes a1, d1, C1 et G1 dans les vésicules sous-apicales, et leur absence dans les microvillosités apicales est concordante avec la description de la localisation de la sous-unité B2 au niveau des vésicules sous-apicales des cellules claires de l'épididyme de rat [77], et avec l'assemblage préférentiel de ces sous-unités [118]. Il en est de même avec la localisation de a4 dans les microvillosités qui correspond à la localisation de B1 précédemment décrite, l'assemblage préférentiel de ces deux unités a été montré. Cependant l'absence de a2 des vésicules sous-apicales où B2 est localisé n'était pas attendu. Les isoformes a1 et a4 ont été détectées en abondance dans ces vésicules et pourraient avoir un rôle compétitif vis à vis de l'interaction entre a2 et B2 dans ce compartiment.

Certaines isoformes pourraient servir de mécanisme alternatif potentiel pour l'activité exercée par une isoforme prédominante au sein de l'ensemble de la molécule H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire. Des mutations de certaines sous-unités de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, dont B1 et a4, sont responsables de certaines formes d'acidose tubulaire distale avec ou sans surdité [127-129]. La mise en évidence au cours de cette étude que les sous-unités a4 et B1 sont très exprimées dans les cellules claires et les cellules étroites de l'épididyme ouvre la possibilité d'une altération de la fertilité chez les patients porteurs d'une mutation de ces sous-unités. Un suivi clinique orienté, à long terme, de ces patients serait nécessaire pour répondre à cette question. Cependant, les souris qui n'expriment pas la sous-unité B1 [174, 265] sont fertiles (Karen E. Finberg, communication personnelle et observations du laboratoire de Sylvie Breton) indiquant que l'acidification de la lumière de l'épididyme, nécessaire à la maturation du sperme et à son stockage, n'est pas altérée de manière significative. Ceci suggère qu'une autre isoforme de la sous-unité B, par exemple B2, pourrait compenser l'absence de l'isoforme B1 et maintenir la sécrétion de proton dans la lumière de l'épididyme. De la même façon, a1 pourrait être un mécanisme alternatif ou de rechange pour le rôle joué par l'isoforme a4 dans la sécrétion de protons par les cellules claires.

Le contenu de la lumière de l'épididyme a une composition particulière dont l'élaboration et le maintien met en jeu des phénomènes actifs. L'aquaporine 9 intervient pour sa part dans les mouvements d'eau et de solutés, mais la régulation de sa fonction n'est pas très bien caractérisée. La présence à son extrémité c-terminale du motif « SVIM », zone de liaison à des domaines PDZ, nous a fait émettre l'hypothèse qu'une interaction de celle-ci avec la protéine NHERF1 pourrait intervenir dans la régulation de sa fonction. NHERF1 est une protéine possédant des domaines PDZ, elle intervient pour faciliter la formation de complexes multiprotéiques, une étape essentielle pour la phosphorylation et la régulation d'un nombre croissant de transporteurs, canaux et récepteurs localisés dans la membrane apicale de plusieurs types de cellules épithéliales [239, 240, 244, 246, 248, 266]. NHERF1 contient trois domaines d'interaction : domaine PDZ1, domaine PDZ2, et une séquence localisée en c-terminal qui se lie aux protéines de la famille des protéines Merlin/Ezrin/Radixin/Moesin (MERM) [243-245]. Les domaines PDZ s'associent aux protéines qui possèdent des zones de liaison à ces domaines PDZ.

Le domaine de liaison aux protéines MERM permet une interaction avec l'actine et d'autres protéines qui interagissent elles-mêmes avec les protéines MERM notamment des protéines kinases (Figure 18). Ainsi NHERF1 facilite l'agencement de protéines de transport avec leurs protéines partenaires de régulation et aide à l'ancrage à la membrane apicale des protéines membranaires grâce à son interaction avec le cytosquelette. Le préalable à la mise en évidence de l'interaction entre deux protéines est l'identification de la co-localisation de ces molécules au sein du tissu natif. La technique utilisant des anticorps révélés par immunofluorescence, sur des coupes fines de 4 à 5 microns, permet d'obtenir des images nettes des différentes cellules et des structures qui la composent. L'utilisation d'anticorps élaborés dans des espèces distinctes, révélés par des fluorochromes différents à l'aide d'un microscope à épifluorescence, permet de visualiser une éventuelle co-localisation de plusieurs protéines avec une précision de l'ordre de 20nm (correspondant à l'encombrement des anticorps primaire et secondaire). Cette technique nous a permis de montrer que NHERF1 est co-localisé avec l'aquaporine 9 à la membrane apicale des cellules principales de l'épididyme. Les études de localisation directe de la protéine CFTR dans les tissus natifs sont rendues difficiles par la faible abondance de la protéine dans la plupart des tissus où elle est exprimée de façon endogène, par le manque de sensibilité des anticorps dirigés contre elle, par la difficulté de préserver les épitopes reconnus par les anticorps au cours de la fixation des tissus que l'on veut étudier [267]. Par hybridation in situ, Patrizio et al ont mis en évidence la présence d'ARNm de CFTR dans l'épithélium adulte humain normal de l'épididyme et du canal déférent, la plus forte intensité du signal étant retrouvée dans les régions proximales de la tête de l'épididyme [190]. Des études électrophysiologiques réalisées sur des canaux efférents de rats mettent en évidence que la conductance au chlore activée par l'AMPcyclique est concordante avec celle rapportée pour CFTR, ce qui est donc en faveur de la présence de CFTR à ce niveau [189]. Cette présence est confirmée par la mise en évidence d'ARNm dans des cultures d'épithélium de canaux efférents [189]. Des études en immunohistochimie montrent également la présence de CFTR à la membrane apicale des cellules principales des canaux efférents [189], du corps et de la queue de l'épididyme [191]. Dans notre travail nous avons pu localiser CFTR en immunofluorescence à la membrane apicale des cellules principales, dans les

Figure 18

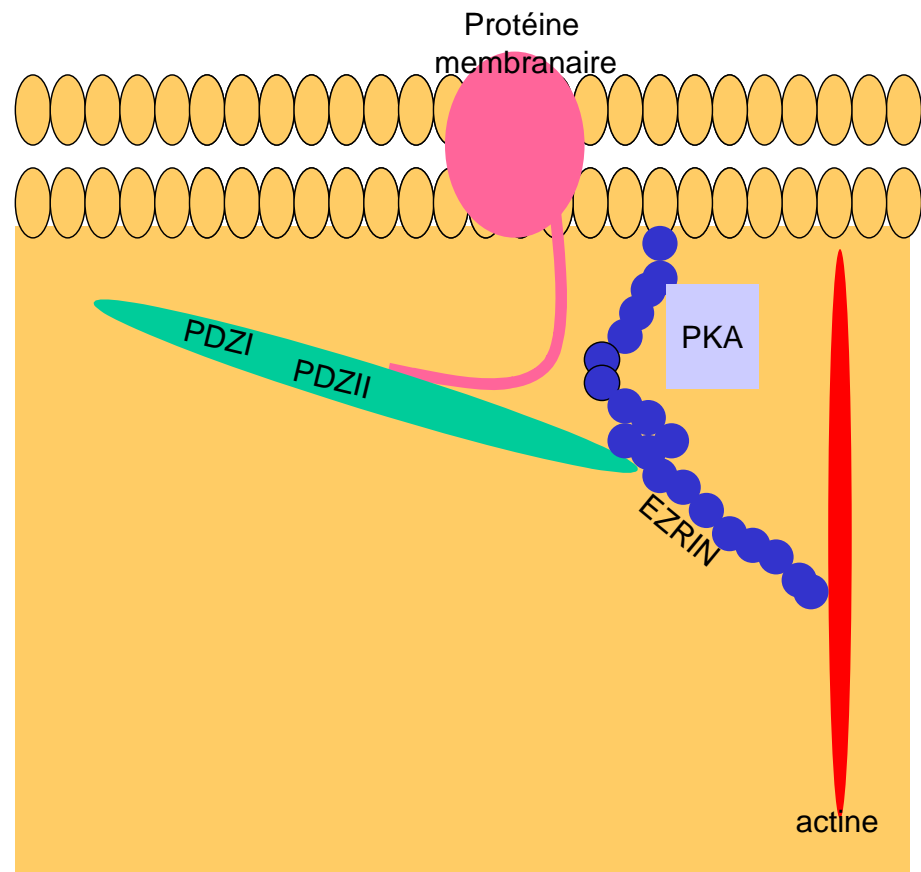


Figure 18 : Schéma du rôle de NHERF. NHERF se lie à la protéine membranaire par un domaine PDZ, cette interaction permet le contact de la protéine membranaire avec une protéine de la famille des MERM (ici ezrin) qui est liée à l'actine, cette interaction permet le rapprochement d'une protéine kinase vers la protéine membranaire permettant sa régulation.

segments initiaux de l'épididyme de rat et montrer sa co-localisation avec l'aquaporine 9.

Nous avons ensuite utilisé plusieurs méthodes pour démontrer l'interaction de NHERF1 avec l'aquaporine 9 : co-immunoprécipitation, co-précipitation (*pull-down*), essais de recouvrement (*overlay*). Nous avons utilisé comme matériel de départ pour les expériences de co-immunoprécipitation et de co-précipitation (*pull-down*) du tissu d'épididyme natif, et non des cultures cellulaires dont les manipulations nécessaires à leur sauvegarde peuvent aboutir à des expressions protéiques différentes des tissus originaux. Les co-immunoprécipitations nécessitent un anticorps spécifique de la protéine étudiée pour éviter des erreurs d'interprétation. Elles permettent de mettre en évidence l'existence d'une interaction sans pouvoir préciser si cette interaction est directe ou non avec la protéine détectée dans le co-précipité. Dans ce système, le résultat de l'utilisation du peptide contenant le motif « SVIM » de l'aquaporine 9, ayant servi à l'élaboration de notre anticorps anti-aquaporine 9, fut une indication qui allait dans le sens de ce que notre hypothèse prévoyait : l'interaction de l'aquaporine 9 avec NHERF1 par l'intermédiaire de ce motif. Les expériences de co-précipitations (*pull down*) ont permis de préciser que la zone d'interaction était bien le motif « SVIM » lui même. Les expériences de recouvrement (*overlay*) ont permis d'une part de montrer que l'interaction entre l'aquaporine 9 et NHERF1 était directe et d'autre part de préciser que les domaines PDZ de NHERF1 étaient les zones d'attachement de l'aquaporine 9. Afin d'augmenter la puissance de nos résultats, nous avons tenter des expériences utilisant la technique du Biacore. Celle-ci permet de détecter des interactions protéiques, sans marquage des molécules, en temps réel et d'analyser ainsi à l'écran la cinétique d'une interaction. Malheureusement nous n'avons pas obtenu de résultats avec cette méthode expérimentale. Il semble que cette technique ne soit pas performante pour l'étude de la protéine NHERF1. Des discussions informelles avec M Weinman EJ, spécialiste de NHERF1, nous ont en effet confirmé les difficultés rencontrées dans l'utilisation de cette technique avec cette protéine.

Il a été montré précédemment que l'aquaporine 9 n'est pas recyclée de la membrane apicale vers des vésicules intracellulaires [216], contrairement par exemple à l'aquaporine 2. Ainsi, NHERF1 pourrait servir à l'ancrage et à la stabilisation de l'aquaporine 9 dans la membrane apicale comme cela a été montré pour d'autres protéines résidentes de la membrane [239, 240, 246]. De plus,

l'interaction directe entre aquaporine 9 et NHERF1 pourrait participer à la régulation de la fonction de l'aquaporine 9. NHERF1 a d'abord été identifié comme un cofacteur essentiel pour la régulation de NHE3 par l'AMPcyclique, dans le rein [268]. NHERF1 participe à la formation d'un complexe qui comporte NHE3 et la protéine ezrin qui sert d'ancrage à la protéine kinase A ce qui facilite la phosphorylation de NHE3 par la PKA [269]. L'aquaporine 9 est très nettement activée par l'AMP cyclique dans les parties distales de l'épididyme [193] et dans les segments proximaux, comme le montrent les études fonctionnelles de ce travail : les études fonctionnelles réalisées sur des tubules perfusés in vitro montrent une perméabilité au glycérol à la partie apicale de l'épithélium significativement dépendante de l'aquaporine 9, cette perméabilité au glycérol est significativement augmentée par un analogue de l'AMP cyclique, le cpt- AMP cyclique, qui peut pénétrer dans les cellules. Ceci est important à remarquer car contrairement aux autres aquaporines, la régulation de l'aquaporine 9 par l'AMP cyclique a lieu sans faire intervenir de mécanisme de recyclage. Dans le rein, l'aquaporine 2 s'accumule à la membrane apicale après stimulation par l'AMP cyclique [204] et dans l'épithélium respiratoire l'AMP cyclique induit l'internalisation de l'aquaporine 5 [270]. Nous proposons que NHERF1 pourrait participer à l'activation par l'AMP cyclique de l'aquaporine 9 dans l'épididyme. L'aquaporine 9 contient plusieurs sérine et thréonine qui sont des sites potentiels de phosphorylation dans ses parties N et C terminales, des phosphorylations par la PKA, PKC ou PKG pourraient être responsables de la régulation de la perméabilité de l'aquaporine 9.

Dans les cellules OK, la phosphorylation de NHE3 par l'AMPcyclique requiert NHERF1, mais la phosphorylation de NHERF1 n'est pas nécessaire [271]. Au contraire, sur des coupes de rein, la PKA induit une phosphorylation significative de NHERF1 [266], un processus qui régule l'interaction entre NHERF1 et les autres transporteurs, comme NaPiII. Dans notre étude, nous montrons qu'une partie significative de NHERF1 est phosphorylée dans les conditions de base dans l'épididyme et que les deux formes, phosphorylée et non phosphorylée, de NHERF1 sont co-immunoprécipitées avec l'aquaporine 9. Il est intéressant de noter qu'il a été montré que la phosphorylation de NHERF1 est un facteur clé de la régulation de CFTR, qui se lie aux deux domaines PDZ de NHERF1 [272, 273]. NHERF1 a été la première protéine identifiée comme protéine se liant à CFTR par ses domaines PDZ à l'extrémité c-terminale de CFTR [274]. Il semble que NHERF1 ait un rôle très



important dans la régulation de la localisation et de la stabilisation de CFTR à la membrane apicale [275]. La formation d'un complexe qui contient deux molécules de CFTR et une molécule de NHERF1 augmente la probabilité d'ouverture de CFTR. La phosphorylation du domaine PDZ2 de NHERF1 par la PKC entraîne une séparation de ce domaine PDZ avec sa molécule de CFTR, tout en laissant intact la liaison entre PDZ1 et la deuxième molécule de CFTR, mais en empêchant ainsi l'effet stimulant de NHERF1 [276]. Il a été proposé que l'empêchement du couplage bivalent de CFTR à NHERF1 après la phosphorylation de NHERF1 pourrait modifier CFTR le faisant passer d'un canal chlore ouvert à une protéine régulatrice [248]. Un mécanisme similaire a été proposé pour réguler le couplage fonctionnel entre CFTR et ROMK, avec un autre membre de la famille NHERF, NHERF2 [248]. Dans notre travail, nous montrons que, de manière similaire à CFTR, l'aquaporine 9 se lie aux deux domaines PDZ de NHERF1.

CFTR est également exprimé à la membrane apicale des cellules principales de l'épididyme [191]. Dans la portion distale de l'épididyme, la sécrétion d'eau, secondaire à la sécrétion de chlore par CFTR est une étape importante qui permet de contrôler la fluidité finale du contenu luminal. La mise en évidence, dans notre travail, de la co-localisation de l'aquaporine 9 et de CFTR ainsi que leur co-immunoprécipitation sont une première étape vers la mise en évidence d'une interaction entre ces deux protéines au niveau de l'épididyme. D'autres études expérimentales seront nécessaires (co-précipitations (*pull down*), recouvrement (*overlay*), interaction en temps réel par Biacore) pour confirmer cette interaction et mettre en évidence son caractère direct ou indirect. Nos résultats actuels corroborent les constatations de Cheung d'une interaction fonctionnelle entre ces deux protéines. En effet, dans des ovocytes de *xenopus*, CFTR permet l'activation de l'aquaporine 9 dépendant de l'AMP cyclique et l'inhibition de CFTR par la lonidamine annule l'activation de l'aquaporine 9 induite par l'AMP cyclique [193]. Ainsi, la régulation coordonnée d'aquaporine 9 et de CFTR pourrait faciliter la régulation fine du transport d'eau et d'ions dans ce tissu. Des études sont actuellement en cours dans le laboratoire de Sylvie Breton afin de déterminer si l'inhibition de CFTR a pour effet d'inhiber l'aquaporine 9, sur des tubes d'épididymes perfusés. D'autres études seront nécessaires pour déterminer si oui ou non l'interaction de CFTR et de l'aquaporine 9 par l'intermédiaire de NHERF1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'aquaporine 9. Il sera particulièrement intéressant de déterminer si la

phosphorylation régulée de NHERF1 par la PKA et/ou la PKC peut jouer un rôle dans la régulation de l'aquaporine 9, soit par son interaction avec NHERF1 seul ou par la participation de CFTR dans l'épididyme.

Ce travail montre une interaction spécifique entre les quatre derniers acides aminés c-terminaux de l'aquaporine 9 (SVIM) et les deux domaines PDZ de NHERF1. Cette interaction pourrait jouer un rôle clé dans l'activation de l'aquaporine 9 dépendante de l'AMP cyclique. Comme l'aquaporine 9 est présente dans une grande variété de types cellulaires ayant un rôle dans le transport d'eau et de solutés neutres, et comme d'autres membres de la famille des aquaporines dont l'aquaporine 4 et l'aquaporine 2 contiennent aussi des motifs qui pourraient se lier à des domaines PDZ, nous proposons que l'interaction entre les aquaporines et les protéines PDZ représente un mécanisme répandu par lequel le transport d'eau et de solutés neutres est régulé.

## **6-Conclusions et perspectives**

Notre travail a porté sur deux protéines de l'épithélium de l'épididyme : la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire et l'aquaporine 9. Ces molécules sont des acteurs majeurs de deux fonctions essentielles de l'épithélium de l'épididyme : la sécrétion de protons dans la lumière, et les mouvements d'eau. La sécrétion de protons dans la lumière est nécessaire à l'établissement d'un pH acide par rapport au plasma et permet la maturation et le stockage des spermatozoïdes dans un état quiescent. Les mouvements d'eau dans la lumière et leur régulation sont indispensables à l'établissement d'une concentration en spermatozoïdes et d'une fluidité du sperme optimales. L'établissement et le maintien de ces paramètres sont nécessaires à la fertilité masculine.

L'étude de la localisation des différentes isoformes des sous-unités de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire a mis en évidence des localisations différentes pour certaines isoformes d'une même sous-unités ce qui conforte l'hypothèse que chaque isoforme pourrait avoir une fonction particulière au sein de la molécule de H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire dans laquelle elle se trouve, déterminant un adressage intra-cellulaire spécifique et une modulation de l'activité sécrétoire. Toutes les associations d'isoformes possibles pourraient ainsi aboutir à autant de molécules de H<sup>+</sup>-ATPase légèrement différentes permettant d'affiner au mieux la sécrétion de protons ou l'acidification des organelles intracellulaires.

Cette étude devra être complétée sur différents points. La localisation de l'isoforme C2 a été réalisée avec un anticorps reconnaissant à la fois les sous-unités C2a et C2b, l'utilisation d'un anticorps distinguant ces deux isoformes permettra de vérifier s'il s'agit bien ou non de la sous-unité C2b qui est exprimée dans l'épididyme comme c'est le cas dans l'épithélium rénal. Une étude plus complète de la relation entre les sous-unités A, a2 et le Golgi permettra de mieux appréhender le transport de protons à ce niveau. L'amélioration des techniques de fixation pour la microscopie électronique, l'utilisation d'anticorps dirigés contre des protéines du Golgi autres que TGN38 permettra d'avancer dans cette direction. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les sous-unités A et a2 synthétisés dans deux espèces différentes permettra de localiser l'une par rapport à l'autre ces deux sous-unités au sein du réseau golgien. Comme cela est décrit dans ce travail les sous-unités peuvent se répartir entre trois localisations intracellulaires : les microvillosités apicales, les vésicules sous-apicales et les structures intracellulaires. La question se pose

de savoir si chacune des isoformes de chaque sous-unité a une localisation fixe qui lui est propre ou bien si ces localisations ne sont qu'une phase d'un recyclage commun à tout ou partie des sous-unités et de leurs isoformes. Des études dans ce sens ont été initiées à la fin de ce travail. Des canaux déférents ont été perfusés par une solution à pH 6,5 contenant de l'AMP cyclique pouvant pénétrer dans les cellules (cptAMP cyclique), conditions connues pour entraîner une accumulation des pompes à protons à la membrane apicale [85], puis fixés et analysés en immunofluorescence afin de localiser les différentes sous-unités, le but étant de comparer leur localisation dans ces conditions de sécrétion de protons par rapport à la situation de repos sans AMP cyclique. Les anomalies de la fertilité ne font pas partie du tableau classique d'acidose tubulaire distale associée ou non à une surdité. Il serait cependant particulièrement intéressant de pouvoir faire une étude des sous-unités de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire chez les patients atteints, ayant des mutations des gènes ATP6V0A4 (sous-unité a4) et ATP6V1B1 (sous-unité B1), afin de voir comment se répartissent les sous-unités, de voir si l'anomalie protéique engendrée par les mutations a conduit à une répartition différente des isoformes et ainsi de mieux comprendre le rôle de chaque isoforme. Le problème de la co-existence ou non au sein d'une même molécule de H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire des isoformes B1 et B2 n'est pas encore réglé. Si ces deux isoformes sont présentes dans un même complexe, la présence d'une sous-unité B1 non fonctionnelle pourrait empêcher la sous-unité B2 fonctionnelle de compenser la fonction déficiente, et inhiber totalement la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire. Cette hypothèse pourrait expliquer le fait que les humains ayant une mutation de leur sous-unité B1 présentent un phénotype plus marqué que les souris B1 knock-out. En effet, alors que chez l'homme les sujets atteints ont un pH sanguin autour de 7,2, les souris déficientes en B1 ont un pH sanguin comparable à celle qui ne le sont pas, cependant elles résistent moins bien à une acidose forcée [265]. Un travail récent réalisé sur des lignées cellulaires de tubes collecteurs de rat a montré que les mutations de la sous-unité B1 responsables d'acidose tubulaire chez l'homme entraînaient une impossibilité pour la sous-unité B1 mutée de s'assembler au complexe de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire. Il est proposé que la sous-unité B1 mutée, non associée au complexe enzymatique, pourrait interférer avec la

délivrance des autres sous-unités de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire à la membrane cellulaire en entrant en compétition avec les systèmes d'adressage [277].

La deuxième partie de ce travail montre une interaction spécifique entre les quatre derniers acides aminés C-terminaux de l'aquaporine 9 (SVIM) et les deux domaines PDZ de NHERF1. Cette interaction pourrait jouer un rôle clé dans l'activation de l'aquaporine 9 dépendante de l'AMP cyclique. La dernière partie indique une interaction entre CFTR et l'aquaporine 9, à confirmer. Etant donné ces résultats, les données montrant des effets synergiques entre l'aquaporine 9 et CFTR [193], l'interaction connue entre NHERF1 et CFTR [272, 273] nous proposons que la phosphorylation de CFTR par l'AMP cyclique pourrait induire l'activation de l'aquaporine 9 via une interaction avec NHERF1 (Figure 19). Comme nous l'avons montré dans ce travail, NHERF1 se trouve à l'état phosphorylé et non phosphorylé dans l'épididyme, les deux formes pouvant se lier à l'aquaporine 9. Il sera intéressant de mettre en évidence le type d'enzyme responsable dans ce tissu de cette modification post-traductionnelle. L'aquaporine 9 contient des sites potentiels de phosphorylation. L'étude de son état phosphorylé ou non au sein de l'épididyme, de même que l'éventuel impact de cette phosphorylation sur son interaction avec NHERF1 devra être éclairci. L'étude de l'interaction entre l'aquaporine 9 et CFTR devra être confirmée, en essayant de préciser les domaines de liaison au sein de chacune de ces molécules. Il est très intéressant de noter que parmi tous les organes touchés par la mucoviscidose, l'épididyme et le canal déférent sont parmi ceux les plus fréquemment et sévèrement atteints [186, 278]. L'absence dite congénitale de canal déférent est présente chez plus de 99% des adultes masculins atteints de mucoviscidose [279], et parmi la population chez qui le diagnostic d'absence congénital de canal déférent est porté, 80% ont une mutation du gène de CFTR. Les formes d'agénésie vraies secondaires à une anomalie du développement embryologique sont associées à des anomalies des voies urinaires et ne sont pas associées à des mutations du gène CFTR. Il existe différents arguments pour penser que l'absence de canal déférent associée à des anomalies de l'épididyme dans le cadre de la mucoviscidose n'est pas secondaire à une anomalie primaire du développement embryologique mais qu'elle est un phénomène secondaire de régression de structures initialement

Figure 19

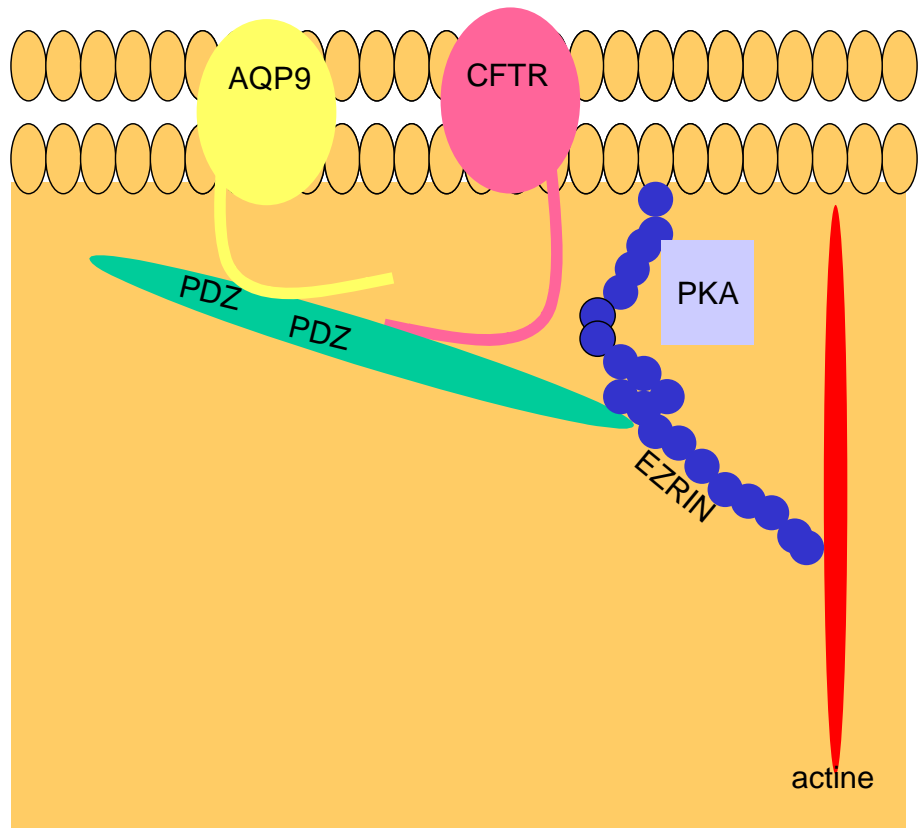


Figure 19 : Modèle des interactions possibles entre NHERF1, CFTR et l'aquaporine 9. Notre travail nous conduit à proposer le modèle suivant : l'interaction entre NHERF1 et Ezrin d'une part, et entre NHERF1 et CFTR et/ou l'aquaporine 9 d'autre part permet de rapprocher la protéine kinase de CFTR ou de l'aquaporine 9.

correctement en place. En effet, il existe une proportion plus importante de tractus génital décrit comme normal chez les garçons pré-pubères ayant la mucoviscidose que chez les adultes atteints de la même pathologie, la normalité du tractus génital masculin a été rapporté chez des nouveaux-nés porteurs de mucoviscidose ou dans les premiers mois de vie de ces patients, l'étude de fœtus atteints de mucoviscidose à 12 et 18 semaines de gestation, a mis en évidence la présence de canaux déférents normaux par rapport à des fœtus non atteints du même terme, une sécrétion a été observée au sein de la lumière, sans obstruction [280]. Ainsi dans le cadre de la mucoviscidose l'absence congénitale de canal déférent apparaît être un mécanisme secondaire et le terme d'atrésie du canal déférent pourrait être préféré à celui d'agénésie. L'atrésie semble être secondaire à une obstruction par du matériel épais qui conduit à la fibrose. Notre travail permet de faire l'hypothèse que l'interaction de CFTR avec l'aquaporine 9 potentiellement par le biais de NHERF1, perturbée par les mutations de CFTR au cours de la mucoviscidose, pourrait être responsable d'anomalies du volume hydrique présent dans la lumière de l'épididyme et conduire à l'atrésie des tubules. Ainsi, l'étude des mécanismes par lesquels l'aquaporine 9 régule le transport transépithélial d'eau et de soluté éventuellement sous la dépendance de CFTR dans l'appareil reproducteur masculin pourrait s'avérer bénéfique pour une meilleure compréhension des problèmes de fertilité liés à la mucoviscidose.



## Références bibliographiques

1. Jones R, Murdoch R. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutheran and marsupial mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 553-568.
2. Orgebin-Crist M, Davies J. The epididymis in the post-genome era. In: Hinton B, Turner T (eds.), *The Third International Conference on the Epididymis*. Charlottesville: Van Doren; 2003: 2-22.
3. Yeung C, Cooper T, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E. Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biol Reprod* 1993; 49: 274-280.
4. Matzuk M, Lamb D. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Med* 2002; 8: Suppl: S33-S40.
5. Sharpe R, Franks S. Environment, lifestyle and infertility-an intergenerational issue. 2002; *Nat Cell Biol*: Suppl: S33-S40.
6. Klinfelter G. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: *the Epididymis: From Molecule to Medical Practice*. Edited by Robaire B and Hinton BT. New York: Kluwer Academic/Olenum 2002: 353-369.
7. Elzanathy S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod* 2002; 17: 2904-2911.
8. Gatti J, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Metayer S, Thimon V, Dacheux J. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 321-339.
9. Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, function, and their regulation. In: Knobil E, Neill J (eds.), *In The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1988: 999-1080.
10. Dacheux J, Castella S, Gatti J, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 2005; 63: 319-341.
11. Johnston D, Jelinsky S, Bang H, DiCandeloro P, Wilson EM, Kopf G, Turner T. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod* 2005; 73: 404-413.
12. Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux J. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic change of major proteins. *Biol Reprod* 2000; 62: 1790-1803.
13. Turner T. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J Androl* 1995; 16: 292-298.
14. Pastor-Soler N, Pietrement C, Breton S. Role of acid/base transporters in the male reproductive tract and potential consequences of their malfunction. *Physiology* 2005; 20: 417-428.
15. Hermo L, Robaire B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, Hinton B (eds.), *The Epididymis : From Molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic-plenum; 2002: 81-102.
16. Yeung C, Nashan D, Sorg C, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E, Cooper T. Basal cells on the human epididymis-antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biology of Reproduction* 1994; 50.
17. Adamali H, Hermo L. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J Androl* 1996; 17: 208-222.
18. Sun E, Flickinger C. Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis. *Anat Rec* 1980; 196: 285-293.

19. Hinton B, Palladino M. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of luminal fluid microenvironment. *Microsc Res Tech* 1995; 67-81.
20. Ilio K, Hess R. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microsc Res Tech* 1994; 29: 432-467.
21. Robaire B, Viger R. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 1995; 52: 226-236.
22. Wong P, Gong X, Leung G, Cheuk B. Formation of the epididymal fluid microenvironment. In: Robaire B, Hinton B (eds.), *The Epididymis: From molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum; 2002: 119-130.
23. Robaire B, Jervis K, Ezer N. Cell dynamics and cell death in the epididymal epithelium. In: Hinton B, Turner T (eds.), *The third international conference on the epididymidis*. Charlottesville: The Van Doren Company; 2003: 35-49.
24. Hinton B, Dott H, Setchell B. Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and different regions along the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility* 1979; 55: 167-172.
25. Usselman M, Cone R, Rossignol D. Rat cauda epididymal fluid is a mucus. *Journal of Andrology* 1985; 6: 315-320.
26. Hamamah S, Gatti J. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction Supplement* 1998; 4: 20-30.
27. Orgebin-Crist M, Olson G. Epididymal sperm maturation. In: Courot M, Nijhoff M (eds.), *The Male in Farm Animal Reproduction*. Amsterdam: Martinus Nijhoff; 1984: 80-102.
28. Boue F, Blais J, Sullivan R. Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1996; 54: 1009-1017.
29. Yeung C, Schroter S, Wagenfeld A, Kirchhoff C, Kliesch S, Poser D, Weinbauer G, Nieschlag E, Cooper T. Interaction of the human epididymal protein CD52 (HE5) with epididymal spermatozoa from men and cynomolgus monkeys. *Molecular Reproduction and Development* 1997; 48: 267-275.
30. Slott V, Suarez J, Poss P, Linder R, Strader L, Perreault S. Optimization of the Hamilton-Thorn computerized sperm motility analysis system for use with rat spermatozoa in toxicological studies. *Fundamental Applied Toxicology* 1993; 21: 298-307.
31. Syntin B, Robaire B. Sperm motility and structural changes during aging in the brown norway rat. *Journal of Andrology* 2001; 22: 235-244.
32. Dyson A, Orgebin-Crist M. Effects of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. 1973; *Endocrinology*: 391-402.
33. Blandau R, Rumery R. The relationship between swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. *Fertility and Sterility* 1964; 15: 571-579.
34. Dacheux J, Dacheux F, Paquignon M. Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol Reprod* 1989; 40: 635-651.
35. Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti J, Okamura N, Dacheux J. Characterization and identification of proteins secreted in various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod* 1996; 55.
36. Yang H, Liu A, Zhang L, Zhou H, Wang Y, Zhang H, Wang G, Zeng R, Zhang Y, Chen Z. Proteomic profiling of regionalized proteins in rat epididymis indicates consistency between specialized distribution and protein functions. *J Proteome Res* 2006; 5: 299-307.

37. Dacheux J, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F. Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Biol* 2006; 250: 36-42.
38. Larsen W. *Embryologie humaine*. Bruxelles: Elsevier Science; 2003.
39. Au C, Wong P. Luminal acidification by the perfused rat cauda epididymidis. *J Physiol* 1980; 309: 419-427.
40. Turner T. Resorption versus secretion in the rat epididymis. *J Reprod Fertil* 1984; 72: 509-514.
41. Levine LR, Kelly H. Measurement of pH in the rat epididymis in vivo. *J reprod Fertil* 1978; 52: 333-335.
42. Levine N, Marsh D. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J Physiol* 1971; 213: 557-570.
43. Acott T, Carr D. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol Reprod* 1984; 30: 926-935.
44. Carr D, Usselman M, Acott T. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol Reprod* 1985; 33: 588-585.
45. Caflisch C, DuBose T. Direct evaluation of acidification by rat testis and epididymis: role of carbonic anhydrase. *Am J Endocrinol Metab* 1990; 258: E143-E150.
46. Yeung C, Breton S, Stetiawan I, Xu Y, Lang F, Cooper T. Increased luminal pH in the epididymis in infertile c-ros knockout mice and the expression of sodium-hydrogen exchangers and vacuolar proton pump H<sup>+</sup>ATPase. *Mol Reprod Dev* 2004; 68: 159-168.
47. Zou Q, Clarke L, Nie R, Carnes K, Lai L, Lien Y, Verkman A, Lubahn D, Fisher J, Katzenellenbogen B, Hess R. Estrogen action and male fertility: roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14132-14137.
48. Caflisch C. Acidification of testicular and epididymal fluids in the rat after surgically-induced varicocele. *Int J Androl* 1992; 15: 238-245.
49. Hansen L, Clulow J, Jones R. The role of NA<sup>+</sup> H<sup>+</sup> exchange in fluid and solute transport in the rat efferent ducts. *Exp Physiol* 1999; 84: 521-527.
50. Hinton B, Turner T. Is the epididymis a kidney analogue ? *New Physiol Sci* 1988; 3: 28-31.
51. Schultheis P, Clarke L, Meneton P, Miller M, Soleimani M, Gawenis L, Riddle T, Duffy J, Doeschman T, Wang T, Giebisch G, Aronson P, Lorenz J, Shull G. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Nat Genet* 1998: 282-285.
52. Hoogerwerf W, Tsao S, Devuyst O, Levine S, Yun C, Yip J, Cohen M, Wilson P, Lazenby A, Tse C, Donowitz M. NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1996; 270: G29-G41.
53. Noel J, Pouyssegur J. Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate NA<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms. *Am J Physiol Cell Physiol* 1995; 268: C283-C296.
54. Wu M, Bens M, Cluzeaud F, Vandewalle A. A role of F-actin in the activation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport by forskolin and vasopressin in mouse kidney cultured thick ascending limb cells. *J Membr Biol* 1994; 142: 323-336.
55. Bagnis C, Marsolais M, Biemesderfer D, Laprade R, Breton S. Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup>-exchange activity and immunolocalization of NHE3 in rat epididymis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F426-F436.

56. Kaunisto K, Moe OW, Pelto-Huikko M, Traebert M, Rajaniemi H. An apical membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform, NHE3, is present in the rat epididymal epithelium. *Pflügers Arch* 2001; 442: 230-236.
57. Pushkin A, Clark I, Kwon TH, Nielsen S, Kurtz I. Immunolocalization of NBC3 and NHE3 in the rat epididymis: colocalization of NBC3 and the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Androl* 2000; 21: 708-720.
58. Cheng Chew S, Leung G, Leung P, Tse C, Wong P. Polarized distribution of NHE1 and NHE2 in the rat epididymidis. *Biol Reprod* 2000; 62: 755-758.
59. Counillon L, Scholz W, Lang H, Pouyssegur J. Pharmacological characterization of stably transfected Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter isoforms using amiloride analogs and a new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 1041-1045.
60. Jensen L, Schmitt B, Berger U, Nsumu N, Boron W, Hediger M, Brown D, Breton S. Localization of sodium bicarbonate cotransporter (NBC) protein and messenger ribonucleic acid in rat epididymis. *Biol Reprod* 1999; 60: 573-579.
61. Jensen L, Stuart-Tilley A, Peters L, Lux S, Alper S, Breton S. Immunolocalization of AE2 anion exchanger in rat and mouse epididymis. *Biol. Reprod.* 1999; 61: 973-980.
62. Ekstedt E, Ridderstrale Y. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the testis and epididymis of the rabbit. *Acta Anat (Basel)* 1992; 143: 258-264.
63. Breton S. The cellular physiology of carbonic anhydrases. *JOP* 2001; 2: 159-164.
64. Parkkila S, Parkkila A, Kaunisto K, Waheed A, Sly W, Rajaniemi H. Location of a membrane-bound carbonic anhydrase isoenzyme (CA IV) in the human male reproductive tract. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 751-757.
65. Parkkila S, Parkkila A, Saarnio J, Kivela J, Karttunen T, Kaunisto K, Waheed A, Sly W, Tureci O, Virtanen I, Rajaniemi H. Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 1601-1608.
66. Karhumaa P, Kaunisto K, Parkkila S, Waheed A, Pastorekova S, Pastorek J, Sly W, Rajaniemi H. Expression of the transmembrane carbonic anhydrases, CA IX and CA XII, in the human male excurrent ducts. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 611-616.
67. Breton S, Tyszkowski R, Sabolic I, Brown D. Postnatal development of H<sup>+</sup> ATPase (proton-pump)-rich cells in rat epididymis. *Histochem Cell Biol* 1999; 111: 97-105.
68. Hermo L, Chong D, Moffatt P, Sly W, Waheed A, Smith C. Region and cell specific differences in the distribution of carbonic anhydrases II, III, XII and XIV in the rat adult epididymis. *J Histochem Cytochem* 2005.
69. Hamm L, Alpern R. Cellular mechanisms of renal acidification. In: Seldin D, Giebisch G (eds.), *The kidney, Physiology and Pathophysiology*, 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000: 1935-1979.
70. Seki G, Coppola S, Yoshitomi K, Burckhardt B, Samarzija I, Müller-Berger S, Fromter E. On the mechanism of bicarbonate exit from renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 1996; 49: 1671-1677.
71. Tsuruoka S, Swenson E, Petrovic S, Fujimura A, Schwartz G. Role of basolateral carbonic anhydrase in proximal tubular fluid and bicarbonate absorption. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F146-F154.
72. Breton S, Smith P, Lui B, Brown D. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Nat Med* 1996; 2: 470-472.
73. Brown D, Lui B, Gluck S, Sabolic I. A plasma membrane proton ATPase in specialized cells of rat epididymis. *Am J Physiol Cell Physiol* 1992; 263: C913-916.
74. Brown D, Smith P, Breton S. Role of V-ATPase-rich cells in acidification of the male reproductive tract. *J Exp Biol* 1997; 200: 257-262.

75. Herak-Kramberger C, Breton S, Brown D, Kraus O, Sabolic I. Distribution of the vacuolar H<sup>+</sup>ATPase along the rat and human reproductive tract. *Biol Reprod* 2001; 64: 1699-1707.
76. Hermo L, Adamali H, Andonian S. Immunolocalization of CA II and H<sup>+</sup> V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *J Androl* 2000; 21: 376-391.
77. Paunescu T, Da Silva N, Marchansky V, McKee M, Breton S, Brown D. Expression of the 56kDa B2 subunit isoform of the vacuolar H<sup>+</sup>ATPase in proton secreting cells of the kidney and epididymis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C149-162.
78. Smith A, Finberg K, Wagner C, Lifton RP, Devonald M, Su Y, Karet F. Molecular cloning and characterization of *Atp6n1b* a novel fourth murine vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase a-subunit gene. *The journal of biological chemistry* 2001; 276: 42382-42388.
79. Breton S, Hammar K, Smith P, Brown D. Proton secretion in the male reproductive tract: involvement of Cl<sup>-</sup>-independent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport. *Am J Physiol* 1998; 275: C1134-1142.
80. Wagner C, Finberg K, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel J. Renal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Physiol Rev* 2004; 84: 1263-1314.
81. Leung A, Wong P. Studies of transepithelial Cl<sup>-</sup> transport in cultured cauda epididymal cells of rats by the short-circuit current method. *J. Physiol.* 1992; 457: 391-406.
82. Sedlacek R, Carlin R, Singh A, Schultz B. Neurotransmitter-stimulated ion transport by cultured porcine vas deferens epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F557-570.
83. Chan H, Ko W, Zhao W, Fu W, Wong P. Evidence for independent Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion and involvement of an apical Na<sup>(+)</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in cultured rat epididymal epithelia. *Exp Physiol* 1996; 81: 515-524.
84. Leung G, Wong P. Activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat epididymal epithelium by genistein. *Biol Reprod* 2000; 62: 143-149.
85. Pastor-Soler N, Beaulieu V, Litvin TN, Da Silva N, Chen Y, Brown D, Buck J, Levin LR, Breton S. Bicarbonate regulated adenyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *J Biol Chem* 2003; 278: 49523-49529.
86. Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 94-103.
87. Sun-wada G-H, Wada Y, Futai M. Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATP-ase. *Cell Structure and function* 2003; 28: 455-463.
88. Sun-Wada G, Wada Y, Futai M. Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658: 106-114.
89. Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, Futai M, Sun-Wada G, Bourgoin S, Casanova J, Wildeman A, Bechoua S, Ausiello D, Brown D, Marshansky V. V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 124-136.
90. Moriyama Y, Maeda M, Futai M. The role of V-ATPase in neuronal and endocrine systems. *J Exp Biol* 1992; 172: 171-178.
91. Gluck S, Lee B, Wang S, Underhill D, Nemoto J, Holliday L. Plasma membrane V-ATPases in proton-transporting cells of the mammalian kidney and osteoclast. *Acta Physiol Scand Suppl* 1998; 643: 203-212.
92. Toyomura T, Murata Y, Yamamoto A, Oka T, Sun-wada G-H, Wada Y, Futai M. From lysosome to plasma membrane: localization of vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2003; 278: 22023-22030.

93. Trombetta E, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 2003; 299: 1400-1403.
94. Stankovic K, Brown D, Alper S, Adams J. Localization of pH regulating proteins H<sup>+</sup>-ATPase and Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in the guinea pig inner ear. *Hear Res* 1997; 114: 21-34.
95. Couloigner V, Teixeira M, Hulin P, Sterkers O, Bichara M, Escoubet B, Planelles G, Ferrary E. Effect of locally applied drugs on the pH of luminal fluid in the endolymphatic sac of guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: R1695-R1700.
96. Ferrary E, Sterkers O. Mechanisms of endolymph secretion. *Kidney Int* 1998; 53 suppl: S98-S103.
97. Brown D, Breton S. Structure, function and cellular distribution of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (H<sup>+</sup>-V-ATPase/proton pump). *The kidney 2000*.
98. Gluck SL, Nelson R, Lee B, Holliday L, Iyori M. Properties of kidney plasma membrane vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: proton pumps responsible for bicarbonate transport, urinary acidification, and acid-base homeostasis. *Organellar Proton ATPases 1995*.
99. Gruber G, Wieczorek H, Harvey W, Muller V. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J Exp Biol* 2001; 204: 2597-2605.
100. Nelson N, Harvey W. Vacuolar and plasma membrane proton-adenotriphosphatases. *Physiol Rev* 1999; 79: 361-385.
101. Dixon T, Al-Awqati Q. Urinary acidification in turtle bladder is due to a reversible proton-translocating ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 3135-3138.
102. Hirata T, Nakamura N, Omote H, Wada Y, Futai M. Regulation and reversibility of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 2000; 275: 386-389.
103. Mens R, Walker J, Leslie A. Structure of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell* 2001; 106: 331-341.
104. Yasuda R, Noji H, Yoshida M, Kinosita KJ, Itoh H. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* 2001; 402: 184-187.
105. Arata Y, Nishi T, Kawasaki-Nishi S, Shao E, Wilkens S, Forgac M. Structure, subunit function and regulation of the coated vesicle and yeast vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1555: 71-74.
106. Kane P. The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 177-191.
107. Futai M, Oka T, Sun-wada G-H, Moriyama Y, Kanazawa H, Wada Y. Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. *J Exp Biol* 2000; 203: 107-116.
108. Smith A, Lovering R, Futai M, Takeda J, Brown D, Karet F. Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H<sup>+</sup> -ATPase subunit genes. *Mol Cell* 2003; 12: 801-803.
109. Arata Y, Baleja J, Forgac M. Localization of subunits D, E, and G in the yeast V-ATPase complex using cysteine-mediated cross-linking to subunit B. *Biochemistry* 2002; 41: 11301-11307.
110. Arata Y, Baleja J, Forgac M. Cysteine-directed cross-linking to subunit B suggests that subunit E forms part of the peripheral stalk of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 2002; 277: 3357-3363.
111. Forgac M. Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicles and yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. *J Exp Biol* 2000; 203: 71-80.
112. Wilkens S, Vasilyeva E, Forgac M. Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *J Biol Chem* 1999; 274: 31804-31810.

113. Brown D, Breton S. Mitochondria-rich, proton-secreting epithelial cells. *J Exp Biol* 1996; 199: 2345-2358.
114. Curtis K, Francis S, Oluwatosin Y, Kane P. Mutational analysis of the subunit C (Vmap5p) of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 2002; 277: 8979-8988.
115. Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M. Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and in vivo dissociation. *J Biol Chem* 2001; 276: 17941-17948.
116. Shao E, Forgac M. Involvement of the nonhomologous regions of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and in vivo dissociation. *J Biol Chem* 2004; 279: 48663-48670.
117. Smith A, Borthwick K, Karet F. Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase C, G, and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 2002; 297: 169-177.
118. Sun-wada G-H, Murata Y, Namba M, Yamamoto A, Wada Y, Futai M. Mouse proton pump ATPase C subunit isoforms (C2-a and C2-b) specifically expressed in kidney and lung. *J Biol Chem* 2003; 278: 44843-44851.
119. Sun-wada G-H, Yoshimizu T, Imai-Senga Y, Wada Y, Futai M. Diversity of mouse proton-translocating ATPase: presence of multiple isoforms of the C, d and G subunits. *Gene* 2003; 302: 147-153.
120. Van Hille B, Richener H, Evans DB, Green JR, Bilbe G. Identification of two subunit A isoforms of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human osteoclastoma. *J Biol Chem* 1993; 268: 7075-7080.
121. Marushack M, Lee B, Masood K, Gluck S. cDNA sequence and tissue expression of bovine H(+)-ATPase M(r) 70,000 subunit. *Am J Physiol* 1992; 263: F171-174.
122. Nelson R, Guo X, Masood K, Brown D, Kalkbrenner M, Gluck S. Selectively amplified expression of an isoform of the vacuolar H(+)-ATPase 56-kilodalton subunit in renal intercalated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3541-3545.
123. Puopolo K, Kumamoto C, Adachi I, Magner R, Forgac M. Differential expression of the "B" subunit of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in bovine tissues. *J Biol Chem* 1992; 267: 3696-3706.
124. Pietrement C, Sun-Wada G, Da Silva N, McKee M, Marshansky V, Brown D, Breton S. Distinct expression patterns of different subunits of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol Reprod* 2006; 74: 185-194.
125. Wax M, Saito I, Tenkova T, Krupin T, Becker B, Nelson N, Brown D, Gluck S. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in ocular ciliary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 6752-6757.
126. Breton S, Wiederhold T, Marshansky V, Nsumu N, Ramesh V, Brown D. The B1 subunit of the H<sup>+</sup>-ATPase is a PDZ domain-binding protein. Colocalization with NHERF in renal B-intercalated cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 18219-18224.
127. Vargas-Poussou R, Houillier P, Le Pottier N, Strompf L, Loirat C, Baudouin V, Macher M, Dechaux M, Ulinski T, Nobili F, Eckart P, Novo R, Cailliez M, Salomon R, Nivet H, Cochat P, Tack I, Fargeot A, Bouissou F, Kesler G, Lorotte S, Godefroid N, Layet V, Morin G, Jeunemaitre X, Blanchard A. Genetic Investigation of Autosomal Recessive Distal renal Tubular Acidosis: Evidence for Early Sensorineural Hearing Loss Associated with Mutations in the ATPV0A4 gene. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1437-1443.
128. Karet FE, Finberg K, Nelson R, Nayir A, Mocan H, Sanjad S, Rodriguez-Soriano J, Santos F, Cremers C, Di Pietro A, Hoffbrand B, Winiarski J, Bakkaloglu A, Ozen S, Dusunsel R, Goodyer P, Hulton S, Wu D, Skvorak A, Morton C, Cunningham M, Jha

- V, Lifton RP. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H<sup>+</sup>-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet* 1999; 21: 84-90.
129. Stover E, Borthwick K, Bavalia C, Eady N, Fritz D, Rungroj N, Giersch A, Morton C, Axon P, Akil I, Al-Sabban E, Baguley D, Bianca S, Bakkaloglu A, Bircan Z, Chauveau D, Clermont M, Guala A, Hulton S, Kroes H, Li Volti G, Mir S, Mocan H, Nayir A, Ozen S, Rodriguez-Soriano J, Sanjad S, Tasic V, Taylor C, Topaloglu R, Smith A, Karet F. Novel ATP6V1B1 and ATP6V0A4 mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. *J Med Genet* 2002; 39: 796-803.
  130. Nelson H, Nelson N. Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase causes conditional lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 3503-3507.
  131. Yamashiro C, Kane P, Wolczyk D, Preston R, Stevens T. Role of vacuolar acidification in protein sorting and zymogen activation: a genetic analysis of the yeast vacuolar proton translocating ATPase. *Mol Biol Cell* 1990; 10: 3737-3749.
  132. Davies S, Goodwin S, Kelly D, Wang Z, Sozen M, Kaiser K, Dow J. Analysis and inactivation of *vha55*, the gene encoding the vacuolar ATPase B-subunit in *Drosophila melanogaster* reveals a larval lethal phenotype. *J Biol Chem* 1996; 271: 30677-30684.
  133. Abrahams J, Leslie A, Lutter R, Walker J. Structure at 2.8 angstrom resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 1994; 370: 621-628.
  134. Zhang J, Vasilyeva E, Feng Y, Forgac M. Inhibition and labeling of the coated vesicle V-ATPase by 2-azido-(<sup>32</sup>P)ATP. *J Biol Chem* 1995; 270: 15494-15500.
  135. Feng Y, Forgac M. Cysteine 254 of the 73-kDa A subunit is responsible for the inhibition of the coated vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase upon modification by sulfhydryl reagents. *J Biol Chem* 1992; 267: 5817-5822.
  136. Walker J, Fearnley I, Gay N, Gibson B, Northrop F, Powell S, Runswick M, Saraste M, Tybulewicz V. Primary structure and subunit stoichiometry of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine mitochondria. 1985; 184: 677-701.
  137. Vasilyeva E, Forgac M. 3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenine 5'-triphosphate inhibits activity of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase from bovine brain clathrin-coated vesicles by modification of a rapidly exchangeable, non catalytic nucleotide binding site on the B subunit. *J Biol Chem* 1996; 271: 12775-12782.
  138. Crider B, Andersen P, White A, Zhou Z, Li X, Mattsson J, Lundberg L, Keeling D, Xie X, Stone DK, Peng S-B. Subunit G of the vacuolar proton pump. Molecular characterization and functional expression. *J Biol Chem* 1997; 272: 10721-10728.
  139. Murata Y, Sun-Wada G, Yoshimizu T, Yamamoto A, Wada Y, Futai M. Differential localization of the vacuolar H<sup>+</sup> pump with G subunit isoforms (G1 and G2) in mouse neurons. *J Biol Chem* 2002; 277: 36296-36303.
  140. Imai-Senga Y, Sun-Wada G, Wada Y, Futai M. A human gene, ATP6E1, encoding a testis-specific isoform of H<sup>(+)</sup>-ATPase subunit E. *Gene* 2002; 289: 7-12.
  141. Sun-Wada G, Imai-Senga Y, Yamamoto A, Murata Y, Hirata T, Wada Y, Futai M. A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *J Biol Chem* 2002; 277: 18098-18105.
  142. Brody L, Abel K, Castilla L, Couch F, McKinley D, Yin G, Ho p, Merajver S, Chandrasekharappa S, Xu J, Cole J, Struwing J, Valdes J, Collins F, Weber B. Construction of a transcription map surrounding the BRCA1 locus of human chromosome 17. *Genomics* 1995; 25: 238-247.
  143. Peng S-B, Crider BP, Xie X, Stone DK. Alternative mRNA splicing generates tissue-specific isoforms of 116-kDa polypeptide of vacuolar proton pump. *J Biol Chem* 1994; 269: 17262-17266.



144. Peng S-B, Li X, Crider BP, Zhou Z, Andersen P, Tsai SJ, Xie X-S, Stone DK. Identification and reconstitution of an isoform of the 116-kDa subunit of the vacuolar proton translocating ATPase. *The journal of biological chemistry* 1999; 274: 2549-2555.
145. Toyomura T, Oka T, Yamaguchi C, Wada Y, Futai M. Three subunit a isoforms of mouse vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 2000; 275: 8760-8765.
146. Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, Giliani S, Abinun M, Mattsson JP, Keeling DJ, Andersson AK, Wallbrandt P, Zecca L, Notarangelo LD, Vezzoni P, Villa A. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet* 2000; 25: 343-346.
147. Smith A, Skaug J, Choate KA, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, Hulton SA, Sanjad SA, Al-Sabban EA, Lifton RP, Sherer SW, Karet FE. Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nature genetics* 2000; 26: 71-75.
148. Oka T, Murata Y, Namba M, Yoshimizu T, Toyomura T, Yamamoto A, Sun-Wada G, Hamasaki N, Wada Y, Futai M. a4, a unique kidney-specific isoform of mouse vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit a. *J Biol Chem* 2001; 276: 40050-40054.
149. Powell B, Gaham L, Stevens T. Molecular characterization of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase proton pore. *J Biol Chem* 2000; 275: 23654-23660.
150. Leng X, Manolson M, Liu Q, Forgac M. Site-directed mutagenesis of the 100-kDa subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. *J Biol Chem* 1996; 271: 22487-22493.
151. Inoue H, Noumi T, Nagata M, Murakami H, Kanazawa H. Targeted disruption of the gene encoding the proteolipid subunit of mouse vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase leads to early embryonic lethality. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1413: 130-138.
152. Bowman E, Siebers A, Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 7972-7976.
153. Drose S, Altendorf K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol* 1997; 200 ( Pt 1): 1-8.
154. Bowman B, Bowman E. Mutations in subunit c of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site. *J Biol Chem* 2002; 277: 3965-3972.
155. Crider B, Xie X, Stone D. Bafilomycin inhibits proton flow through the H<sup>+</sup> channel of vacuolar proton pumps. *J Biol Chem* 1994; 269: 17379-17381.
156. Huss M, Ingenhorst G, konig S, Gassel M, Drose S, Zeeck A, Altendorf K, Wieczorek H. Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V<sub>0</sub> subunit c. *J Biol Chem* 2002; 277: 40544-40548.
157. Zhang J, Feng Y, Forgac M. Proton conduction and bafilomycin binding by the V<sub>0</sub> domain of the coated vesicle V-ATPase. *J Biol Chem* 1994; 269: 23518-23523.
158. Iwata M, Imamura H, Stambouli E, Ikeda C, Tamakoshi M, Nagata K, Makyio H, Hankamer B, Barber J, Yoshida M, Yokoyama K, Iwata S. Crystal structure of central stalk subunit and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 59-64.
159. Lu M, Vergara S, Zhang L, Holliday L, Aris J, Gluck S. The amino-terminal domain of the E subunit of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) interacts with the H subunit and is required for V-ATPase function. *J Biol Chem* 2002; 277: 38409-38415.
160. Landolt-Marticorena C, Kahr W, Zawarinski P, Correa J, Manolson M. Substrate- and inhibitor-induced conformational changes in the yeast V-ATPase provide evidence for

- communication between the catalytic and proton-translocating sectors. *J Biol Chem* 1999; 274: 26057-26064.
161. Landolt-Marticorena C, William K, Correa J, Chen W, Manolson M. Evidence that the NH<sub>2</sub> terminus of vph1p, an integral subunit of the V<sub>0</sub> sector of the yeast V-ATPase, interacts directly with the Vma1p and Vma13p subunits of the V<sub>1</sub> sector. *J Biol Chem* 2000; 275: 15449-15457.
  162. Imamura H, Nakano M, Noji H, Muneyuki E, Ohkuma S, Yoshida M, Yokoyama K. Evidence for rotation of V<sub>1</sub>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2312-2315.
  163. Nakanishi-Matsui M, Futai M. Stochastic proton pumping ATPases: from single molecules to diverse physiological roles. *IUBMB Life* 2006; 58: 318-322.
  164. Hirata T, Iwamoto-Kihara A, Sun-Wada G, Okajima T, Wada Y, Futai M. Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G as to c subunit. *J Biol Chem* 2003; 278: 23714-23719.
  165. Yokoyama K, Nakano M, Imamura H, Yoshida M, Tamakoshi M. Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase. *J Biol Chem* 2003; 278: 24255-25258.
  166. Holthuis J, Jansen E, Schoonderwoert V, Burbach J, Martens G. Biosynthesis of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase accessory subunit Ac45 in *Xenopus* pituitary. *Eur J Biochem* 1999; 262: 484-491.
  167. Supek F, Supekova L, Mandiyan S, Pan Y, Nelson H, Nelson N. A novel accessory subunit for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase from chromaffin granules. *J Biol Chem* 1994; 269: 24102-24106.
  168. Schoonderwoert V, Martens G. Structural gene organization evolutionary aspects of the V-ATPase accessory subunit Ac45. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1574: 245-254.
  169. Muller O, Neumann H, Bayer M, Mayer A. Role of the Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking. *J Cell Sci* 2003; 116: 474-494.
  170. Finberg K, Wagner C, Stehberger P, Geibel J, Lifton R. Molecular cloning and characterization of *Atp6v1b1*, the murine vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase B1-subunit. *Gene* 2003; 318: 25-34.
  171. Brown D, Hirsch S, Gluck S. Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J Clin Invest* 1988: 2114-2126.
  172. Brown D, Hirsch S, Gluck S. An H<sup>+</sup>-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations. *Nature* 1988; 331: 622-624.
  173. Sabolic I, Wuarin F, Shi I, Verkman A, Ausiello D, Gluck S, Brown D. Apical endosomes isolated from kidney collecting duct principal cells lack subunits of the proton pumping ATPase. *J Cell Biol* 1992; 119: 111-122.
  174. Dou H, Finberg K, Cardell EL, Lifton R, Choo D. Mice lacking the B1 subunit of H<sup>+</sup> -ATPase have normal hearing. *Hear Res* 2003; 180: 76-84.
  175. Dou H, Xu J, Wang Z, Smith A, Soleimani M, Karet FE, Greinwald Jr J, Choo D. Co-expression of pendrin, vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 4-subunit and carbonic anhydrase II in epithelial cells of the murine endolymphatic sac. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 1377-1384.
  176. Bastani B, Ross F, Kopito R, Gluck S. Immunocytochemical localization of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion exchanger (erythrocyte band-3 protein) in avian osteoclasts: effect of calcium-deficient diet on polar expression of the H<sup>+</sup>-ATPase pump. *Calcif Tissue Int* 1996; 58: 332-336.
  177. Lee B, Holliday L, Ojikutu B, Krits I, Gluck S. Osteoclasts express the B2 isoform of vacuolar H(+)-ATPase intracellularly and on their plasma membranes. *Am J Physiol* 1996; 270: C382-388.
  178. Clulow J, Jones R, Hansen L, Man S. Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis. *J Reprod Fertil Suppl* 1998; 53: 1-14.

179. Clulow J, Jones R, Hansen L. Micropuncture and cannulation studies of fluid composition and transport in the ductuli efferentes testis of the rat: comparisons with the homologous metanephric proximal tubule. *Exp Physiol* 1994; 79.
180. Crabo B. Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars. *Acta Vet Scand* 1965; 22: 1-94.
181. Hansen L, Dacheux F, Man S, Clulow J, Jones R. Fluid reabsorption by the ductuli efferentes testis of the rat is dependent on both sodium and chlorine. *Biol Reprod* 2004; 71: 410-416.
182. Hohlbrugger G, Pfaller K. Post-vasectomy impairment of transepithelial water reabsorption in the initial segment of the epididymis. *Arch. Androl.* 1983; 11: 265-270.
183. Wong P, Yeung C. Absorptive and secretory functions of the perfused rat cauda epididymidis. *J. Physiol. (Lond.)* 1978; 275: 13-26.
184. Wong Y, Wong P, Yeung C. Ultrastructural correlation of water reabsorption in isolated rat cauda epididymidis. *Experientia* 1978; 34: 485-487.
185. Turner T, Cesarini D. The ability of the rat epididymis to concentrate spermatozoa. Responsiveness to aldosterone. *J androl* 1983; 4: 197-202.
186. Wong PY. CFTR gene and male fertility. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 107-110.
187. Da Silva N, Pietrement C, Brown D, Breton S. Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. *Biochim Biophys Acta* 2006; 2006 Jul 21; (Epub ahead of print).
188. King L, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 687-698.
189. Leung G, Gong X, Cheung K, Cheng-Chew S, Wong P. Expression of Cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Rat Efferent Duct Epithelium. *Biol Reprod* 2001; 64: 1509-1515.
190. Patrizio P, Salameh WA. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mRNA in normal and pathological adult human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1998; 53: 261-270.
191. Ruz R, Andonian S, Hermo L. Immunolocalization and regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the adult rat epididymis. *J Androl* 2004; 25: 265-273.
192. Wong P. Molecular and cellular physiology of electrolyte and fluid transport in the epididymis. In: Hinton B, Turner T (eds.), *Epididymis III: Third International Conference on the Epididymis*. Charlottesville: The Van Doren Company; 2002.
193. Cheung K, Leung C, Leung G, Wong P. Synergistic effects of cystic fibrosis transmembrane regulator and aquaporin-9 in the rat epididymis. *Biology of Reproduction* 2003; 68: 1505-1510.
194. Zardoya R. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell* 2005; 97: 397-414.
195. Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger U, Mackensie B, Devidas S, Guggino W, Van Hoek A, Hediger M. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J Biol Chem* 1998; 273: 24737-24743.
196. Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon T, Agre P, Knepper M. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 2002; 82: 205-244.
197. Brown D, Katsura T, Kawashima M, Verkman A, Sabolic I. Cellular distribution of the aquaporins: a family of water channel proteins. *Histochem Cell Biol* 1995; 104: 1-9.

198. Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, Nagelhus E, Ottersen O, Agre P, Nielsen S. Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye. *Am J Physiol* 1998; 224-234.
199. Kreda S, Gynn M, Fenstermacher D, Boucher R, Gabriel S. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 224-234.
200. Nielsen J, King L, Christensen B, Agre P. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol* 1997; 273: C1549-1561.
201. Morello J, Bichet D. Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 607-630.
202. Noda M, Sasaki S. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: molecular mechanism of water channel aquaporin-2 trafficking. *J Pharmacol Sci* 2004; 96: 249-254.
203. Deen P, Marr N, Kamsteeg E, van Balkom B. Nephrogenic diabetes insipidus. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9: 591-595.
204. Brown D. The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F893-901.
205. Fujiwara T, Bichet D. Molecular biology of hereditary diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 2005; 2836-2846.
206. Berry V, Francis P, Kaushal S, Moore A, Bhattacharya S. Missense mutation in MIP underlie autosomal dominant 'polymorphic' and lamellar cataracts linked to 12q. *Nat Genet* 2000; 25: 15-17.
207. Cho Y, Svelto M, Calamita G. Possible functional implications of aquaporins water channels in reproductive physiology and medically assisted procreation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)* 2003; 49: 515-519.
208. Verbavatz J, Brown D, Sabolic I, Valenti G, Ausiello D, Van Hoeck A, Ma T, Verkman A. Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes. A freeze-fracture study. *J Cell Biol* 1993; 123: 605-618.
209. Laski M. Structure-function relationships in aquaporins. *Semin Nephrol* 2006; 26: 189-199.
210. Setchell B, Scott T, Voglmayr J, Waites G. Characteristics of testicular spermatozoa and the fluid which transports them into the epididymis. *Biol Reprod* 1969; 1, Suppl 1: 40-66.
211. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 1992; 256: 385-387.
212. Brown D, Verbavatz J, Valenti G, Lui B, Sabolic I. Localization of the CHIP28 water channel in reabsorptive segments of the rat male reproductive tract. *Eur J Cell Biol* 1993; 61: 264-273.
213. Bradan H, Hermo L. Expression and regulation of aquaporins 1, 8, and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during post-natal development. *J Androl* 2002; 23: 358-373.
214. Zhou Q, Clarke L, Nie R, Carnes K, Lai L, Lien Y, Verkman A, Lubahn D, Fisher J, Katzenellenbogen B, Hess R. Estrogen action and male fertility: roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 14132-14137.
215. Oliveira C, Zhou Q, Carnes K, Nie R, Kuehl D, Jackson G, Franca L, Nakai M, Hess R. ER function in the adult male rat: short- and long-term effects of the antiestrogen ICI 182,780 on the testis and efferent ductules, without changes in testosterone. *Endocrinology* 2002; 143: 2399-2409.

216. Pastor-Soler N, Bagnis C, Sabolic I, Tyszkowski R, McKee M, van Hoek A, Breton S, Brown D. Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biol Reprod* 2001; 65: 384-393.
217. Hermo L, Krzeczunowicz D, Ruz r. Cell specificity of aquaporins 0, 3, and 10 expressed in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats. *J Androl* 2004; 25: 494-505.
218. Cooper T, Brooks D. Entry of glycerol into the rat epididymis and its utilization by epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1981; 61: 163-169.
219. Calamita G, Mazzone A, Bizzoca A, Svelto M. Possible involvement of aquaporin-7 and -8 in rat testis development and spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 619-625.
220. Elkjaer M, Vajda Z, Nejsum L, Kwon T, Jensen U, Amiry-Moghaddam M, Frokiaer J, Nielsen S. Immunolocalisation of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276.
221. Pastor-Soler N, Isgnard-Bagnis C, Herak-Kramberger C, Sabolic I, Van Hoek A, Brown D, Breton S. Expression of aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. *Biol Reprod* 2002; 66: 1716-1722.
222. Pietrement C, Pastor-Soler N, James M, Marsolais M, Laprade R, Van Hoeck A, Ramesh V, Brown D, Breton S. Contribution of the major water channel of epididymis, AQP9, to apical water and solute permeability: regulation by cAMP and potential participation of NHERF1 and CFTR. In: *Contraception TFoM* (ed.). Seattle; 2004.
223. Da Silva N, Silberstein C, Beaulieu V, Pietrement C, Van Hoeck A, Brown D, Breton S. Postnatal expression of aquaporins in epithelial cells of the rat epididymis. *Biol Reprod* 2005; 65: 427-438.
224. Calamita G, Mazzone A, Cho Y, Valenti G, Svelto M. Expression and localization of the aquaporin-8 water channel in rat testis. *Biol Reprod* 2001; 64: 1660-1666.
225. Elkjaer ML, Nejsum LN, Gresz V, Kwon TH, Jensen UB, Frokiaer J, Nielsen S. Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F1047-1057.
226. Nelson R, Stricklett P, Gustafson C, Stevens A, Ausiello A, Brown D, Kohan D. Expression of an AQP2 Cre recombinase transgene in kidney and male reproductive system of transgenic mice. *Am J Physiol* 1998; 275: C216-C226.
227. Stevens A, Breton S, Gustafson C, Bouley R, Nelson R, Kohan D, Brown D. Aquaporin 2 is a vasopressin-independent, constitutive apical membrane protein in rat vas deferens. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C791-802.
228. Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc J. Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking. *Endocrinology* 1998; 139: 4277-4285.
229. Martina J, Daniotti J, Maccioni H. Influence of N-glycosylation and N-Glycan trimming on the activity and intracellular traffic of GD3 synthase. *J Biol Chem* 1998; 273: 3725-3731.
230. Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 1993; 361: 549-552.
231. Sasaki S, Fushimi K, Ishibashi K, Marumo F. Water channels in the kidney collecting duct. *Kidney Int* 1995; 48: 1082-1087.
232. Hess R. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 52.

233. Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 35.
234. Zhou Q, Nie R, Prins G, Saunders P, Katzenellenbogen B, Hess R. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 2002; 23: 870-881.
235. Hess R, Gist D, Bunick D, Lubahn D, Farrell A, Bahr J, Cooke P, Greene G. Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J. Androl.* 1997; 18: 602-611.
236. Hess RA, Bunick D, Lubahn DB, Zhou Q, Bouma J. Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. *J Androl* 2000; 21: 107-121.
237. Ruz R, Gregory M, Smith C, Cyr D, Lubahn D, Hess R, Hermo L. Expression of aquaporins in the efferent ductules, sperm counts, and sperm motility in estrogen receptor-alpha deficient mice fed lab chow versus casein. *Mol Reprod and Development* 2006; 73: 226-237.
238. Oliveira C, Carnes K, Franca L, Hermo L, Hess R. Aquaporin -1 and -9 are differentially regulated by estrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. *Biol Cell* 2005; 97: 385-395.
239. Brone B, Eggermont J. PDZ proteins retain and regulate membrane transporters in polarized epithelial cells membrane. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C20-29.
240. Shenolikar S, Voltz J, Cunningham R, Weinman E. Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19: 362-369.
241. Donowitz M, Cha B, Zachos N, Brett C, Sharma A, Tse C, Li X. NHERF family and NHE3 regulation. *J Physiol* 2005; 567: 3-11.
242. Shenolikar S, Weinman E. NHERF: targeting and trafficking membrane proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F389-395.
243. Bretscher A, Chambers D, Nguyen R, Reczek D. ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 113-143.
244. James M, Beauchamp R, Manchanda N, Kazlauskas A, Ramesh V. A NHERF binding site links the betaPDGFR to the cytoskeleton and regulates cell spreading and migration. *J Cell Sci* 2004; 117: 2951-2961.
245. Gonzales-Agosti C, Wiederhold T, Herndon M, Grusella J, Ramesh V. Interdomain interaction of merlin isoforms and its influence on intermolecular binding to NHE-RF. *J Biol Chem* 1999; 274: 34438-34442.
246. Weinman E, Cunningham R, Wade J, Shenolikar S. The role of NHERF-1 in the regulation of renal proximal tubule sodium-hydrogen exchanger 3 and sodium-dependent phosphate cotransporter 2a. *J Physiol* 2005; 567: 27-32.
247. Weinman EJ, Steplock D, Tate K, Hall RA, Spurney RF, Shenolikar S. Structure-function of recombinant Na/H exchanger regulatory factor (NHE-RF). *J Clin Invest* 1998; 101: 2199-2206.
248. Yoo D, Flagg T, Olsen O, Raghuram V, Foskett J, Welling P. Assembly and trafficking of a mutiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem* 2004; 279: 6863-6873.
249. Neely J, Amiry-Moghaddam M, Ottersen O, Froehner S, Agre P, Adams M. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 14108-14113.
250. Stuhmann M, Dork T. CFTR gene mutations and male infertility. *Andrologia* 2000; 32: 71-83.

251. Férec C, Verlingue C, Mercier B. Le gène CFTR : agénésie des déférents et mucoviscidose, deux maladies pour un même gène. *Médecine/Sciences* 1996; 12: 485-490.
252. Turner TT. On the epididymis and its function. *Invest Urol* 1979; 16: 311-321.
253. Johnson A, Howards S. Hyperosmolality in intraluminal fluids from hamster testis and epididymis: a micropuncture study. *Science* 1977; 195: 492-493.
254. Brown D, Lydon J, McLaughlin M, Stuart-Tilley A, Tyzskowski R, Alpert S. Antigen retrieval in cryostat sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS). *Histochem Cell Biol* 1996; 105: 261-267.
255. Breton S, Beck J, Cardinal J, Giebisch G, Laprade R. Involvement and source of calcium in volume regulatory decrease of collapsed proximal convoluted tubule. *Am J Physiol* 1992; 263: F656-F664.
256. Breton S, Nsumu N, Galli T, Sabolic I, Smith P, Brown D. Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin inhibits proton secretion in the male reproductive tract. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F717-F725.
257. Beaulieu V, Da Silva N, Brown C, Smith P, Brown D, Breton S. Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H<sup>+</sup>ATPase (V-ATPase) recycling. *J Biol Chem* 2005; 280: 8452-8463.
258. Nishi T, Forgac M. Molecular cloning and expression of three isoforms of the 100-kDa a subunit of the mouse vacuolar proton-translocating ATPase. *J Biol Chem* 2000; 275: 6824-6830.
259. Zeuzem S, Feick P, Zimmermann P, Haase W, Kahn RA, Schulz I. Intravesicular acidification correlates with binding of ADP-ribosylation factor to microsomal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6619-6623.
260. Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J. Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem* 1994; 269: 21-24.
261. Maranda B, Brown D, Bourgoin S, Casanova JE, Vinay P, Ausiello DA, Marshansky V. Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the Arf-nucleotide exchange factor ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *J Biol Chem* 2001; 276: 18540-18550.
262. Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett* 2003; 545: 76-85.
263. Bauerle C, Ho M, Lindorfer M, Stevens T. The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase membrane sector. *J Biol Chem* 1993; 268: 12749-12757.
264. Nishi T, Kawasaki-Nishi S, Forgac M. Expression and function of the mouse V-ATPase d subunit isoforms. *J Biol Chem* 2003; 278: 46396-46402.
265. Finberg K, Wagner C, Bailey M, Paunescu T, Breton S, Brown D, Giebisch G, Geibel J, Lifton R. The B1-subunit of the H<sup>+</sup>ATPase is required for maximal urinary acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13616-13621.
266. Deliot N, Hernando N, Horst-Liu Z, Gisler S, Capuano P, Wagner C, Bacic D, O'Brien S, Biber J, Murer H. Parathyroid hormone treatment induce dissociation of type IIa Na<sup>+</sup>-P(1) cotransporter-Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1 complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C159-167.
267. Mendes F, Farinha C, Roxo-Rosa M, Fanen P, Edelman A, Dormer R, McPherson M, Davidson H, Puchelle E, De Jonge H, Heda G, Gentsch M, Lukacs GL, Penque D, Amaral M. Antibodies for CFTR studies. *Journal of Cystic Fibrosis* 2004; 3: 69-72.
268. Weinman E, Steplock D, Wang Y, Shenolikar S. Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *J Clin Invest* 1995; 95: 2143-2149.

269. Weinman E, Steplock D, Donowitz M, Shenolikar S. NHERF associations with sodium-hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3) and ezrin are essential for cAMP-mediated phosphorylation and inhibition of NHE3. *Biochemistry* 2000; 39: 6123-6129.
270. Sidhaye V, Hoffert J, King L. cAMP has distinct acute and chronic effects on aquaporin-5 in lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 3590-3596.
271. Lamprecht G, Weinman E, Yun C. The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. *J Biol Chem* 1998; 273: 29972-29978.
272. Moyer B, Denton J, Karlson K, Reynolds D, Wang S, Mickle J, Milewski M, Cutting G, Guggino W, Li M, Stanton B. A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest* 1999; 140: 1353-1361.
273. Short D, Trotter K, Reczek D, Kreda S, Bretscher A, Boucher R, Stutts M, Milgram S. An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; 273: 19797-19801.
274. Ladas J. Structural insights into the CFTR-NHERF interaction. *J Membr Biol* 2003; 192: 79-88.
275. Guerra L, Fanelli T, Favia M, Riccardi S, Busco G, Cardone R, Carrabino S, Weinman E, Reshkin S, Conese M, Casavola V. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor Isoform 1 Overexpression Modulates Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Expression and Activity in Human Airway 16HBE14o-cells and Rescue  $\delta$ F508 CFTR Functional Expression in Cystic Fibrosis Cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 40925-40933.
276. Raghuram V, Hormuth H, Foskett J. A kinase-regulated mechanism controls CFTR channel gating by disrupting bivalent PDZ domain interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9620-9625.
277. Yang Q, Li G, Singh S, Alexander E, Schwartz J. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase B1 subunit mutations that cause inherited renal tubular acidosis affect proton pump assembly and trafficking in inner medullary collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1858-1866.
278. Blau H, Freud E, Mussaffi H, Werner M, Konen O, Rathaus V. Urogenital abnormalities in male children with cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2002; 87: 135-138.
279. Doull I. Recent advances in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2001; 85: 62-66.
280. Gaillard D, Carre-Pigeon F, Lallemand A. Normal vas deferens in fetuses with cystic fibrosis. *J Urol* 1997; 158: 1549-1552.



## Listes des figures

Figure 1.....	15
Figure 2.....	16
Figure 3.....	18
Figure 4.....	21
Figure 5.....	23
Figure 6.....	25
Figure 7.....	26
Figure 8.....	28
Figure 9.....	32
Figure 10.....	34
Figure 11.....	36
Figure 12.....	41
Figure 12bis.....	40
Figure 13.....	53
Figure 14.....	57
Figure 15.....	83
Figure 16.....	92
Figure 17.....	93
Figure 18.....	104
Figure 19.....	113

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Sous-unités de la H <sup>+</sup> -ATPase vacuolaire chez l'homme.....	42
<b>Tableau 2</b> : Composition des solutions intraluminale et basolatérale utilisées pour la perfusion des épидидymes in vitro.....	79

# Table des matières

Page titre.....	1
Remerciements.....	2
Sommaire.....	6
Abréviations.....	7
Résumé en français.....	8
Résumé en anglais.....	9
<b>Avant-propos</b> .....	<b>10</b>
<b>1-Introduction</b> .....	<b>13</b>
<b>1-1 Histologie de l'épididyme</b> .....	<b>14</b>
<b>1-1-1 Localisation-Structure</b> .....	<b>14</b>
<b>1-1-2 L'épithélium</b> .....	<b>17</b>
<b>1-1-3 Fonctions de l'épididyme</b> .....	<b>17</b>
<b>1-2 Origine embryologique de l'épididyme</b> .....	<b>20</b>
<b>1-2-1 Une origine commune avec le rein</b> .....	<b>20</b>
1-2-1.a Le pronéphros.....	22
1-2-1.b Le mésonéphros et les conduits mésonéphrotiques.....	22
1-2-1.c Le métanéphros.....	24
<b>1-2-2 Développement des testicules</b> .....	<b>24</b>
<b>1-2-3 Formation de l'épididyme</b> .....	<b>27</b>
<b>1-3 L'équilibre acido-basique dans l'épididyme</b> .....	<b>27</b>
<b>1-3-1 Réabsorption des bicarbonates dans la partie proximale de l'épididyme</b> .....	<b>29</b>
1-3-1.a L'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ NHE3.....	29
1-3-1.b L'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ NHE2.....	30
1-3-1.c Les échangeurs $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ NBCe1-A et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE2.....	30
1-3-1.d Anhydrases carboniques.....	30
1-3-1.e Modèle de réabsorption des bicarbonates .....	31
<b>1-3-2 Sécrétion nette de protons dans la partie distale de l'épididyme</b> .....	<b>31</b>
1-3-2.a Rôle de la $\text{H}^+$ ATPase vacuolaire dans la sécrétion de protons.....	31

1-3-2.b Rôle de l'anhydrase carbonique dans la sécrétion de protons.....	31
1-3-2.c Transport de $\text{HCO}_3^-$ .....	33
1-3-2.d Modèle de sécrétion des protons.....	33
<b>1-3-3 Dynamique de l'équilibre acido-basique.....</b>	<b>35</b>
<b>1-4 <math>\text{H}^+</math>-ATPase vacuolaires.....</b>	<b>35</b>
1-4-1 Rôle des $\text{H}^+$ -ATPases vacuolaires.....	35
<b>1-4-2 Structure générale des <math>\text{H}^+</math>-ATPases vacuolaires.....</b>	<b>38</b>
1-4-2.a Les $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPases mitochondriales.....	38
1-4-2.b Les domaines de la $\text{H}^+$ -ATPase vacuolaire.....	39
1-4-2.c Les sous-unités de la $\text{H}^+$ -ATPase vacuolaire.....	39
1-4-2.d Le canal à protons.....	45
1-4-2.e La tige.....	45
1-4-2.f Protéines associées.....	46
<b>1-4-3 Distribution cellulaire des <math>\text{H}^+</math>-ATPases vacuolaires.....</b>	<b>47</b>
1-4-3.a Epididyme et canal déférent.....	47
1-4-3.b Le rein.....	48
1-4-3.c L'oreille interne.....	48
1-4-3.d Les ostéoclastes.....	48
<b>1-5 Transport de l'eau dans l'appareil reproducteur masculin.....</b>	<b>49</b>
1-5-1 Réabsorption d'eau tout au long de l'appareil reproducteur masculin.....	49
1-5-2 Rôle de CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) dans les mouvements d'eau.....	50
<b>1-6 La famille des aquaporines.....</b>	<b>51</b>
<b>1-6-1 Structure des aquaporines.....</b>	<b>52</b>
1-6-1.a Structure du monomère.....	52
1-6-1.b Structure en tétramère.....	52
<b>1-6-2 Sélectivité et régulation de l'ouverture du canal.....</b>	<b>52</b>
<b>1-6-3 Les aquaporines dans les canaux efférents.....</b>	<b>54</b>
1-6-3.a Aquaporine 1.....	54
1-6-3.b Autres aquaporines.....	55
<b>1-6-4 Les aquaporines dans l'épididyme.....</b>	<b>56</b>
1-6-4.a Aquaporine 1.....	56

1-6-4.b Aquaporine 9.....	56
1-6-4.c Autres aquaporines.....	58
<b>1-6-5 Les aquaporines dans le canal déférent .....</b>	<b>58</b>
1-6-5.a Aquaporine 1.....	59
1-6-5.b Aquaporine 2 .....	59
1-6-5.c Aquaporine 9.....	59
<b>1-6-6 Régulation des aquaporines dans l'épididyme.....</b>	<b>59</b>
1-6-6.a ARN messagers.....	60
1-6-6.b Glycosylation.....	60
1-6-6.c Recyclage ou rétention à la membrane.....	60
1-6-6.d Régulation hormonale.....	61
1-6-6.e Interaction protéique.....	61
*NHERF1 une protéine PDZ (Psd-95, Disc large, ZO-1) .....	62
*CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)....	62
<b>2- Questions posées et objectifs.....</b>	<b>64</b>
<b>3- Matériels et méthodes .....</b>	<b>68</b>
<b>3-1 Biologie cellulaire.....</b>	<b>69</b>
3-1-1 Anticorps et peptides.....	69
3-1-2 Immunofluorescence : microscopie conventionnelle et confocale.....	70
3-1-3 Immunomarquage à l'or et microscopie électronique.....	71
<b>3-2 Biochimie.....</b>	<b>72</b>
3-2-1 Extraction protéique.....	72
3-2-2 Préparation des membranes apicales.....	72
3-2-3 Immunoprécipitations (IP) et co immunoprécipitations (co-IP)	73
3-2-4 Technique de <i>Western blot</i> .....	74
3-2-5 Déglycosylation.....	74
3-2-6 Déphosphorylation.....	74
3-2-7 Préparation des protéines recombinantes dérivées de la protéine NHERF1.....	75
3-2-8 Analyses de recouvrement de gel ( <i>overlay</i> ).....	75
3-2-9 Préparation des protéines recombinantes dérivées de la partie C-terminale de l'aquaporine 9.....	76

3-2-10 Co-précipitation ( <i>Pull down</i> ).....	77
<b>3-3 Etudes fonctionnelles sur des tubes d'épididyme perfusés</b>	
<b>in vitro</b> .....	77
<b>4-Résultats</b> .....	80
<b>4-1 Description des localisations différentes des isoformes</b>	
<b>de plusieurs sous-unités de la H<sup>+</sup>ATPase vacuolaire</b>	
<b>dans l'épididyme de rat</b> .....	81
Résumé de l'article.....	81
Article.....	84
<b>4-2 L'aquaporine 9 est une protéine qui se lie aux protéines</b>	
<b>ayant des domaines PDZ, elle interagit avec NHERF1 et est</b>	
<b>activée par l'AMPcyclique</b> .....	86
Résumé de l'article.....	86
Article.....	88
<b>4-3 Interaction entre CFTR et l'aquaporine 9</b> .....	90
Résumé .....	90
4-3-1 Co-localisation de l'aquaporine 9 et de CFTR.....	91
4-3-2 Co-immunoprécipitation de CFTR avec l'aquaporine 9.....	91
<b>5-Discussion</b> .....	94
<b>6-Conclusions et perspectives</b> .....	109
Références bibliographiques.....	115
Liste des figures.....	131
Liste des tableaux.....	132
Figure.....	138

## Résumé

L'épididyme est l'organe où les spermatozoïdes deviennent matures et où ils sont stockés dans un état quiescent. La lumière de l'épididyme est limitée par un épithélium hétérogène composé de deux principaux types cellulaires aux fonctions distinctes et complémentaires. Un pH intra-luminal acide par rapport au plasma est créé par la réabsorption des bicarbonates par les cellules principales dans les parties proximales, et par la sécrétion de protons, par les cellules claires via la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, dans les zones distales. Les cellules principales interviennent dans les mouvements d'eau et de solutés, via l'aquaporine 9, régulant la concentration du sperme. Nous montrons la spécificité de la composition en sous-unités, et en isoformes, de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire exprimée à la membrane apicale des cellules claires et en intracellulaire dans les deux types cellulaires. Nous montrons que la réabsorption du glycérol par l'aquaporine 9 est stimulée par l'AMP cyclique. Cette stimulation pourrait être en relation avec les interactions, que nous mettons en évidence, de l'aquaporine 9 avec NHERF1, et de l'aquaporine 9 avec CFTR. Au delà de l'intérêt d'une meilleure connaissance de la physiologie de l'épididyme, ce travail permet d'aborder la physiopathologie de la stérilité dans la mucoviscidose, et des phénomènes cellulaires généraux : la relation structure/fonction de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire et la régulation de l'aquaporine 9.

---

## Mots clés

Acidification luminale  
Concentration des spermatozoïdes  
NHERF  
CFTR  
Mucoviscidose  
Fertilité





## Distinct Expression Patterns of Different Subunit Isoforms of the V-ATPase in the Rat Epididymis<sup>1</sup>

C. Pietrement,<sup>3</sup> G-H. Sun-Wada,<sup>5</sup> N. Da Silva,<sup>3</sup> M. McKee,<sup>3</sup> V. Marshansky,<sup>3,4</sup> D. Brown,<sup>3,4</sup> M. Futai,<sup>6</sup> and S. Breton<sup>2,3,4</sup>

Program in Membrane Biology,<sup>3</sup> Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114

Department of Medicine,<sup>4</sup> Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215

Department of Biochemistry,<sup>5</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College, Kyoto 610-0332, Japan  
Futai Special Laboratory,<sup>6</sup> Microbial Chemistry Research Center, Microbial Chemistry Research Foundation and CREST, Japan Science and Technology Agency, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0021, Japan

### ABSTRACT

In the epididymis and vas deferens, the vacuolar H<sup>+</sup>ATPase (V-ATPase), located in the apical pole of narrow and clear cells, is required to establish an acidic luminal pH. Low pH is important for the maturation of sperm and their storage in a quiescent state. The V-ATPase also participates in the acidification of intracellular organelles. The V-ATPase contains many subunits, and several of these subunits have multiple isoforms. So far, only subunits ATP6V1B1, ATP6V1B2, and ATP6V1E2, previously identified as B1, B2, and E subunits, have been described in the rat epididymis. Here, we report the localization of V-ATPase subunit isoforms ATP6V1A, ATP6V1C1, ATP6V1C2, ATP6V1G1, ATP6V1G3, ATP6V0A1, ATP6V0A2, ATP6V0A4, ATP6V0D1, and ATP6V0D2, previously labeled A, C1, C2, G1, G3, a1, a2, a4, d1, and d2, in epithelial cells of the rat epididymis and vas deferens. Narrow and clear cells showed a strong apical staining for all subunits, except the ATP6V0A2 isoform. Subunits ATP6V0A2 and ATP6V1A were detected in intracellular structures closely associated but not identical to the TGN of principal cells and narrow/clear cells, and subunit ATP6V0D1 was strongly expressed in the apical membrane of principal cells in the apparent absence of other V-ATPase subunits. In conclusion, more than one isoform of subunits ATP6V1C, ATP6V1G, ATP6V0A, and ATP6V0D of the V-ATPase are present in the epididymal and vas deferens epithelium. Our results confirm that narrow and clear cells are well fit for active proton secretion. In addition, the diverse functions of the V-

ATPase may be established through the utilization of specific subunit isoforms. In principal cells, the ATP6V0D1 isoform may have a physiological function that is distinct from its role in proton transport via the V-ATPase complex.

*epididymis, vas deferens*

### INTRODUCTION

The vacuolar-H<sup>+</sup>ATPase (V-ATPase) is a multisubunit enzyme that couples ATP hydrolysis to proton pumping across membranes. It is ubiquitously expressed in eukaryotic cells, where it participates in the acidification of highly differentiated organelles, including the Golgi apparatus, lysosomes, endosomes, and secretory vesicles [1–4]. In addition, the V-ATPase is also found at high density in the plasma membrane of specialized epithelial cells that are involved in active proton transport and pH regulation of extracellular compartments, such as narrow and clear cells in the epididymis and vas deferens [5–8], renal intercalated cells [9–11], osteoclasts [12], or some cell types in the inner ear, including interdental cells, which resemble renal intercalated cells [13, 14]. In the epididymis and proximal vas deferens, plasma membrane V-ATPase in narrow and clear cells [6, 8, 15] is involved in the establishment of an acidic luminal pH that contributes to maintaining spermatozoa in a quiescent state during their maturation and storage in these organs [16, 17]. In the kidney, expression of the V-ATPase in the plasma membrane of collecting duct intercalated cells is critical for the regulation of systemic acid/base balance [1, 4, 18]. In osteoclasts, the V-ATPase plays a vital role in bone resorption [12, 19], and in the inner ear it is involved in maintaining the high K<sup>+</sup> level of the endolymph that is essential for hearing [13, 14, 20]. Thus, in each individual cell type, the V-ATPase functions in a variety of distinct cellular processes.

The V-ATPase is a complex enzyme that is composed of many subunits and is divided into two distinct sectors [1–4, 21, 22]. The V<sub>0</sub> sector is responsible for proton translocation and is composed of the transmembrane subunits previously designated by the lowercase letters *a*, *c*, *c'*, *c''*, and *d*. The V<sub>1</sub> sector forms a large cytosolic domain composed of eight subunits, designated by the uppercase letters A–H in a stoichiometry of A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>CDEF<sub>2</sub>H and is anchored to the plasma membrane via its interaction with the V<sub>0</sub> domain [23]. In view of the complexity of this enzyme, a new nomenclature for each of its subunits has been recently presented and approved by both the Human and the Mouse Gene Nomenclature Committees [22]. This revised nomenclature is shown in Table 1. For simplicity, the abbreviated, single-letter subunit identification will be used throughout the text. The precise function of many of the V-

<sup>1</sup>Supported by National Institutes of Health grants HD40793 (to S.B.), DK38452 (to D.B. and S.B.), and DK42956 (to D.B.); grants from the Committee of American Memorial Hospital of Reims, France; the Conseil Régional de Champagne-Ardenne, France; and the Ministère des Affaires Étrangères (Concours Lavoisier), France (to C.P.); and grants-in-aid from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (to M.F. and G-H.S-W.). The work performed in the Microscopy Core Facility of the Massachusetts General Hospital Program in Membrane Biology was supported by Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease grant DK43351 and Boston Area Diabetes and Endocrinology Research Center award DK57521.

<sup>2</sup>Correspondence: Sylvie Breton, Massachusetts General Hospital, Simches Research Center, Program in Membrane Biology, 185 Cambridge St., CPZN 8202, Boston, MA 02114. Fax: 617 643 3182; e-mail: sbreton@partners.org

Received: 13 May 2005.

First decision: 31 May 2005.

Accepted: 23 September 2005.

© 2006 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>

TABLE 1. Revised nomenclature of Human V-ATPase subunit isoforms (based on Smith et al. [22]).

Subunit name abbreviations used in this work	Subunit name following standar protein nomenclature	Approximate molecular weight (kDa)
<i>V</i> <sub>1</sub> peripheral sector		
<i>A</i>	ATP6V1A	70
<i>B1</i>	ATP6V1B1	56
<i>B2</i>	ATP6V1B2	
<i>C1</i>	ATP6V1C1	42
<i>C1</i>	ATP6V1C2	
<i>D</i>	ATP6V1D	34
<i>E1</i>	ATP6V1E1 (testis-specific)	31
<i>E2</i>	ATP6V1E2 (ubiquitous)	
<i>F</i>	ATP6V1F	14
<i>G1</i>	ATP6V1G1	13
<i>G</i>	ATP6V1G2	
<i>G3</i>	ATP6V1G3	
<i>H</i>	ATP6V1H	50
<i>V</i> <sub>0</sub> membrane sector		
<i>a1</i>	ATP6V0A1	100-116
<i>a2</i>	ATP6V0A2	
<i>a3</i>	ATP6V0A3	
<i>a4</i>	ATP6V0A4	
<i>d1</i>	ATP6V0D1	38
<i>d2</i>	ATP6V0D2	
<i>c</i>	ATP6V0C	16
<i>c''</i>	ATP6V0B	21
<i>e</i>	ATP6V0E	9

ATPase subunits remains unknown, although subunit deletion studies, mainly in yeast, have described a variety of effects on assembly and function of the holoenzyme [24–26]. In addition, some of these subunits have more than one isoform encoded by different genes and with different tissue and subcellular expression patterns [4, 27–31]. Only one form has been identified for the *A* subunit of the human V-ATPase [31]. This ubiquitous subunit has a nucleotide-binding site and is thought to be the catalytic subunit of the V-ATPase. Subunit *B* is present in two isoforms: the *B1* isoform, originally called the kidney isoform of the 56-kDa subunit, and the *B2* isoform, originally called the brain isoform of the 56-kDa subunit [32, 33]. Subunits *C*, *G*, and *E* are part of the peripheral stalk that connects the *V*<sub>1</sub> and *V*<sub>0</sub> domains of the V-ATPase [34]. Two human isoforms are known for the *C* subunit. *C1* is ubiquitously expressed, whereas *C2* has so far been detected only in kidney and lung [27, 30]. Three *G* subunit isoforms have been described: *G1*, *G2*, and *G3*. *G1* is ubiquitously expressed, *G2* is brain specific, and *G3* has been localized in the kidney [27, 30, 35, 36]. Two *E* subunit isoforms were identified: the sperm-specific *E1* isoform and the ubiquitously expressed *E2* isoform (originally called the 31-kDa subunit, or the *E* subunit) [37, 38]. Subunit *a* is the largest subunit of the V-ATPase and is part of the *V*<sub>0</sub> domain of the pump. Four *a* subunit isoforms have been identified in the human V-ATPase: *a1*, *a2*, *a3*, and *a4* [4]. Subunit *a1* is expressed ubiquitously [39, 40]; subunit *a2* was detected in the kidney, lung, and spleen [41]; and subunit *a3* was localized in osteoclasts [42, 43], where it is essential for bone resorption [44]. Subunit *a4* was detected in the kidney, inner ear, and the murine epididymis [45, 46]. Two *d* subunit isoforms have been identified for the human V-ATPase: *d1* is ubiquitous, whereas *d2* is present in kidney, lung, and osteoclast [27].

Recent studies suggested that the diverse physiological functions of the V-ATPase in different membranes are established through the utilization of specific subunit isoforms [30, 36, 37, 43]. Selective interactions between these different

isoforms were proposed to govern the subcellular V-ATPase targeting and to determine whether the pump will be located either in intracellular structures or in the plasma membrane.

Our laboratory has shown expression of subunits *B1*, *B2*, and *E2* in narrow and clear cells of the rat and human epididymis and vas deferens [6, 8, 15, 47, 48]. More recently, localization of subunit *a4* was reported in the murine epididymis [28]. Staining of narrow and clear cells in the mouse epididymis was also obtained using an antibody raised against the 67-kDa subunit (subunit *A*) of the V-ATPase expressed in the fungus *Neurospora crassa* [49]. However, very little is known about the localization of other subunits of the V-ATPase in the epididymis and vas deferens, and the present study is aimed at characterizing the cellular and subcellular localization of subunits *A*, *C1*, *C2*, *G1*, *G3*, *a1*, *a2*, *a4*, *d1*, and *d2* in epithelial cells of these organs.

## MATERIALS AND METHODS

### Antibodies

Affinity-purified rabbit polyclonal antibodies against the V-ATPase *C1*, *C2*, *G1*, *G3*, *a1*, *a2*, *a4*, *d1*, and *d2* subunit isoforms were used. These antibodies have been characterized previously [29]. An affinity-purified polyclonal antibody raised in chicken against the V-ATPase *E2* subunit was also used to identify narrow and clear cells [47, 50, 51]. A novel affinity-purified rabbit polyclonal antibody against the last 10 amino acids (CMQNAFRSLE) of the C-terminal tail of the V-ATPase *A* subunit was also used and was characterized in this study. A monoclonal mouse anti-TGN38 antibody was purchased from BD Transduction Laboratories to identify the *trans*-Golgi network. The following affinity-purified secondary antibodies were used, as appropriate: 1) a goat anti-rabbit IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), 2) a donkey anti-chicken IgY conjugated to indocarbocyanine (Cy3) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), 3) and a donkey anti-mouse IgG conjugated to Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

### Immunofluorescence: Conventional and Confocal Microscopy

Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) were acquired, retained, and used in compliance with the National Research Council's recommendations. Sexually mature male rats were anesthetized with Nembutal (0.5 ml i.p.; Abbott Laboratories, North Chicago, IL) and perfused via the left ventricle with PBS (0.9% NaCl in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) followed by fixative containing 4% paraformaldehyde, 10 mM sodium periodate, 75 mM lysine, and 5% sucrose in 0.1 M sodium phosphate buffer (PLP), as described previously [6, 7, 52]. Epididymis and vas deferens were cryoprotected in 30% sucrose/PBS, mounted for cryosectioning in Tissue-Tek OCT compound 4583 (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA), and quick-frozen. Sections were cut at 5 μm using a Reichert-Jung 2800 Frigocut cryostat (Leica Microsystems, Inc., Bannockburn, IL) and picked up onto Superfrost/Plus microscope slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). For indirect immunofluorescence microscopy, sections were hydrated 15 min in PBS and treated for 4 min with 1% SDS—an antigen retrieval procedure that we have previously described [53]. Sections were washed in PBS (3× for 5 min) and then blocked in PBS containing 1% BSA for 15 min. Primary antibodies were applied in a moist chamber for 90 min at room temperature or overnight at 4°C. Sections were washed in high-salt PBS (2.7% NaCl) twice for 5 min and once in normal PBS. Secondary antibody was then applied for 1 h at room temperature followed by washes as described above. Slides were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Some sections were double-stained by subsequent incubation with another primary antibody raised in a different species, followed by an appropriate secondary antibody.

Digital images were acquired using a Nikon Eclipse 800 epifluorescence microscope (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY) using a Hamamatsu Orca 100 CCD camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ), analyzed using IPLab scientific image processing software (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA), and imported into Adobe Photoshop image editing software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA). Some images were taken using a Radiance 2000 confocal microscopy system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using LaserSharp 2000 version 4.1 software and were imported into Adobe Photoshop software as TIFF files.

### Protein Extraction and Western Blotting

Epididymis was harvested from anesthetized rats. Tissue was cut into small pieces and rinsed several times in PBS/protease inhibitors to remove most of the sperm. Tissue was homogenized in 10 ml/g of buffer containing 250 mM sucrose, 18 mM Tris, 1 mM EDTA, and complete protease inhibitor (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), adjusted to pH 7.4 with HEPES, using a PRO 200 homogenizer followed by 20 strokes in a glass potter fitted with a Teflon pestle (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). The protein concentration was determined with the bicinchoninic acid protein assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) using albumin as a standard.

Protein extracts were diluted in Laemmli sample buffer, boiled for 1 min, and loaded onto Tris-glycine polyacrylamide 4%–20% gradient gels (PAGE Duramide Precast Gels, 4%–20% Tris-glycine Gels; Cambrex, Rockland, ME). After SDS-PAGE separation, proteins were transferred onto an Immobilon-P nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% nonfat dry milk and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies at a concentration of 0.5 µg/ml in TBS containing 2.5% milk. After three washes in TBS with 0.1% Tween 20 and 15-min block in TBS with milk, membranes were incubated with a donkey anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 1 h at room temperature. After five further washes, antibody binding was detected with the Western Lightning Chemiluminescence reagent (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) and Kodak X-Omat blue XB-1 films.

### Immunogold Staining for Electron Microscopy

Rats were perfused as described above with a solution containing 4% PLP and 0.01% glutaraldehyde in PBS. Small pieces of tissue were cryoprotected in 2.3 M sucrose in PBS. Ultrathin cryosections were cut on a Leica EM FCS at –80°C and collected onto formvar-coated gilded 200-mesh grids. Sections were blocked for 10 min on drops of 5% (v/v) normal goat serum plus 1% (w/v) bovine serum albumin in PBS. The anti-subunit A antibody was applied at a final concentration of 1:100 in DAKO diluent (DAKO Corp., Carpinteria, CA) for 1 h at room temperature. Following several washes in PBS, the antibody was labeled with goat anti-rabbit IgG conjugated to 15-nm gold particles (Ted Pella, Inc, Redding, CA) at a final concentration of 1:20 in DAKO diluent for 1 h at room temperature. After several rinses in distilled water, the sections were stained on ice-cold drops of uranyl acetate/tylose solution for 10 min and allowed to air-dry. The sections were examined in a Philips CM 10 transmission electron microscope at 80 kV.

## RESULTS

### Specificity of the V-ATPase Antibodies

Each of the V-ATPase subunit antibodies used in this study, except the novel anti-subunit A antibody, has been characterized previously [29, 47, 50, 51]. The specificity of these antibodies in epididymis samples was further confirmed by Western blotting. As

shown in Figure 1, all antibodies gave one single band at the appropriate molecular weight, showing their purity. A more complete analysis was performed for the novel anti-A antibody by repeating the Western blot after preincubation of the antibody with the immunizing peptide. This antibody revealed a single band at the expected molecular weight of 70 kDa on Western blots from epididymis homogenates (Fig. 1, lane A), and no signal was detected after preincubation of the antibody with the A subunit peptide.

### Localization of the A Subunit of the V-ATPase

Immunofluorescence using our affinity-purified anti-subunit A antibody revealed a strong apical staining in the apical pole of narrow cells of the initial segments (Fig. 2A). Double labeling for the A (Fig. 2B) and E2 (Fig. 2C) subunits revealed their colocalization in narrow cells (yellow staining in Fig. 2D). A strong apical staining was observed for subunit A in clear cells of all regions of the epididymis, including the cauda (Fig. 3A), as well as the vas deferens (data not shown). Similarly to narrow cells, clear cells were identified by their coexpression of the E2 subunit (Fig. 3B). A weak cytosolic staining was also detected in these cells, as we have previously reported for other subunits of the V<sub>1</sub> domain of the pump, including subunit E2 [6, 47, 48]. Figure 3C shows a complete colocalization of subunits A and E2 in subapical vesicles and apical microvilli (yellow staining). Immunogold electron microscopy confirmed the localization of subunit A in apical microvilli in addition to its subapical localization (Fig. 3D). Interestingly, this subunit was also detected in intracellular structures of principal cells located in the proximal regions of the epididymis (Fig. 4A). Double labeling for TGN38, a protein located in the *trans*-Golgi network, revealed that subunit A is present in structures that are closely associated with, but are at least partially distinct from, the TGN38-stained *trans*-Golgi (Fig. 4, B and C).

### Localization of the C Subunit of the V-ATPase: Isoforms C1 and C2

Both C1 (Fig. 5, A and A') and C2 (Fig. 5, D and D') were detected in clear cells of the epididymis. Epididymal narrow cells and clear cells from the vas deferens were also stained (data not shown). Strong apical and weaker cytosolic immunofluorescence staining was seen for these two V<sub>1</sub> domain isoforms. However, the cytosolic staining for C1

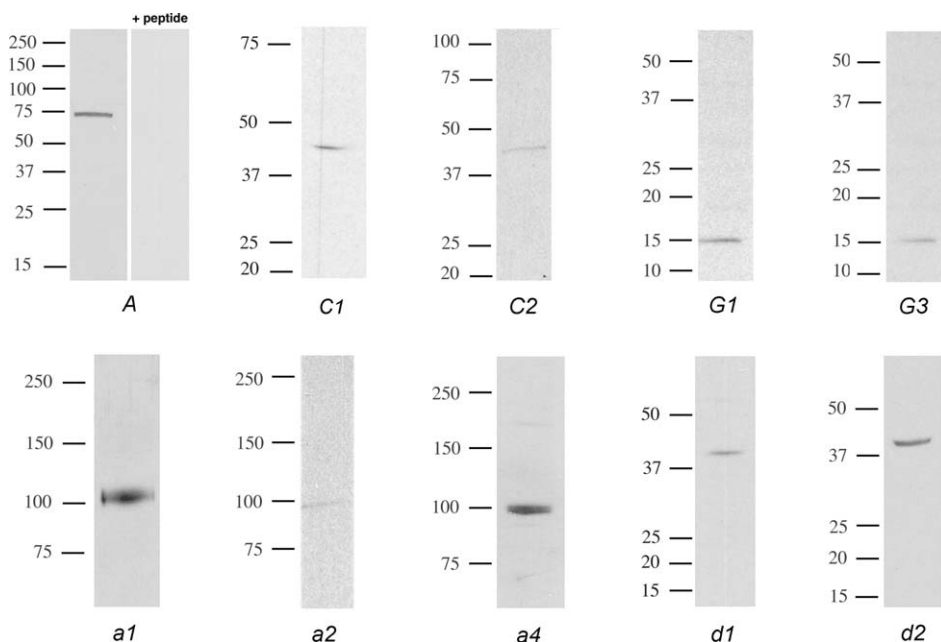
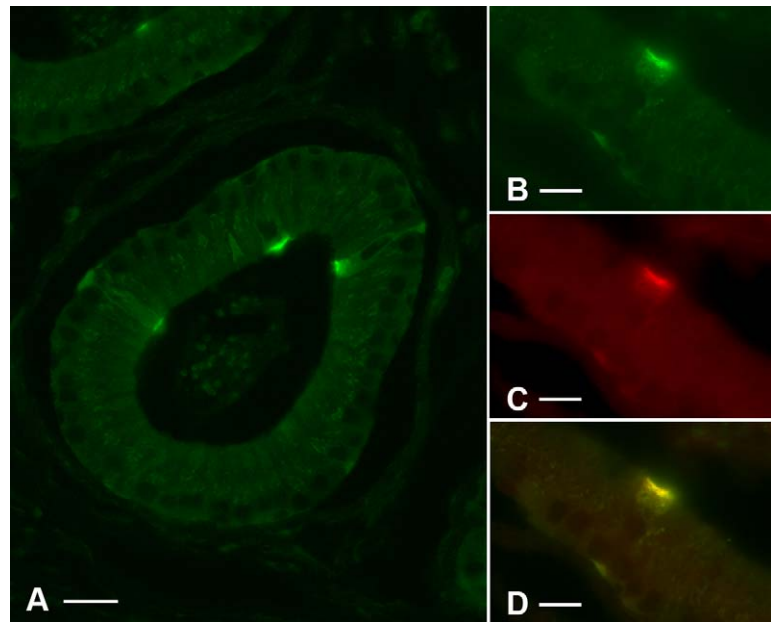


FIG. 1 Detection of V-ATPase subunits by Western blot in total homogenate from rat epididymis. All antibodies used in the present study showed one single band at their appropriate molecular weight (A, 70 kDa; C1 and C2, 42 kDa; G1 and G3, 13 kDa; a1, a2, a4, 116 kDa; d1 and d2, 38 kDa). The signal was completely abolished after preincubation of the anti-subunit A antibody with the immunizing peptide, showing specificity of this novel antibody.

FIG. 2 Localization of the V-ATPase A subunit in narrow cells. A 5- $\mu\text{m}$  section of rat initial segments was stained with antibodies against the A and E2 subunits of the V-ATPase. Subunit A (A; green) is located in the apical pole of a subpopulation of epithelial cells. Double labeling for the A (B; green) and E2 (C; red) subunits showed that these subunits colocalize in the apical pole of narrow cells (C; yellow). Bar = 15  $\mu\text{m}$  (A) and 10  $\mu\text{m}$  (B-D).



seemed stronger compared to that of C2. Double labeling for the E2 subunit (Fig. 5, B, B', E, and E') revealed colocalization of both C isoforms with E2 in subapical vesicles (Fig. 5, C, C', F, and F'; yellow staining). In contrast, C1 and C2 were barely detected in apical microvilli (Fig. 5, C, C', F, and F'; red staining). No significant staining was detected in principal cells.

#### Localization of the G Subunit of the V-ATPase: G1 and G3 Isoforms

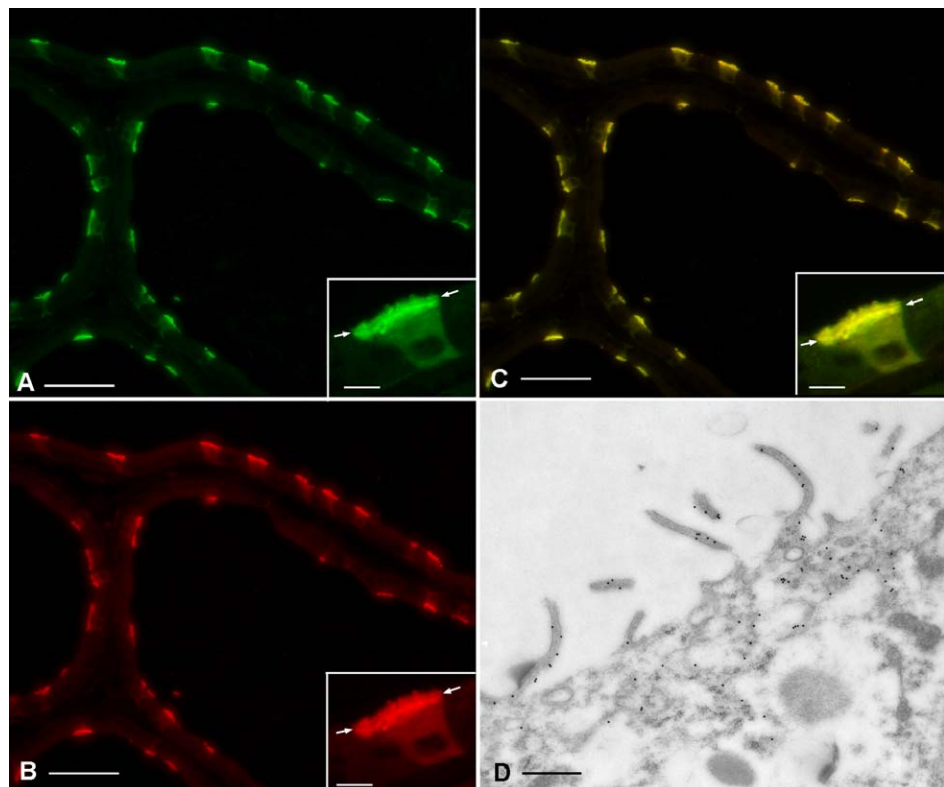
Similarly to the A and C subunits, strong apical and weaker cytosolic staining for both G1 and G3 were detected in narrow cells (data not shown), and clear cells of the epididymis (Fig. 6,

A and B) and vas deferens (data not shown). Double labeling for the E2 subunit (Fig. 6, C and D) showed colocalization of G1 and G3 with E2 in clear cells (Fig. 6, E and F). No significant staining was seen in principal cells. Interestingly, epididymal sperm showed immunoreactivity for the G3 isoform (Fig. 6B) but not for the G1 isoform (Fig. 6A). The localization of the brain-specific G2 isoform was not examined.

#### Localization of the $\alpha$ Subunit of the V-ATPase: $\alpha 1$ , $\alpha 2$ , and $\alpha 4$ Isoforms

Isoforms  $\alpha 1$  and  $\alpha 4$  were detected in the apical pole of narrow cells (data not shown) and in clear cells of the

FIG. 3 Localization of the V-ATPase A subunit in clear cells. A 5- $\mu\text{m}$  rat cauda epididymidis section was stained with antibodies against the A and E2 subunits of the V-ATPase. Subunit A (A; green) is located in the apical pole of clear cells identified by their E2 expression (B; red). The merged image of C shows colocalization of A and E2 in apical microvilli and subapical endosomes (C and inset; yellow staining). A faint staining was also detected in the cytosol of clear cells. No staining was detected in principal cells in this distal portion of the epididymis. The arrows indicate the border between apical microvilli and subapical vesicles. D) Immunogold electron microscope localization of subunit A in a clear cell from the cauda epididymidis. Subunit A is located in apical microvilli as well as in the subapical pole of the cell. Bar = 50  $\mu\text{m}$  (A-C), 5  $\mu\text{m}$  (insets in A-C), and 500 nm (D).



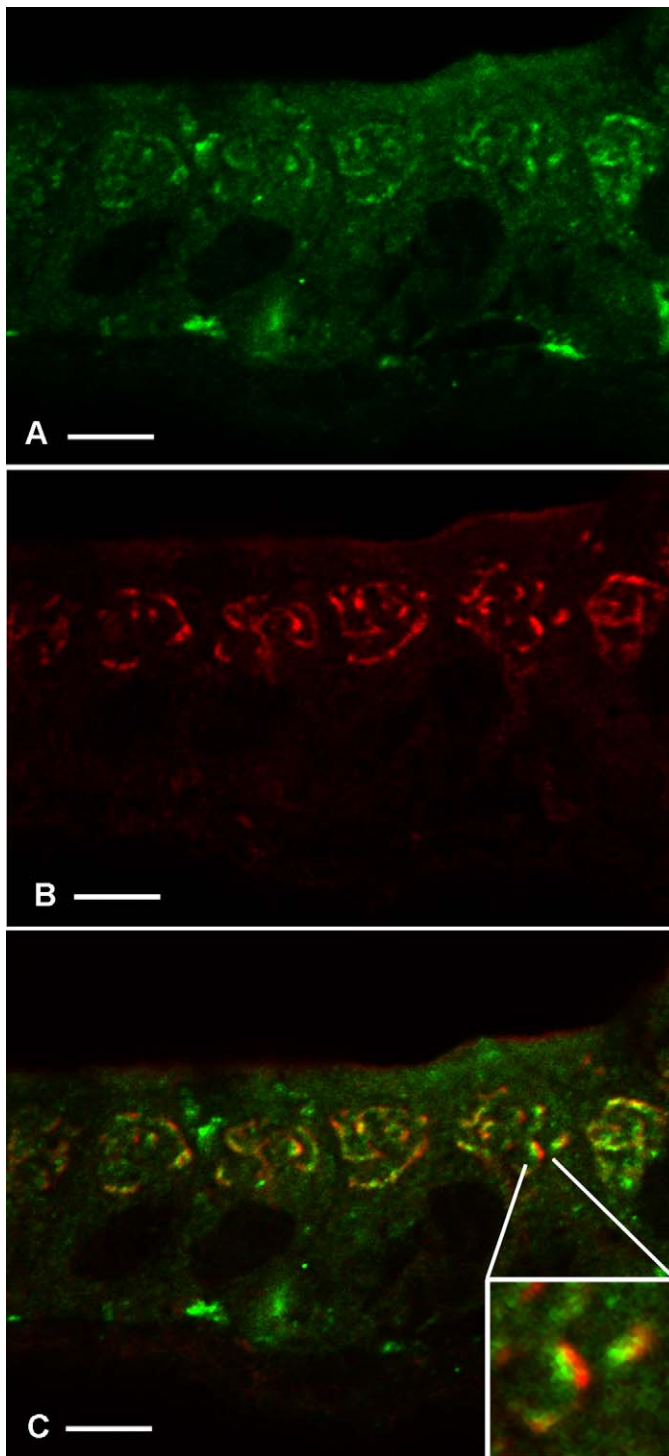


FIG. 4. Localization of the A subunit in principal cells in the proximal epididymis. A 5- $\mu$ m section of rat caput epididymidis stained for subunit A (A; green) and TGN-38 (B; red). Subunit A is located in intracellular structures in principal cells. Double labeling showed that these structures are closely associated but do not completely overlap with the *trans*-Golgi network, labeled with TGN-38 (C). Inset shows that intracellular organelles positive for subunit A (green) run in parallel with TGN-38-positive structures (red). Bar = 5  $\mu$ m.

epididymis (Fig. 7, A and B) and vas deferens (data not shown). Double labeling for the E2 subunit (Fig. 7C) revealed that *a1* colocalized with E2 in subapical vesicles but was absent from the microvilli (arrows in Fig. 7, A, C, and E). Subunit *a4* showed a complete colocalization with E2 in

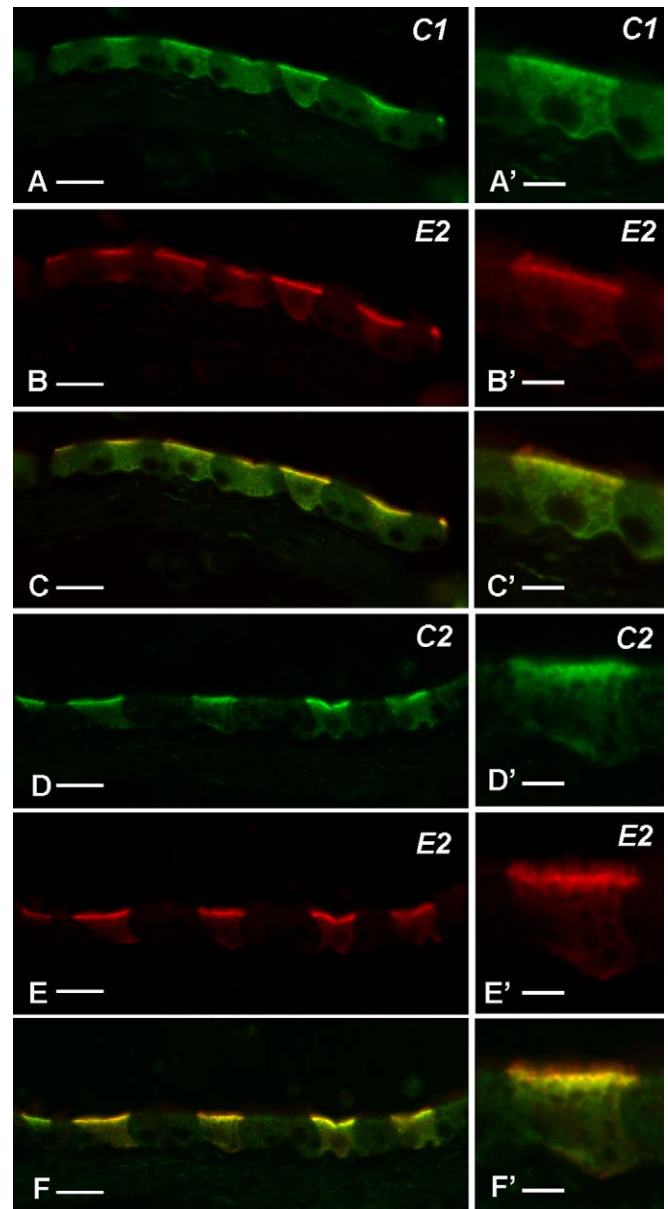


FIG. 5. Localization of the V-ATPase C1 and C2 subunit isoforms. Rat cauda epididymidis was stained with antibodies against subunit isoforms C1 (A and A'; green) and C2 (D and D'; green) and were double-stained for E2 (B, B', E, and E'; red). C and C' and F and F' show merged images for C1 and E2 and for C2 and E2, respectively. Both C1 and C2 are located in clear cells, where they colocalize with E2 in subapical vesicles (yellow staining in C and F). No significant C1 and C2 staining in E2-labeled apical microvilli was detected (red staining in C' and F'). Weaker intracellular staining was also detected in the cytoplasm of clear cells, with a stronger staining for C1 compared to C2. No staining was detected in principal cells. Bar = 15  $\mu$ m (A-F) and 5  $\mu$ m (A'-F').

subapical vesicles and microvilli of clear cells (Fig. 7, B, D, and F). Expression of the osteoclast-specific *a3* isoform was not examined.

The distribution of the *a2* isoform was quite distinct from that of the *a1* and *a4* isoforms. Whereas no significant staining was detected in the apical pole of narrow and clear cells (data not shown), subunit *a2* was detected in intracellular structures of both clear and principal cells, with a weaker staining detected in clear cells. The staining was much stronger in the proximal regions of the epididymis, including caput, corpus,

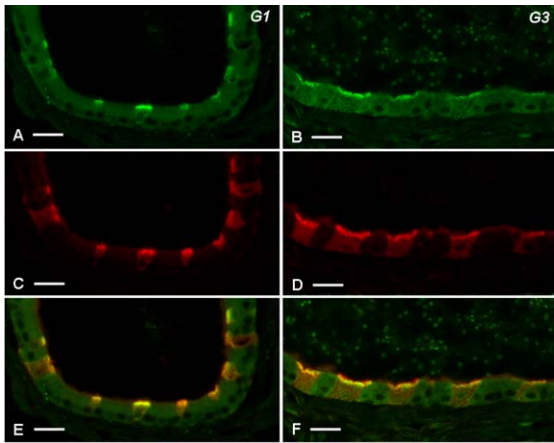


FIG. 6. Localization of the *G1* and *G3* isoforms of the V-ATPase. Rat cauda epididymidis was stained with antibodies against subunit isoforms *G1* (A; green) and *G3* (B; green) and were double-stained for *E2* (C and D; red). Both *G1* and *G3* are located in the apical pole of clear cells. The merged images shown in E and F show colocalization of *G1* (E; yellow-orange staining) and *G3* (F; yellow-orange staining) with *E2* in subapical vesicles, with no apparent colocalization in *E2*-labeled microvilli (red staining in E and F). No staining is seen in principal cells. Epididymal sperm are stained for *G3* but not for *G1*. Bar = 15  $\mu$ m.

and proximal cauda (Fig. 8A), and was not detectable in the distal cauda (data not shown). Similarly to the *A* subunit, double labeling for TGN38 revealed that *a2* is present in structures that are closely (but not exactly) associated with the TGN38-stained *trans*-Golgi network (Fig. 8, B–D).

#### Localization of the *d* Subunit of the V-ATPase: *d1* and *d2* Isoforms

The *d1* isoform was detected in the apical pole of narrow cells (data not shown) and of clear cells in the epididymis (arrows in Fig. 9A) and vas deferens (data not shown), where it colocalizes with the *E2* subunit (arrows in Fig. 9, C and E). The staining for *d1* in clear cells was weaker compared to other subunits and did not allow for the exact localization of this subunit in apical microvilli and/or subapical endosomes. Immunogold electron microscopy will be required to determine

with precision the subcellular localization of this subunit in clear cells. Interestingly, a strong apical *d1* staining was also observed in the apical membrane of principal cells (arrowheads in Fig. 9A). This is the first description of one of the subunits of the V-ATPase being highly expressed in the plasma membrane of principal cells. In contrast, the *d2* isoform was exclusively found in narrow (not shown) and clear cells (arrows in Fig. 9B), identified by their *E2* expression (arrows in Fig. 9, D and F). Whereas *d2* was located in subapical endosomes, it was absent from *E2*-labeled microvilli (middle arrow in Fig. 9F; red staining).

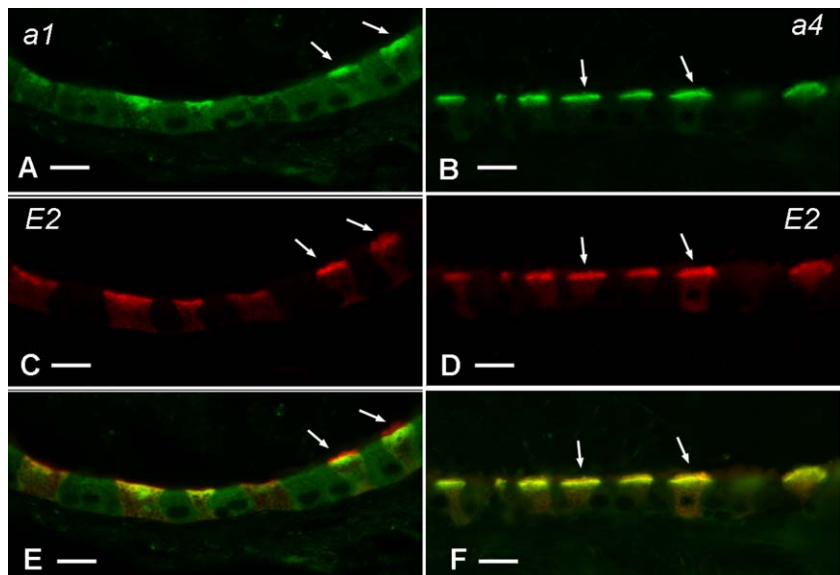
## DISCUSSION

Immunofluorescence was used to examine the expression and the cellular and subcellular localization of five subunits of the V-ATPase and some of their respective isoforms in rat epididymis and vas deferens: *A*, *C1*, *C2*, *G1*, *G3*, *a1*, *a2*, *a4*, *d1*, and *d2*. All five subunits were detected in epithelial cells of these organs but showed specific patterns of expression (Fig. 10).

#### Narrow and Clear Cell Localization

The  $V_1$  sector subunits *A*, *C1*, *C2*, *G1*, and *G3* were all expressed in narrow and clear cells where they were located in their apical pole. These results are in agreement with the previously reported expression of other  $V_1$  subunits, *B1*, *B2*, and *E2*, in these cells [5, 6, 54] and further confirm the high expression of the V-ATPase in acidifying clear cells. Our laboratory has shown that these cells exhibit a significant bafilomycin-dependent proton secretion and are responsible for the majority of proton secretion in the rat vas deferens [5, 6]. Net proton secretion in these cells is regulated via recycling of V-ATPase-containing vesicles between apical microvilli and intracellular vesicles [54–56]. The precise colocalization of subunit *A* with subunit *E2* in apical microvilli and subapical vesicles is consistent with the assembly of these unique subunit isoforms to form the V-ATPase complex [4]. This result indicates that clear cells use the *A* subunit for net luminal proton secretion in the epididymis. Both the ubiquitous isoform *C1* and the more restricted *C2* isoform were expressed in clear cells. Two *C2* isoforms, *C2a* and *C2b*, resulting from alternative mRNA splicing, have been identified [29]. *C2a* was detected in the lung and *C2b* in the kidney. In

FIG. 7. Immunolocalization of the V-ATPase *a1* and *a4* subunit isoforms. Rat cauda epididymidis was stained with antibodies against subunits *a1* (A; green), *a4* (B; green), and *E2* (C and D; red). *a1* and *a4* are located in the apical pole of clear cells but show different patterns of staining. *a1* colocalizes with *E2* in subapical vesicles (E; yellow) but is absent from *E2*-labeled microvilli (E; red; arrows). A bright staining was observed for *a4*, which colocalizes with *E2* in both subapical vesicles (F; yellow) and *E2*-labeled microvilli (F; yellow-orange staining; arrows). Bar = 15  $\mu$ m.



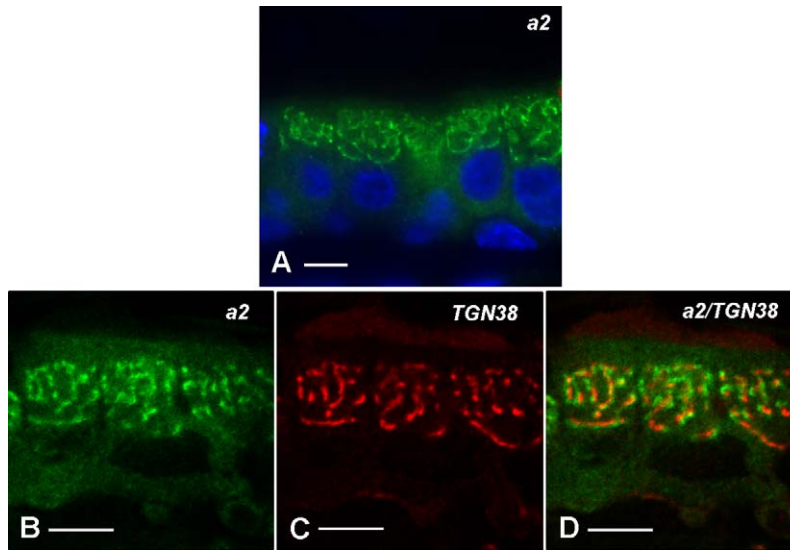


FIG. 8. Intracellular localization of the V-ATPase *a2* subunit isoform in the proximal cauda epididymidis. **A**) Conventional immunofluorescence localization of *a2* (**A**; green) in intracellular structures of principal cells. Nuclei are stained with DAPI (blue). **B**, **C**, and **D**) Confocal microscopy showing a proximal cauda epididymidis section stained for *a2* (**B**; green) and TGN38 (**C**; red). *a2*-labeled intracellular structures are closely associated but are not identical to the TGN38-labeled *trans*-Golgi network (**D**; merged panel; red and green staining). Bar = 5  $\mu$ m.

this study, an antibody that recognizes both *C2a* and *C2b* was used [29]. We postulate that the *C2* isoform that was recognized in epididymal clear cells is *C2b* because of the similarity between clear cells and kidney intercalated cells [57] and because of the common embryological origin of the kidney and epididymis. Similarly, the ubiquitous *G1* subunit isoform as well as the more restricted *G3* isoform were detected in the apical pole of narrow and clear cells. *G3* mRNA has been detected in the kidney [27, 30], and its expression in epididymal clear cells could also be attributed to the fact that kidney and epididymis share the same embryological origin. The presence of *G2* in the epididymis was not investigated here because this subunit has been previously shown to be specific for the brain and absent from the kidney [36]. In addition to their localization in the apical plasma membrane and subapical vesicles, a faint cytosolic staining was also observed for *A*, *C1*, *C2*, *G1*, and *G3*, similarly to the previously reported localization of other

subunits of the  $V_1$  domain, including subunit *E2*, in the soluble fraction of clear cells [6, 47, 48].

Many subunits of the  $V_0$  sector, including *a1*, *a4*, *d1*, and *d2*, were also expressed in narrow and clear cells. *a1* and *a4* were located in their apical pole but showed distinct subcellular distribution. *a4* showed the brightest staining and the closest colocalization with subunit *E2* in subapical vesicles and apical microvilli. Expression of subunit *a4* has also recently been described in the mouse epididymis [28]. Thus *a4* appears to be the predominant isoform in narrow and clear cells. The ubiquitously expressed *a1* isoform was present in subapical vesicles but was absent from apical microvilli. Both *d1* and *d2* were found in the apical pole of narrow and clear cells, where they might participate in endosomal acidification and/or proton secretion. Because of its brighter apical staining in clear cells and its high expression in kidney intercalated cells [27], *d2* appears to be the predominant isoform in proton-secreting narrow and clear cells.

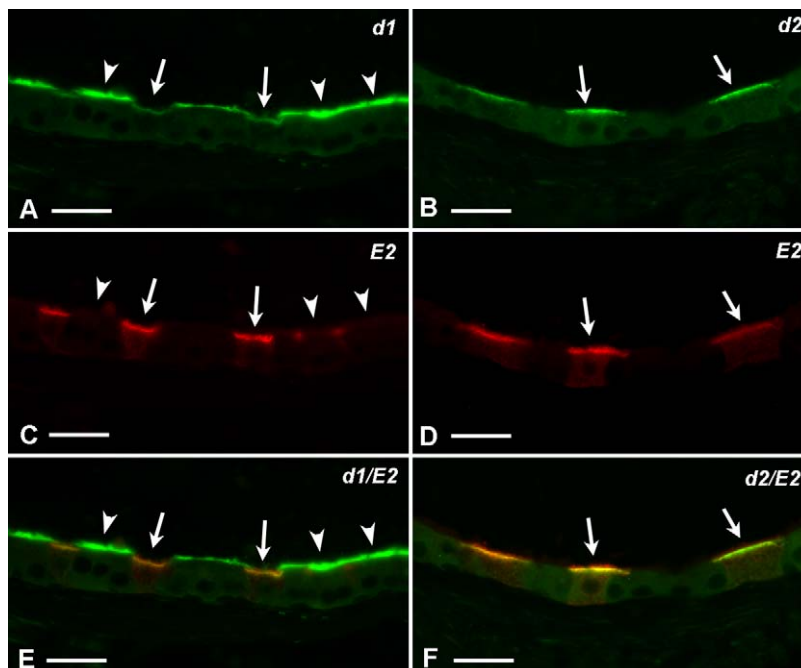
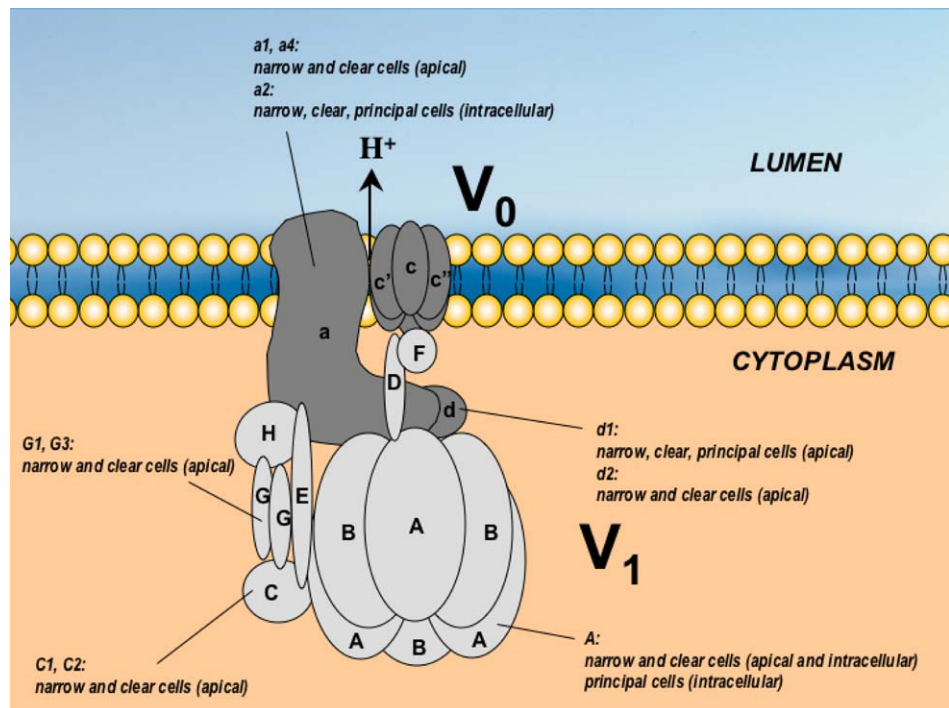


FIG. 9. Localization of the V-ATPase *d1* and *d2* subunit isoforms. Rat cauda epididymidis was stained for *d1* (**A**; green) and *d2* (**B**; green). Double labeling for *E2* was performed (**C** and **D**; red) to identify clear cells. In clear cells (arrows), a strong apical staining for *d2* (**B**) and a weaker apical staining for *d1* (**A**) were detected. The merged picture shown in **E** indicates colocalization of *d1* with *E2* in the subapical pole of clear cells (yellow-orange staining). **F**) Colocalization of subunit *d2* with *E2* in subapical vesicles (yellow staining) but no colocalization in *E2*-labeled microvilli (red staining in cell located in the middle of the panel). In addition, a strong *d1* staining is seen in the apical membrane of principal cells (**A** and **E**; green; arrowheads), whereas principal cells are negative for *d2* (**B** and **F**). Bar = 20  $\mu$ m.

FIG. 10. Diagram illustrating the subunit composition of the V-ATPase and their expression in the epididymis. Subunits that form the membrane-bound  $V_0$  domain are labeled in lowercase letters, and subunits of the cytosolic  $V_1$  domain are labeled in uppercase letters. Based on Kawasaki-Nishi et al. [23].



### Principal Cell Localization

Interestingly, subunit  $A$  was detected in principal cells, where it was localized in intracellular structures closely associated with but not identical to the TGN38-labeled *trans*-Golgi network (TGN). Immunogold electron microscopy will be required to identify precisely these intracellular structures. Clear cells also showed a similar staining pattern for subunit  $A$ , but the staining was much weaker compared to principal cells. In addition, isoform  $a_2$  was detected in similar intracellular structures in principal cells with a weaker staining detected in clear cells. Staining of serial sections with an anti  $\beta$ -COP antibody showed no apparent colocalization of  $a_2$  with  $\beta$ -COP in the Golgi apparatus (data not shown). Localization of  $a_2$  protein in both clear and principal cells correlates with the previously described ubiquitous distribution of  $a_2$  mRNA [28, 42, 58, 59]. These results indicate that subunits  $A$  and  $a_2$  may be involved in the acidification of intracellular organelles in both clear and principal cells. These results are in agreement with the notion that TGN-derived vesicles are acidic and that the V-ATPase plays an active role in this process [2, 4, 60–62]. Vesicle acidification induces the recruitment of coat proteins and small GTPases of the ADP-ribosylation factor (ARF) family [63–65], a process that is important for the appropriate targeting and recycling of various membrane proteins, including GLUT4 and AQP2 [4].

It was particularly surprising to find subunit  $d_1$  in the apical membrane of principal cells. So far, no other V-ATPase subunits have been described in the apical membrane of principal cells, consistent with the absence of bafilomycin-sensitive proton secretion that has been previously reported in these cells [6]. In yeast, subunit  $d$  remains tightly associated with the  $V_0$  domain following dissociation of the  $V_1$  domain [23]. Because this subunit has no predicted transmembrane domain, its presence in the apical membrane of principal cells, where no other subunits of the  $V_0$  domain have been described, is puzzling. Further studies will be required to determine whether subunit  $d_1$  may associate with other integral membrane proteins and may participate in a function other

than the proton transport activity of the V-ATPase. A similar function has been previously suggested for the 56-kDa subunit ( $B_1$ ), which was detected in nonacidifying endosomes isolated from kidney collecting duct principal cells [66]. Alternatively, some unidentified  $V_0$  domain subunit isoforms may be expressed in principal cells and may serve to anchor  $d_1$  in their apical membrane.

### Potential Role of Different Subunit Isoforms of the V-ATPase in Epididymal Epithelial Cells

The present study shows that different isoforms of the same subunit of both the  $V_0$  and the  $V_1$  domains colocalize in the apical pole of narrow and clear cells ( $C_1$  and  $C_2$ ,  $G_1$  and  $G_2$ ,  $a_1$  and  $a_4$ ,  $d_1$  and  $d_2$ ). In yeast and osteoclasts, targeting of the V-ATPase is controlled by the assembly of different  $a$  subunit isoforms into the holoenzyme [25, 43]. The three  $a$  isoforms detected in clear cells may, therefore, be involved in differential targeting of the V-ATPase to specific membrane domains:  $a_2$  in TGN-associated structures,  $a_1$  and  $a_4$  in endosomes, and  $a_4$  in apical microvilli. Previous studies have shown that subunits  $d$ ,  $C$ , and  $G$  participate in the stability of the V-ATPase holoenzyme [4, 23, 67], and these subunits may also play a role in stabilizing the V-ATPase on specific membrane domains in narrow and clear cells. Alternatively, various subunits of the V-ATPase, including subunits  $a$ ,  $d$ ,  $A$ , and  $C$ , have been shown to control the activity of the V-ATPase by modulating the coupling of proton transport to ATP hydrolysis [4, 23–26, 68]. The presence of various isoforms of subunits  $a$ ,  $d$ , and  $C$  in clear cells may, therefore, reflect different levels of V-ATPase activity in the membrane domains and intracellular compartments in which they are expressed.

We have previously shown in rat and mouse epididymis that clear cells express both the  $B_1$  and the  $B_2$  isoform [48]. While  $B_1$  completely colocalized with  $E_2$  in apical microvilli and subapical vesicles,  $B_2$  was located only in  $E_2$ -positive vesicles and was absent from microvilli. Coimmunoprecipitation assays from kidney extracts showed that  $C_1$ ,  $G_1$ , and  $E_2$  interact preferentially with  $B_2$  and that  $C_2b$ ,  $G_3$ , and  $E_2$  interact with



*B1* [29]. Out of the  $V_0$  domain subunits, *d1* interacts with both *B1* and *B2*, whereas *d2* associates with *B1* exclusively. Subunits *a1*, *a2*, and *a4* all bind to *B2*, but only *a4* can associate with *B1*. The localization of *B2*, therefore, correlates with the present localization of isoforms *a1*, *d1*, *C1*, and *G1* in subapical vesicles and their absence in apical microvilli. However, the absence of *a2* from subapical vesicles, where *B2* is located, was not expected. Abundant *a1* and *a4* was detected in these vesicles and might compete away interaction between *B2* and *a2* in this compartment.

Some isoforms could serve as a possible alternative mechanism for the active role played by the predominant one in the V-ATPase holoenzyme. Mutations of some subunits of the V-ATPase, including *B1* and *a4*, are linked to renal distal tubular acidosis and deafness [13, 20]. Our finding that *a4* and *B1* are highly expressed in narrow and clear cells of the epididymis raised the possibility that fertility might be altered in patients harboring these mutations. Long-term clinical follow-up of these young patients will be required to address this question. However, mice lacking the *B1* subunit [69, 70] are not infertile (Karen E. Finberg, personal communication and our observations), indicating that their epididymal luminal acidification, which is necessary for sperm maturation and storage, is not critically impaired. These studies suggest that another *B* isoform, possibly *B2*, can compensate for the lack of *B1* to maintain active proton secretion. Similarly, *a1* might represent a possible backup or alternative mechanism for the active role played by the *a4* isoform in luminal proton secretion in clear cells.

In summary, the expression of various isoforms of the same V-ATPase subunit in narrow and clear cells strongly indicates that these cells are fully equipped for active proton secretion and that they possess potentially important backup mechanisms that may compensate for the lack of one or more V-ATPase subunit isoforms. This underlies the important role that the V-ATPase plays in acidifying the lumen of the epididymis, a process that is important for sperm maturation and storage. The presence of various isoforms of one given subunit in narrow and clear cells may also be important for the regulation of V-ATPase activity in the different subcellular compartments in which it is expressed (e.g., endosomes vs. plasma membrane). In addition, the localization of subunits *a2* and *A* in intracellular organelles of both clear and principal cells indicates their potential role in regulating intracellular traffic in these cells. Finally, expression of the *d1* isoform in the apical membrane of principal cells in the apparent absence of other V-ATPase subunits was an unexpected finding that may indicate other, as yet unidentified role(s) for this isoform.

## REFERENCES

- Brown D, Breton S. Structure, function and cellular distribution of the vacuolar H<sup>+</sup>ATPase (H<sup>+</sup>V-ATPase/proton pump). In: Selding DW, Giebisch G, (eds.), *The Kidney, Physiology and Pathophysiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000:171–191.
- Futai M, Oka T, Sun-Wada G-H, Moriyama Y, Kanazawa H, Wada Y. Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. *J Exp Biol* 2000; 203:107–116.
- Nelson N, Harvey W. Vacuolar and plasma membrane proton-adenotriphosphatases. *Physiol Rev* 1999; 79:361–385.
- Wagner CA, Finberg K, Breton S, Marchansky V, Brown D, Geibel J. Renal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Physiol Rev* 2004; 84:1263–1314.
- Breton S, Hammar K, Smith P, Brown D. Proton secretion in the male reproductive tract: involvement of Cl<sup>-</sup>-independent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport. *Am J Physiol* 1998; 275:C1134–C1142.
- Breton S, Smith P, Lui B, Brown D. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Nat Med* 1996; 2:470–472.
- Breton S, Tyszkowski R, Sabolic I, Brown D. Post-natal development of H<sup>+</sup>ATPase (proton-pump)-rich cells in rat epididymis. *Histochem Cell Biol* 1999; 111:97–105.
- Brown D, Lui B, Gluck S, Sabolic I. A plasma membrane proton ATPase in specialized cells of rat epididymis. *Am J Physiol Cell Physiol* 1992; 263:C913–C916.
- Brown D, Breton S. H<sup>(+)</sup>V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epididymis/vas deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways. *J Exp Biol* 2000; 203:137–145.
- Brown D, Gluck S, Hartwig J. Structure of the novel membrane-coating material in proton secreting epithelial cells and identification as an H<sup>+</sup>ATPase. *J Cell Biol* 1987; 105:1637–1648.
- Brown D, Kumpulainen T, Roth J, Orci L. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase in post-natal and adult rat kidney. *Am J Physiol* 1983; 245:F110–F118.
- Blair H, Teitelbaum S, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989; 245:855–857.
- Karet FE, Finberg K, Nelson R, Nayir A, Mocan H, Sanjad S, Rodriguez-Soriano J, Santos F, Cremers C, Di Pietro A, Hoffbrand B, Winiarski J, et al. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H<sup>+</sup>-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet* 1999; 21:84–90.
- Stankovic K, Brown D, Alpert S, Adams J. Localization of pH regulating proteins H<sup>+</sup>ATPase and Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in the guinea pig inner ear. *Hear Res* 1997; 114:21–34.
- Brown D, Smith P, Breton S. Role of V-ATPase-rich cells in acidification of the male reproductive tract. *J Exp Biol* 1997; 200:257–262.
- Au C, Wong P. Luminal acidification by the perfused rat cauda epididymidis. *J Physiol* 1980; 309:419–427.
- Hinton B, Palladino M. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of luminal fluid microenvironment. *Microsc Res Tech* 1995; 30:67–81.
- Gluck SL, Underhill DM, Iyori M, Holliday LS, Kostrominova TY, Lee BS. Physiology and biochemistry of the kidney vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Annu Rev Physiol* 1996; 58:427–445.
- Lee B, Holliday L, Ojikutu B, Kritis I, Gluck S. Osteoclasts express the B2 isoform of vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase intracellularly and on their plasma membranes. *Am J Physiol* 1996; 1996:C382–C388.
- Stover E, Borthwick K, Bavalia C, Eady N, Fritz D, Rungroj N, Giersch A, Morton C, Axon P, Akil I, Al-Sabban E, Baguley D, et al. Novel ATP6V1B1 and ATP6V0A4 mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. *J Med Genet* 2002; 39:796–803.
- Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:94–103.
- Smith A, Lovering R, Futai M, Takeda J, Brown D, Karet F. Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase subunit genes. *Mol Cell* 2003; 12:801–803.
- Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett* 2003; 545:76–85.
- Curtis K, Francis S, Oluwatoshin Y, Kane P. Mutational analysis of the subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 2002; 277:8979–8988.
- Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M. Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and in vivo dissociation. *J Biol Chem* 2001; 276:17941–17948.
- Shao E, Forgac M. Involvement of the nonhomologous region of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and in vivo dissociation. *J Biol Chem* 2004; 279:48663–48670.
- Smith A, Borthwick KJ, Karet FE. Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 2002; 297:169–177.
- Smith A, Finberg K, Wagner CA, Lifton RP, Devonald MAJ, Su Y, Karet FE. Molecular cloning and characterization of *Atp6n1b* a novel fourth murine vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase a-subunit gene. *J Biol Chem* 2001; 276:42382–42388.
- Sun-Wada G-H, Murata Y, Namba M, Yamamoto A, Wada Y, Futai M. Mouse proton pump ATPase C subunit isoforms (C2-a and C2-b) specifically expressed in kidney and lung. *J Biol Chem* 2003; 278:44843–44851.
- Sun-Wada G-H, Yoshimizu T, Imai-Senga Y, Wada Y, Futai M. Diversity of mouse proton-translocating ATPase: presence of multiple isoforms of the C, d and G subunits. *Gene* 2003; 302:147–153.
- Van Hille B, Richener H, Evans DB, Green JR, Bilbe G. Identification of two subunit A isoforms of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human osteoclastoma. *J Biol Chem* 1993; 268:7075–7080.
- Nelson R, Guo X, Masood K, Brown D, Kalkbrenner M, Gluck S. Selectively amplified expression of an isoform of the vacuolar H<sup>(+)</sup>-

- ATPase 56-kilodalton subunit in renal intercalated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:3541–3545.
33. Puopolo K, Kumamoto C, Adachi I, Magner R, Forgac M. Differential expression of the “B” subunit of the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase in bovine tissues. *J Biol Chem* 1992; 267:3696–3706.
  34. Arata Y, Baleja J, Forgac M. Localization of subunits D, E, and G in the yeast V-ATPase complex using cysteine-mediated cross-linking to subunit B. *Biochemistry* 2002; 41:11301–11307.
  35. Crider B, Andersen P, White A, Zhou Z, Li X, Mattsson J, Lundberg L, Keeling D, Xie X, Stone DK, Peng S-B. Subunit G of the vacuolar proton pump: molecular characterization and functional expression. *J Biol Chem* 1997; 272:10721–10728.
  36. Murata Y, Sun-Wada G, Yoshimizu T, Yamamoto A, Wada Y, Futai M. Differential localization of the vacuolar H<sup>+</sup> pump with G subunit isoforms (G1 and G2) in mouse neurons. *J Biol Chem* 2002; 277:36296–36303.
  37. Imai-Senga Y, Sun-Wada G, Wada Y, Futai M. A human gene, ATP6E1, encoding a testis-specific isoform of H<sup>(+)</sup>-ATPase subunit E. *Gene* 2002; 289:7–12.
  38. Sun-Wada GH, Imai-Senga Y, Yamamoto A, Murata Y, Hirata T, Wada Y, Futai M. A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *J Biol Chem* 2002; 277:18098–18105.
  39. Brody L, Abel K, Castilla L, Couch F, McKinley D, Yin G, Ho P, Merajver S, Chandrasekharappa S, Xu J, Cole J, Struewing J, et al. Construction of a transcription map surrounding the BRCA1 locus of human chromosome 17. *Genomics* 1995; 25:238–247.
  40. Peng S-B, Crider BP, Xie X, Stone DK. Alternative mRNA splicing generates tissue-specific isoforms of 116-kDa polypeptide of vacuolar proton pump. *J Biol Chem* 1994; 269:17262–17266.
  41. Peng S-B, Li X, Crider BP, Zhou Z, Andersen P, Tsai SJ, Xie X-S, Stone DK. Identification and reconstitution of an isoform of the 116-kDa subunit of the vacuolar proton translocating ATPase. *J Biol Chem* 1999; 274:2549–2555.
  42. Toyomura T, Oka T, Yamaguchi C, Wada Y, Futai M. Three subunit a isoforms of mouse vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 2000; 275:8760–8765.
  43. Toyomura T, Murata Y, Yamamoto A, Oka T, Sun-Wada G-H, Wada Y, Futai M. From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2003; 278:22023–22030.
  44. Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, Giliani S, Abinun M, Mattsson JP, Keeling DJ, Andersson AK, Wallbrandt P, Zecca L, Notarangelo LD, Vezzoni P, et al. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet* 2000; 25:343–346.
  45. Smith A, Skaug J, Choate KA, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, Hulston SA, Sanjad SA, Al-Sabban EA, Lifton RP, Sherer SW, Karet FE. Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat Gen* 2000; 26:71–75.
  46. Oka T, Murata Y, Namba M, Yoshimizu T, Toyomura T, Yamamoto A, Sun-Wada G, Hamasaki N, Wada Y, Futai M. a4, a unique kidney-specific isoform of mouse vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit a. *J Biol Chem* 2001; 276:40050–40054.
  47. Herak-Kramberger C, Breton S, Brown D, Kraus O, Sabolic I. Distribution of the vacuolar H<sup>+</sup>ATPase along the rat and human reproductive tract. *Biol Reprod* 2001; 64:1699–1707.
  48. Paunescu T, Da Silva N, Marshansky V, McKee M, Breton S, Brown D. Expression of the 56kDa B2 subunit isoform of the vacuolar H<sup>+</sup>ATPase in proton secreting cells of the kidney and epididymis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:C149–C162.
  49. Herno L, Adamali H, Andonian S. Immunolocalization of CA II and H<sup>+</sup>V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *J Androl* 2000; 21:376–391.
  50. Breton S, Wiederhold T, Marshansky V, Nsumu N, Ramesh V, Brown D. The B1 subunit of the H<sup>+</sup>ATPase is a PDZ domain-binding protein. Colocalization with NHE-RF in renal B-intercalated cells. *J Biol Chem* 2000; 275:18219–18224.
  51. Bagnis C, Marsolais M, Biemesderfer D, Laprade R, Breton S. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange activity and immunolocalization of NHE3 in rat epididymis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F426–F436.
  52. Bagnis C, Marsolais M, Biemesderfer D, Laprade R, Breton S. Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup>-exchange activity and immunolocalization of NHE3 in rat epididymis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F426–F436.
  53. Brown D, Lydon J, McLaughlin M, Stuart-Tilley A, Tyzskowski R, Alpert S. Antigen retrieval in cryostat sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS). *Histochem Cell Biol* 1996; 105:261–267.
  54. Breton S, Nsumu N, Galli T, Sabolic I, Smith P, Brown D. Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin inhibits proton secretion in the male reproductive tract. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278:F717–F725.
  55. Beaulieu V, Da Silva N, Pastor-Soler N, Brown C, Smith P, Brown D, Breton S. Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase recycling. *J Biol Chem* 2005; 280:8452–8463.
  56. Pastor-Soler N, Beaulieu V, Litvin TN, Da Silva N, Chen Y, Brown D, Buck J, Levin LR, Breton S. Bicarbonate regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *J Biol Chem* 2003; 278:49523–49529.
  57. Brown D, Breton S. Mitochondria-rich, proton-secreting epithelial cells. *J Exp Biol* 1996; 199:2345–2358.
  58. Nishi T, Forgac M. Molecular cloning and expression of three isoforms of the 100-kDa a subunit of the mouse vacuolar proton-translocating ATPase. *J Biol Chem* 2000; 275:6824–6830.
  59. Sun-Wada G-H, Wada Y, Futai M. Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase. *Cell Struct Funct* 2003; 28:455–463.
  60. Glickman J, Croen K, Kelly S, Al-Awqati Q. Golgi membranes contain an electrogenic H<sup>+</sup> pump in parallel to a chloride conductance. *J Cell Biol* 1983;1303–1308.
  61. Demaurex N, Furuya W, D’Souza S, Bonifacino J, Grinstein S. Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN): in situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J Biol Chem* 1998; 273:2044–2051.
  62. Machen T, Leigh M, Taylor C, Kimura T, Asano S, Moore H. pH of TGN and recycling endosomes of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-transfected HEK-293 cells: implications for pH regulation in the secretory pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285:C205–C214.
  63. Zeuzem S, Feick P, Zimmermann P, Haase W, Kahn R, Schulz I. Intravesicular acidification correlates with binding of ADP-ribosylation factor to microsomal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:6619–6623.
  64. Clague M, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J. Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem* 1994; 269:21–24.
  65. Maranda B, Brown D, Bourgoin S, Casanova J, Vinay P, Ausiello D, Marshansky V. Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the Arf-nucleotide exchange factor ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *J Biol Chem* 2001; 276:18540–18550.
  66. Sabolic I, Wuarin F, Shi I, Verkman A, Ausiello D, Gluck S, Brown D. Apical endosomes isolated from kidney collecting duct principal cells lack subunits of the proton pumping ATPase. *J Cell Biol* 1992; 119:111–122.
  67. Bauerle C, Ho M, Lindorfer M, Stevens T. The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase membrane sector. *J Biol Chem* 1993; 268:12749–12757.
  68. Nishi T, Kawasaki-Nishi S, Forgac M. Expression and function of the mouse V-ATPase d subunit isoforms. *J Biol Chem* 2003; 278:46396–46402.
  69. Dou H, Finberg K, Cardell EL, Lifton R, Choo D. Mice lacking the B1 subunit of H<sup>+</sup>-ATPase have normal hearing. *Hear Res* 2003; 180:76–84.
  70. Finberg KE, Wagner CA, Bailey MA, Paunescu TG, Breton S, Brown D, Giebisch G, Geibel JP, Lifton RP. The B1-subunit of the H<sup>+</sup>ATPase is required for maximal urinary acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:13616–13621.

# **AQUAPORIN 9 IS A PDZ BINDING PROTEIN THAT INTERACTS WITH NHERF1 AND IS ACTIVATED BY cAMP\***

**Christine Pietrement<sup>1</sup>, Claudia Silberstein<sup>1</sup>, Marianne James<sup>2</sup>, Mireille Marsolais<sup>4</sup>,  
Nicolas Da Silva<sup>1</sup>, Alfred Van Hoek<sup>1,3</sup>, Dennis Brown<sup>1,3</sup>, Raynald Laprade<sup>4</sup>,  
Vijaya Ramesh<sup>2,3</sup>, Sylvie Breton<sup>1,3</sup>.**

From the: <sup>1</sup>Program in Membrane Biology/Division of Nephrology and

<sup>2</sup>Molecular Neurogenetics Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114,

<sup>3</sup>Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA 02215,

<sup>4</sup>Groupe d'Étude des Protéines Membranaires, Université de Montréal, Montréal, Canada.

**Running title: AQP9 interacts with NHERF1**

**Address correspondence to:** Sylvie Breton, Program in Membrane Biology, Simches Research Center, Massachusetts General Hospital, 185 Cambridge Street, Suite 8204, Boston, MA 02114, Tel: 617-726-5785; Fax: 617-643-3182; Email: sbreton@partners.org

**Water and solute transport across the cell plasma membrane is a crucial biological function, which is mediated mainly by aquaporins and aquaglyceroporins. The regulation of these membrane proteins is still incompletely understood. Using the male reproductive system as a model system in which water and glycerol transport are critical for the establishment of fertility, we now report a novel pathway for the regulation of aquaporin 9 (AQP9). AQP9 is the major aquaglyceroporin of the epididymis, liver and peripheral leukocytes, and its c-terminal portion contains a putative PDZ binding motif (SVIM). Here we show that NHERF1 and AQP9 co-localize in the apical membrane of principal cells of the epididymis and the vas deferens. Co-immunoprecipitation and overlay assays revealed that NHERF1 and AQP9 interact with each other and that AQP9 binds to both the PDZ1 and PDZ2 domains of NHERF1, with an apparently higher affinity for PDZ1 vs PDZ2. Pull-down assays revealed that the AQP9 c-terminal SVIM motif is essential for interaction with native NHERF1. Functional assays on isolated tubules perfused in vitro showed a high permeability of the apical membrane to glycerol, which is inhibited by the AQP9 inhibitor, phloretin, and is markedly activated by cAMP. We propose that the interaction between AQP9 and NHERF1 may facilitate the activation of AQP9 by cAMP. AQP9 is present in other cell types involved in the transport of glycerol and water and its potential interaction with PDZ protein(s) may represent a common mechanism by which the functional activity of**

**AQP9 is regulated. In addition, other aquaporins, including AQP4 and AQP2, possess PDZ binding motifs in their c-terminus and may also interact with members of the NHERF family.**

Epithelial cells lining the lumen of the excurrent duct of the male reproductive tract create a luminal environment that is optimal for sperm maturation and storage. The composition of the luminal fluid is progressively modified and is tightly regulated during transit from the testicular seminiferous tubules, into the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens (1-10). Significant water reabsorption leading to a marked increase in sperm concentration and luminal hypertonicity occurs in the epididymis (5,11-13). In addition, glycerol, a metabolic substrate for epididymal sperm, is accumulated in the lumen of the distal epididymis (14). In the more distal regions of the epididymis and in the vas deferens, water secretion driven by CFTR-dependent chloride transport occurs and controls the fluidity of the luminal content (15). Therefore, water and solute transport are important functions of the epithelium of the epididymis, and may represent crucial events in the establishment and maintenance of male fertility.

In a variety of epithelia, water channels (aquaporins) are involved in transepithelial bulk water flow driven by an osmotic gradient. They facilitate sustained and rapid movement of water with low activation energy across an epithelium (reviewed in (16)). In mammals, aquaporins are divided into two subgroups based on their permeability characteristics: the strict

“aquaporins” (AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 and 8) are selective for water and the “aquaglyceroporins” (AQP3, 7, 9, and 10) are permeable to neutral solutes in addition to water. AQP11 and AQP12 have recently been identified and are more distantly related to the other members of the aquaporin family (17). Aquaporins and aquaglyceroporins show a wide range of distribution in organs that are actively involved in water movement (18-22). Interestingly, while some aquaporins are tissue specific, more than one aquaporin can be present in the same tissue and even in the same cell type. Some aquaporins are constitutively expressed, while others are regulated by hormones, pH, phosphorylation, and binding of auxiliary proteins (16). Among these aquaporins, AQP9 has been identified as the major aquaglyceroporin in the excurrent duct of the male reproductive tract, the liver and peripheral leukocytes (23-29). In the male reproductive system, it is constitutively expressed in the apical stereocilia of principal cells along the entire length of the epididymis and vas deferens, as well as in the apical membrane of non-ciliated cells of the efferent ducts (25). This aquaglyceroporin allows passage of a wide range of structurally unrelated solutes, including glycerol, urea, mannitol, and sorbitol, in addition to water when expressed in oocytes (28). Thus, AQP9 provides a potential route for transepithelial fluid and solute transport in the epididymis. The promoter region of AQP9 contains a putative steroid hormone receptor-binding site (28), and sex-linked differences in AQP9 expression were reported in the liver (30). Androgens control AQP9 expression in the adult epididymis (23,26,31), and Aqp9 mRNA increases markedly during the first 4 weeks of post-natal development (24). However, the acute regulation of AQP9 function has not been well characterized. The presence of a putative PDZ (PSD-95, *Drosophila* discs large protein, ZO-1) binding motif, SVIM, in the last four amino acids of the c-terminal tail of AQP9 indicates the potential intervention of PDZ proteins in its regulation. PDZ proteins are scaffolding proteins that facilitate the association of multiprotein complexes, a process that is essential for the phosphorylation of some transporters, channels and receptors (32,33). NHERF1 (Na/H Exchanger Regulatory Factor; SLC9A3R1) is a major apical PDZ protein involved in the cAMP regulation of a variety of

transporters, including Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 3 (NHE3), cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), Na<sup>+</sup>-Pi cotransporter IIa (Npt2 or NaPi Iia) (reviewed in (32-34)), and ROMK (35). In the distal epididymis, cAMP increases AQP9-dependent transepithelial water transport (36). In the present study we investigated, in rat epididymis, the functional contribution of AQP9 to apical glycerol permeability and we examined its regulation by cAMP in the proximal part of the epididymis, the initial segment. Finally, we tested the hypothesis that regulation of AQP9 might occur via interaction with NHERF1.

## Experimental Procedures

**Functional studies on epididymal tubules perfused in vitro** - Epididymal tubules were dissected from the initial segments of the epididymis in a cold preservation solution containing 56 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 140 mM sucrose, as described previously (37). They were then transferred into a perfusion chamber mounted on the stage of an Olympus IMT-2 inverted microscope, and peritubular and luminal perfusions were performed (solutions in Table 1). The basolateral solution composition was based on normal plasma values, and the apical solution was based on previous epididymal micropuncture studies (5). After an initial control period, the apical membrane permeability to glycerol was estimated from the initial rate of increase in cellular volume induced upon isotonic replacement of either 60 or 120 mM raffinose (an impermeant solute in the epididymal tubule) with glycerol. Digital images of perfused tubules were captured at 15s or 30s intervals, as described in the text, using a Nikon Coolpix 995 camera and were analyzed using IPLab software (Scanalytics, Fairfax, VA). For each time point, the height of epithelial cells was measured at 5-6 different locations along the tubule, and the values were averaged. Cell volume was assessed from these values and was expressed as percentage of initial control volume, as we have previously published for kidney proximal tubules (38). Initial rates of cell swelling were determined from four cell volume values measured at 15 s intervals during the first minute of glycerol exposure. The effects of 500mM phloretin, an AQP9 inhibitor, or 1 mM

chlorophenylthio cAMP (cpt-cAMP) on glycerol-induced cell swelling were examined. Statistical analysis was performed using the Student-t test for paired or unpaired experiments, as indicated in the text.

**Antibodies and peptides** - An affinity-purified rabbit polyclonal antibody was raised against a peptide corresponding to the last 15 amino acids (PSENNLEKHELVSIM) of the c-terminal tail of rat AQP9 (28). This antibody has been fully characterized previously (25,26) and was used in this study for immunocytochemistry and for immunoprecipitation (IP) assays. An affinity purified anti-rat AQP9 antibody raised in chicken (Chemicon International; Temecula, CA, USA) was used for western blotting (WB) of material immunoprecipitated using our rabbit anti-AQP9-antibody. An affinity-purified chicken polyclonal antibody was raised against a GST-NHERF1 fusion protein corresponding to amino acids 270-358 (IC270), as published previously for the generation of a polyclonal rabbit antibody (39). A peptide corresponding to the last 15 amino acids of AQP9 was generated in the Massachusetts General Hospital Peptide/Protein Core Facility, and some of the peptide was biotinylated.

**Immunofluorescence microscopy** - Sexually mature male Sprague-Dawley rats were anesthetized with Nembutal (7.5 mg/100 g body weight i.p.; Abbott Laboratories, North Chicago, IL) and perfused via the left ventricle with PBS (0.9% NaCl in 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.4) followed by a fixative containing 4% paraformaldehyde, 10 mM sodium periodate, 10 mM lysine, and 5% sucrose in 0.1 M sodium phosphate buffer (PLP), as described previously (25,26). Epididymis and vas deferens were cryoprotected in 30% sucrose/PBS, mounted for cryosectioning in Tissue-Tek OCT compound 4583 (Sakura Fintek USA, Inc., Torrance, CA), and quick-frozen. Sections were cut at a thickness of 5mm using a Reichert-Jung 2800 Frigocut cryostat (Leica Microsystems, Inc., Bannockburn, IL) and picked up onto Superfrost/Plus microscope slides (Fischer scientific, Pittsburgh, PA). For indirect immunofluorescence microscopy, sections were hydrated for 15 min in PBS and treated for 4 min with SDS (1% in PBS), an antigen retrieval technique that we have previously described (40).

Sections were washed in PBS 3 times 5 min and then blocked in 1% BSA/PBS for 15 min. Anti-AQP9 antibody was applied at a dilution of 1:3200 in a moist chamber for 90 min at room temperature or overnight at 4°C. Sections were washed in high salt PBS (PBS containing 2.7% NaCl) twice for 5 min and once in normal PBS. Goat anti-rabbit IgG coupled to CY3 was then applied for 1 h at room temperature followed by washes as above. Sections were double-stained by subsequent incubation with anti-NHERF1 antibody diluted 1:50 followed by donkey anti-chicken IgG conjugated to FITC.

Slides were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Digital images were acquired using a Nikon Eclipse 800 epifluorescence microscope (Nikon instruments, Inc., Melville, NY) using an Orca 100 CCD camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ), analyzed using IPLab scientific image processing software (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA) and imported into Adobe Photoshop image editing software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

**Apical membrane preparation** - Epithelial cell apical membranes were isolated using the brush border membrane (BBM) Mg<sup>2+</sup> precipitation technique, as previously described (25,26). We have shown previously that AQP9 is significantly enriched in epididymal BBM (25). Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) using albumin as standard.

**Immunoprecipitation (IP) and co-IP assays** - Anti-AQP9 rabbit antibody was conjugated to magnetic beads (Dynabeads Protein A, DYNAL Biotech ASA, Oslo, Norway) according to the manufacturer's protocol. The epididymal BBM preparation (250 µg) was pre-cleared by two consecutive 30-min incubations with non-conjugated magnetic beads. Immunoprecipitation assays were performed using 100 µl of AQP9 IgG-magnetic beads in 1 ml IP buffer (1% Triton X-100, 150mM NaCl, 10mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM Na-orthovanadate, 0.5mM IGEPAL CA-630, 10% glycerol, 1% BSA, complete protease inhibitors) for 2 hours at 4°C. After three washes in 1 ml IP buffer, beads were resuspended in 50 ml Laemmli reducing sample buffer, and incubated at room temperature for 45

min. Beads were separated from the supernatant using a magnetic tube holder (DynaL Magnetic Particle Concentrator, Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway). 25 ml of supernatant were subjected to electrophoresis as described below. For some experiments, the anti-AQP9 antibody was pre-incubated with the non-biotinylated AQP9 peptide prior to immobilization on the beads.

**Immunoblotting (SDS-PAGE and Western blotting)** - BBM samples or IP supernatants were diluted in Laemmli sample buffer, and loaded onto Tris-glycine polyacrylamide 4-20% gradient gels (PAGEr Duramide Precast Gels, 4-20% Tris-glycine Gels, Cambex, Rockland, ME, USA). After SDS-PAGE separation, proteins were transferred onto an Immun-Blot polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Membranes were blocked in Tris-Buffer saline (TBS) containing 5% non fat dry milk and then incubated overnight at 4°C with the primary antibody (either AQP9 or NHERF1) diluted in TBS containing 2.5% milk. After three washes in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST), and a 15 min block in 5% milk/TBS, membranes were incubated with secondary antibodies (either goat anti-rabbit IgG or goat anti-chicken IgG) conjugated to horseradish peroxidase for 1 hour at room temperature. After five further washes, antibody binding was detected with the Western Lightning Chemiluminescence reagent (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) and Kodak X-Omat blue XB-1 films.

**Deglycosylation** - After IP with AQP9 antibody, 10ml of the immunoprecipitated material was incubated in the presence of either N-GlycosidaseF (5U, PNGaseF *Chryseobacterium* (Flavobacterium) meningosepticum, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) or a mixture containing both neuraminidase (1 mU) and O-Glycosidase (0.5 mU; Roche, Indianapolis, IN), in a final volume of 21 ml. Endoglycosidase digestions were performed at 37°C overnight, and then terminated by addition of denaturing buffer. Western blot analysis was performed using the anti-AQP9 chicken antibody.

**Phosphatase assay** - 330 mg (50 µl) of epididymis total homogenate was incubated with 100ml Tris 1 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5 for 10 min at 30°C.

30U (30 µl) calf intestine alkaline phosphatase (Calbiochem, Darmstadt, Germany) was then added (water was added in the control sample) and the solution was incubated for 15 min at 30°C. Dephosphorylation was terminated by the addition of 180 µl of Laemmli sample buffer (2X). 30 µl of each sample (containing 27 µg of protein) were then subjected to electrophoresis and western blot, as described above.

**Preparation of recombinant NHERF1** - Human full-length NHERF1 (amino acids (aa) 1-358) and NHERF1 truncated fusion proteins containing PDZ1 (aa 11-97), PDZ2 (aa 149-236), PDZ1 and PDZ2 (aa 11-236), PDZ2 and the C-terminal portion (aa 149-358), and NHERF1 lacking both PDZ domains (aa 270-358) were amplified by PCR, subcloned into the *Bam*HI-*Not*I sites of pGEX4T (Amersham Pharmacia Biotechnology), and expressed in *Escherichia coli*, as described previously (41). After a first step of purification using glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences), GST-fusion proteins were loaded onto Tris-glycine polyacrylamide 4-20% gradient gels (PAGEr Duramide Precast Gels, 4-20% Tris-glycine Gels, Cambex, Rockland, ME, USA). After SDS-PAGE separation, GST-proteins were transferred onto an Immun-Blot polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). After staining with Ponceau stain (Ponceau S Stain, Boston Bioproducts, Ashland, MA) bands of interest were eluted from PVDF membrane in Triton/SDS elution buffer 50 mM TrisCl, pH 9, 2% (w/v), 1% (v/v) Triton X-100, 0.2 ml/cm<sup>2</sup> of membrane). These pure protein preparations were then stored at -20°C until use.

**Overlay assays** - Purified NHERF1 GST fusion proteins were submitted to electrophoresis and transferred onto an Immun-Blot polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, as described above. Membranes were blocked in 10% non-fat dry milk in TBST, followed by two sequential 1 hour incubations, the first with avidin (Avidin from egg white, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) at 0.2 mg/ml and the second with biotin (D-Biotin, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) at 0.1 mg/ml to block avidin and biotin sites. Membranes were incubated with biotinylated C-terminus AQP9 peptide at a concentration of 25 mg/ml overnight at 4°C, followed by washes. Membranes were then

incubated with avidin conjugated to horseradish peroxidase (HRP) at a dilution of 1:2000 (ExtrAvidin Peroxydase conjugate, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Probe binding was detected using enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) and Kodak X-Omat blue XB-1 films. TTBS was used for all washes and incubations. After development, the membrane was washed in TBS. The membrane was then stained with Coomassie blue to confirm the purity of the constructs.

**Preparation of AQP9 C-terminal constructs** - A cDNA fragment (base pairs 1055-1163) of the rat AQP9 cDNA (Gen Bank accession number AF016406, provided by Dr. Matthias Hediger), corresponding to the cytosolic c-terminal portion (aa MKAEPSENNLEKHELVSIM) of rat AQP9 (Tsukaguchi et al, 1998) was amplified by PCR. The fragment was then digested and inserted into Pst1 and Spe1 sites of pET41a expression vector (Novagen). AQP9-c-ter was GST epitope tagged at the NH<sub>2</sub> terminus. In some constructs, the SVIM motif of the GST-AQP9-c-ter was mutated to GGGG and to SAKH. The sequence, SAKH, corresponds to the last four amino acids of the B2 subunit of the V-ATPase, which has been shown not to interact with NHERF1 (42), and was therefore designed as a negative control. SVIM was also deleted (GST-AQP9-truncated) to obtain a truncated protein. Mutations were performed by using a QuikChange Site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). For protein expression, BL21(DE3) pLysS competent cells were transformed with the different constructs. Fidelity of the constructs was confirmed by sequence analysis.

Small-scale overnight bacteria cultures were started from glycerol stocks and were grown in LB broth at 37°C. Two ml of the overnight culture was added to 200 ml LB broth (1:100 dilution) containing 30 µg/ml kanamycin. When cultures reached an OD<sub>600</sub> of 0.4-0.6, they were induced with 0.4 mM IPTG for 4 h at 37°C. The bacteria were washed and resuspended in 25 ml of cold PBS containing 2.5 mM EDTA. Lysis was performed using a French press, at 1000 lb/in<sup>2</sup>. The lysates were then centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4°C. Supernatants were aliquoted and stored at -80°C.

**Pull down assays** - GST-AQP9 fusion proteins were immobilized onto glutathione sepharose beads (Amersham Biosciences). For pull-down of NHERF1, 150 µg of rat epididymis brush border membranes were resuspended in a Tris buffer (20 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% triton X-100, 1% IGEPAL, pH 7.40) and incubated with the immobilized GST-proteins in a rotator for 2 h at 4°C. Beads were recovered by centrifugation, washed extensively and resuspended in Laemmli buffer. Samples were heated for 5 min and then subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis for NHERF1, using the affinity-purified chicken anti-NHERF1 antibody IC270. Pull-down assays were also performed using kidney lysate as a source of abundant NHERF1 that does not contain endogenous AQP9.

## RESULTS

### *AQP9-dependent apical membrane glycerol permeability*

Isolated epididymal tubules were perfused with a control solution containing 120 mM raffinose, a solute to which epididymis epithelial cells are impermeant. The epithelial cell layer could be visualized and distinguished from the surrounding connective tissue and muscle cells (Fig 1A). After a 5 min control period, raffinose was replaced by 120mM glycerol for 5 min (Fig. 1B), followed by a post-control period. Glycerol permeability was estimated from the increase in cell volume induced by isotonic replacement of raffinose by glycerol. Cell volume was estimated from the height of epithelial cells measured at 5 different locations along the tubule (Figs. 1 C-D). Significant cell swelling was observed upon glycerol addition indicating high permeability of the epididymal apical membrane to this neutral solute (Fig 2A - top trace). On average, the initial rate of cell swelling was  $50.6 \pm 10$  %/min (n=8). Addition of the AQP9 inhibitor phloretin (500 mM) into the luminal fluid significantly reduced the initial rate of cell swelling to  $7.5 \pm 3.7$  %/min (Fig 2A- bottom trace and Fig. 2B, n=10). These results indicate significant AQP9-dependent apical membrane permeability to glycerol.

### ***Effect of cAMP on AQP9-dependent glycerol permeability***

To test for the effect of cAMP on AQP9-dependent glycerol permeation, lower glycerol concentrations of 60 mM were used in order to facilitate the detection of any variations in the initial rate of cell volume changes, by slowing down the overall speed of the process. First, we showed that two consecutive pulses of glycerol, separated by a wash out period of 10 min, induced identical cell swelling (Fig. 3). The same protocol was then applied but 5 min prior to performing the second glycerol pulse, a permeant analogue of cAMP (8-(4-chlorophenylthio)-cAMP; 100  $\mu$ M) was added into the luminal perfusate. The initial rate of cell swelling was markedly increased by cAMP ( $83.3 \pm 25.8$  %/min), compared to control ( $17.8 \pm 5.3$  %/min;  $p < 0.02$ ,  $n = 5$ ) (Fig. 3). Importantly, phloretin completely inhibited the cAMP-activated, glycerol-induced cell swelling ( $1.53 \pm 1.5$  vs  $30.65 \pm 4.33$  %/min,  $p < 0.0005$ ,  $n = 6$ ) (Fig. 3).

### ***Co-localization of AQP9 with NHERF1 in the apical membrane of principal cells***

Double-immunofluorescence labeling revealed abundant expression of the PDZ protein NHERF1 in the apical membrane of principal cells of all regions of the epididymis and vas deferens, where it co-localized with AQP9 (Fig. 4). In the distal epididymis (cauda) clear cells were negative for AQP9 as we have previously shown (25), but they showed significant apical membrane and weak intracellular NHERF1 staining (Figs. 4 G-I).

### ***Co-immunoprecipitation of NHERF1 with AQP9***

As shown in Fig. 5A, NHERF1 was abundant in the epididymis brush-border membrane (BBM) and a significant amount of NHERF1 was co-immunoprecipitated from rat epididymal BBM using our anti-AQP9 antibody (IP AQP9) but not with protein A-conjugated beads (IP Control). Interestingly, two bands at around 50 kDa were detected by the antibody. Incubation of total epididymis homogenates with intestine alkaline phosphatase reduced the intensity of the upper band in the doublet and increased the lower band intensity (Fig. 5B). These results indicate that the upper band represents phosphorylated NHERF1 and that the phosphorylated form of NHERF1 is predominant

in the epididymis preparation under our experimental conditions. Thus, the two bands detected in the AQP9 co-immunoprecipitated material shown in Fig. 5A represent the phosphorylated and non-phosphorylated forms of NHERF1.

### ***The C-terminal tail of AQP9 interacts with NHERF1***

To determine the contribution of the AQP9 C-terminus to the interaction with NHERF1, co-immunoprecipitation assays were repeated after pre-incubation of the AQP9 antibody-conjugated beads with an AQP9 peptide containing the SVIM motif. Western blot for NHERF1 was first performed using the affinity-purified chicken antibody (Fig. 6; top panel) and the same membrane was subsequently blotted for AQP9 (Fig. 6; bottom panel). A progressive displacement of AQP9 was observed when the AQP9 antibody was pre-incubated with increasing concentrations of the AQP9 peptide (bottom panel: compare lane 2 (no peptide) with lanes 3 and 4). In lane 4, a complete displacement of AQP9 by the peptide was achieved. As shown in the top panel, the amount of NHERF1 in the AQP9-IP material was directly proportional to the level of displacement of AQP9 by the AQP9 peptide, indicating that the AQP9 peptide containing the SVIM motif is more efficient in immunoprecipitating NHERF1 than the holo-AQP9 protein. This might be due to a better accessibility of the SVIM motif located on the peptide for interaction with NHERF1, versus the holo-AQP9 protein when bound to the antibody. No AQP9 or NHERF1 were detected in the control lane using protein A beads alone (Fig. 6, lane 1). This result supports our hypothesis that the last amino acids of AQP9, which contains the "SVIM" motif facilitate the interaction of AQP9 with NHERF1.

Incubation of the immunoprecipitated material, with N-glycosidase or a solution containing neuraminidase and O-glycosidase, indicated that AQP9 is N-glycosylated but not O-glycosylated in the epididymis (data not shown). Multiple bands were still detected after N-deglycosylation indicating the presence of AQP9 multimers in this preparation.



### ***Direct interaction between the C-terminus tail of AQP9 and NHERF1 PDZ domains***

Overlay assays using purified NHERF1 GST fusion proteins subjected to electrophoresis and transferred onto PVDF membrane revealed a specific and direct interaction between the AQP9 peptide and both PDZ domains of NHERF1 (Fig. 7). While no AQP9 binding was detected in the control lane containing GST alone, or with the NHERF1 construct lacking both PDZ domains (GST-IC270), significant amounts of AQP9 were detected in lanes containing PDZ1 domain (GST-PDZ1), both PDZ domains together (GST-PDZ1-PDZ2), and the entire length of NHERF1 (GST-NHERF1). A lower amount of AQP9 was detected in the lane containing PDZ2 domain (GST-PDZ2) indicating lower affinity of AQP9 for PDZ2 compared to PDZ1. No binding was detected with the GST-IC149 fusion protein, indicating negative cooperativity between PDZ2 domain and the remaining c-terminus portion of NHERF1. The higher affinity of AQP9 for PDZ1 compared to PDZ2 was confirmed by using sequential dilutions of the NHERF1 PDZ1 and PDZ2 constructs (data not shown).

### ***The SVIM motif of AQP9 is essential for the AQP9-NHERF1 interaction***

Pull-down assays were performed from epididymal BBM (Fig. 8: left panel) or kidney cortex lysate (Fig. 8: right panel) using GST-AQP9 fusion proteins corresponding to either the last 20 amino acids of the c-terminus tail of AQP9 (GST-AQP9-c-term) or a truncated c-terminus tail in which the SVIM motif has been deleted (GST-AQP9-truncated). Kidney lysate was used as a source of abundant NHERF1 that does not contain endogenous AQP9, which might have competed away the interaction of NHERF1 with immobilized AQP9 fusion protein in the epididymis BBM preparation. NHERF1 was pulled-down from both epididymis and kidney preparations using the full-length AQP9 c-terminus fusion protein preparations. In contrast, no NHERF1 was detected in the sample pulled-down using AQP9 constructs in which the SVIM motif had been completely deleted (Fig. 8) or had been replaced by either GGGG or the non-related motif SAKH (data not shown). This result demonstrates that the SVIM motif is essential for

the interaction between the C-terminus tail of AQP9 and native NHERF1.

## **DISCUSSION**

We and others have shown that AQP9 is a major apical aquaporin in the excurrent duct of the male reproductive system (23-27). AQP9 is highly expressed in the apical membrane of principal cells of the epididymis (25). Throughout the epididymis, significant water reabsorption occurs, leading to a significant increase in spermatozoa concentration (5,12,43-46). In the distal regions, water secretion driven by CFTR-dependent chloride transport was also proposed to occur in order to regulate the final fluidity of the luminal environment in which sperm mature and are stored (15). A previous study showed AQP9-dependent transepithelial water transport in the distal epididymis perfused in vivo (36). Interestingly, AQP9 is not only permeant to water, but it also allows permeation of neutral solutes including glycerol (28). Glycerol is accumulated in the lumen of the epididymis (14), and may serve as a metabolic substrate for epididymal sperm. Thus, both the neutral solute permeability and water permeability of AQP9 might represent important functions of this aquaporin for the preservation and storage of sperm in the lumen of the epididymis. The present study was aimed at characterizing the functional contribution of AQP9 to apical glycerol permeability and at determining whether NHERF1, a major epithelial cell apical PDZ protein, interact with AQP9 and, thus, be poised to participate in its regulation.

NHERF1 is a major PDZ-containing adapter protein that facilitates multiprotein complex formation, an essential step for the phosphorylation and regulation of a growing number of transporters, channels and receptors (32-35,41,47). NHERF1 contains three protein interaction domains: PDZ domain 1 (PDZ-1), PDZ domain 2 (PDZ-2), and a sequence located in the C-terminus that binds to the family of Merlin/Ezrin/Radixin/Moesin (MERM) proteins (39,41,48). The PDZ domains associate with proteins that have distinct PDZ-binding cassettes, and the MERM binding domain allows interaction with actin and other MERM-interacting proteins including protein kinases. Thus, NHERF1 facilitates the scaffolding of transport proteins and

their regulatory binding partners, and helps in anchoring membrane proteins to the apical plasma membrane via its interaction with the actin cytoskeleton. In the present study, we show that NHERF1 co-localizes with AQP9 in the apical membrane of principal cells of the epididymis and the vas deferens. Co-immunoprecipitation assays revealed that AQP9 and NHERF1 interact with each other in native tissue. In vitro assays showed that the c-terminus tail of AQP9 binds directly to both PDZ domains of NHERF1 and pull-down assays showed that the last four amino acids of the c-terminus of AQP9 (SVIM) are essential for the interaction between AQP9 and native NHERF1. In addition, functional studies on tubules perfused in vitro showed a significant AQP9-dependent apical permeability to glycerol, which was markedly activated by the cAMP permeant analogue, cpt-cAMP.

We have previously shown that, in contrast to some other apical aquaporins, AQP9 does not recycle between the plasma membrane and intracellular vesicles (25). In the kidney, for example, AQP2 is accumulated in the apical membrane by modulation of vesicle trafficking after cAMP stimulation (49), and in the airway epithelium cAMP induces the internalization of AQP5 (50). Thus, the regulation of AQP9 by cAMP that we show here in the proximal epididymis, and that others have described in the distal epididymis (36) seems to occur without the intervention of recycling mechanisms. The direct interaction between AQP9 and NHERF1 that we revealed in the present study strongly indicates that NHERF1 might serve to anchor and stabilize AQP9 in the plasma membrane, as was shown for other resident membrane proteins (32-34). In addition, we propose that NHERF1 may participate in the cAMP activation of AQP9 in the epididymis. NHERF1 was first identified as an essential cofactor for the cAMP regulation of NHE3 in the kidney (51). NHERF1 participates in the formation of a complex that contains NHE3 and the PKA-anchoring protein, ezrin, which facilitates PKA phosphorylation of NHE3 (52). AQP9 contains several putative serine and tyrosine phosphorylation sites in its cytoplasmic C- and N-terminal tails, and phosphorylation events mediated by PKA, PKG or PKC might be responsible for the regulation of AQP9 permeability. Dissection of the phosphorylation

sites on AQP9 and their physiological role will require further studies.

In OK cells, whereas phosphorylation of NHE3 by cAMP requires NHERF1, it does not involve the phosphorylation of NHERF1 (53). In contrast, in intact kidney slices PKA induces significant phosphorylation of NHERF1 (47), a process that regulates the interaction between NHERF1 and other transporters, such as NaPiIII. In the present study, we showed that a significant portion of NHERF1 is phosphorylated under basal conditions in the epididymis, and that both the phosphorylated and non-phosphorylated forms of NHERF1 are co-immunoprecipitated with AQP9. Interestingly, phosphorylation of NHERF1 was shown to be a key factor in the regulation of CFTR, which binds to both PDZ domains of NHERF1 (54,55). The formation of a complex that contains two CFTR molecules for one NHERF1 increases the open probability of CFTR. Phosphorylation of the PDZ2 domain of NHERF1 by PKC disrupts its interaction with CFTR, keeping the interaction between CFTR and PDZ1 intact, but preventing the stimulatory effect of NHERF1 (56). It was proposed that prevention of the bivalent coupling of CFTR following phosphorylation of NHERF1 would switch CFTR from being an open chloride channel to a regulatory protein (35). A similar mechanism was thought to regulate the functional coupling between CFTR and ROMK, via another member of the NHERF family, NHERF2 (35).

Interestingly, Cheung et al showed that CFTR conferred cAMP-dependent activation of AQP9 in xenopus oocytes and that inhibition of CFTR by lonidamine reversed the cAMP-activation of AQP9 in the intact epididymis (36). In the present study, we showed that, similarly to CFTR, AQP9 binds to both PDZ domains of NHERF1. CFTR is also expressed in the apical membrane of epididymal principal cells (57). In the distal portion of the epididymis, water secretion, driven by CFTR-dependent chloride secretion is an important step that helps control the final fluidity of the luminal content. Therefore, the coordinated regulation of AQP9 and CFTR would facilitate the fine regulation of water and salt transport in this tissue. Future studies will be required to determine whether or not interaction between CFTR and AQP9, via NHERF1, might play a role in the regulation of AQP9. It will be

particularly interesting to determine whether the regulated phosphorylation of NHERF1 by either PKA and/or PKC may play a role in the regulation of AQP9, either via interaction with NHERF1 alone or with the participation of CFTR in the epididymis. In this respect, it is interesting to note that out of all organs affected by cystic fibrosis, the epididymis and vas deferens are among the most seriously affected (15,58). Thus, elucidating the mechanisms by which CFTR regulates AQP9-dependent water and solute transepithelial transport in the male excurrent might prove extremely beneficial for a better understanding of male infertility related to cystic fibrosis.

In conclusion, the present study shows specific interaction between the AQP9 c-terminal SVIM motif and both PDZ domains of NHERF1. This interaction may play a key role in the cAMP-dependent activation of AQP9. As AQP9 is present in a variety of cell types involved in water and neutral solute transport, and as other members of the aquaporin family including AQP2 and AQP4 also contain putative PDZ binding motifs, we propose that interaction between AQPs and PDZ proteins may represent a widespread mechanism by which water and neutral solute transport is regulated.

## REFERENCES

1. Clulow, J., Jones, R. C., Hansen, L. A., and Man, S. Y. (1998) *J Reprod Fertil Suppl* **53**, 1-14
2. Crabo, B. (1965) *Acta Vet Scand* **22**, SUPPL 5:1-94
3. Hansen, L. A., Clulow, J., and Jones, R. C. (1999) *Exp Physiol* **84**(3), 521-527
4. Hinton, B. T., and Palladino, M. A. (1995) *Microsc Res Tech* **30**(1), 67-81
5. Levine, N., and Marsh, D. J. (1971) *J Physiol* **213**(3), 557-570
6. Robaire, B., and Hermo, L. (1988) Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In: Neil, E. K. a. J. D. (ed). *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York
7. Robaire, B., and Viger, R. S. (1995) *Biol Reprod* **52**(2), 226-236
8. Yeung, C. H., Cooper, T. G., Oberpenning, F., Schulze, H., and Nieschlag, E. (1993) *Biol Reprod* **49**(2), 274-280
9. Jones, R. C., and Murdoch, R. N. (1996) *Reprod Fertil Dev* **8**(4), 553-568
10. Turner, T. T. (1995) *J Androl* **16**(4), 292-298
11. Clulow, J., Jones, R. C., and Hansen, L. A. (1994) *Exp Physiol* **79**(6), 915-928
12. Turner, T. T., and Cesarini, D. M. (1983) *J Androl* **4**(3), 197-202
13. Johnson, A. L., and Howards, S. S. (1977) *Science* **195**(4277), 492-493
14. Cooper, T. G., and Brooks, D. E. (1981) *J Reprod Fertil* **61**(1), 163-169
15. Wong, P. Y. (1998) *Mol Hum Reprod* **4**(2), 107-110
16. King, L. S., Kozono, D., and Agre, P. (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(9), 687-698
17. Zardoya, R. (2005) *Biol Cell* **97**(6), 397-414
18. Brown, D., Katsura, T., Kawashima, M., Verkman, A. S., and Sabolic, I. (1995) *Histochem Cell Biol* **104**(1), 1-9
19. Hamann, S., Zeuthen, T., La Cour, M., Nagelhus, E. A., Ottersen, O. P., Agre, P., and Nielsen, S. (1998) *Am J Physiol* **274**(5 Pt 1), C1332-1345
20. Kreda, S. M., Gynn, M. C., Fenstermacher, D. A., Boucher, R. C., and Gabriel, S. E. (2001) *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**(3), 224-234
21. Nielsen, S., Frokiaer, J., Marples, D., Kwon, T. H., Agre, P., and Knepper, M. A. (2002) *Physiol Rev* **82**(1), 205-244
22. Nielsen, S., King, L. S., Christensen, B. M., and Agre, P. (1997) *Am J Physiol* **273**(5 Pt 1), C1549-1561
23. Badran, H. H., and Hermo, L. S. (2002) *J Androl* **23**(3), 358-373
24. Da Silva, N., Silberstein, C., Beaulieu, V., Pietrement, C., Van Hoek, A. N., Brown, D., and Breton, S. (2006) *Biol Reprod* **74**, 427-438

25. Pastor-Soler, N., Bagnis, C., Sabolic, I., Tyszkowski, R., McKee, M., Van Hoek, A., Breton, S., and Brown, D. (2001) *Biol Reprod* **65**(2), 384-393
26. Pastor-Soler, N., Isnard-Bagnis, C., Herak-Kramberger, C., Sabolic, I., Van Hoek, A., Brown, D., and Breton, S. (2002) *Biol Reprod* **66**(6), 1716-1722
27. Elkjaer, M., Vajda, Z., Nejsum, L. N., Kwon, T., Jensen, U. B., Amiry-Moghaddam, M., Frokiaer, J., and Nielsen, S. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **276**(3), 1118-1128
28. Tsukaguchi, H., Shayakul, C., Berger, U. V., Mackenzie, B., Devidas, S., Guggino, W. B., van Hoek, A. N., and Hediger, M. A. (1998) *J Biol Chem* **273**(38), 24737-24743
29. Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C. C., and Hediger, M. A. (1999) *Am J Physiol* **277**(5 Pt 2), F685-696
30. Nicchia, G. P., Frigeri, A., Nico, B., Ribatti, D., and Svelto, M. (2001) *J Histochem Cytochem* **49**(12), 1547-1556
31. Oliveira, C. A., Carnes, K., Franca, L. R., Hermo, L., and Hess, R. A. (2005) *Biol Cell* **97**(6), 385-395
32. Brone, B., and Eggermont, J. (2005) *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(1), C20-29
33. Shenolikar, S., Voltz, J. W., Cunningham, R., and Weinman, E. J. (2004) *Physiology (Bethesda)* **19**, 362-369
34. Weinman, E. J., Cunningham, R., Wade, J. B., and Shenolikar, S. (2005) *J Physiol* **567**(Pt 1), 27-32
35. Yoo, D., Flagg, T. P., Olsen, O., Raghuram, V., Foskett, J. K., and Welling, P. A. (2004) *J Biol Chem* **279**(8), 6863-6873
36. Cheung, K. H., Leung, C. T., Leung, G. P., and Wong, P. Y. (2003) *Biol Reprod* **68**(5), 1505-1510
37. Bagnis, C., Marsolais, M., Biemesderfer, D., Laprade, R., and Breton, S. (2001) *Am J Physiol Renal Physiol* **280**(3), F426-436
38. Breton, S., Beck, J. S., Cardinal, J., Giebisch, G., and Laprade, R. (1992) *Am J Physiol* **263**(4 Pt 2), F656-664
39. Gonzalez-Agosti, C., Wiederhold, T., Herndon, M. E., Gusella, J., and Ramesh, V. (1999) *J Biol Chem* **274**(48), 34438-34442
40. Brown, D., Lydon, J., McLaughlin, M., Stuart-Tilley, A., Tyszkowski, R., and Alper, S. (1996) *Histochem Cell Biol* **105**(4), 261-267
41. James, M. F., Beauchamp, R. L., Manchanda, N., Kazlauskas, A., and Ramesh, V. (2004) *J Cell Sci* **117**(Pt 14), 2951-2961
42. Breton, S., Wiederhold, T., Marshansky, V., Nsumu, N. N., Ramesh, V., and Brown, D. (2000) *J Biol Chem* **275**(24), 18219-18224
43. Turner, T. T. (1984) *J Reprod Fertil* **72**(2), 509-514
44. Wong, P. Y., and Yeung, C. H. (1978) *J Physiol* **275**, 13-26
45. Hohlbrugger, G., and Pfaller, K. (1983) *Arch Androl* **11**(3), 265-270
46. Wong, Y. C., Wong, P. Y., and Yeung, C. H. (1978) *Experientia* **34**(4), 485-487
47. Deliot, N., Hernando, N., Horst-Liu, Z., Gisler, S. M., Capuano, P., Wagner, C. A., Bacic, D., O'Brien, S., Biber, J., and Murer, H. (2005) *Am J Physiol Cell Physiol* **289**(1), C159-167
48. Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R., and Reczek, D. (2000) *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 113-143
49. Brown, D. (2003) *Am J Physiol Renal Physiol* **284**(5), F893-901
50. Sidhaye, V., Hoffert, J. D., and King, L. S. (2005) *J Biol Chem* **280**(5), 3590-3596
51. Weinman, E. J., Steplock, D., Wang, Y., and Shenolikar, S. (1995) *J Clin Invest* **95**(5), 2143-2149
52. Weinman, E. J., Steplock, D., Donowitz, M., and Shenolikar, S. (2000) *Biochemistry* **39**(20), 6123-6129
53. Lamprecht, G., Weinman, E. J., and Yun, C. H. (1998) *J Biol Chem* **273**(45), 29972-29978

54. Moyer, B. D., Denton, J., Karlson, K. H., Reynolds, D., Wang, S., Mickle, J. E., Milewski, M., Cutting, G. R., Guggino, W. B., Li, M., and Stanton, B. A. (1999) *J Clin Invest* **104**(10), 1353-1361
55. Short, D. B., Trotter, K. W., Reczek, D., Kreda, S. M., Bretscher, A., Boucher, R. C., Stutts, M. J., and Milgram, S. L. (1998) *J Biol Chem* **273**(31), 19797-19801
56. Raghuram, V., Hormuth, H., and Foskett, J. K. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16), 9620-9625
57. Ruz, R., Andonian, S., and Hermo, L. (2004) *J Androl* **25**(2), 265-273
58. Blau, H., Freud, E., Mussaffi, H., Werner, M., Konen, O., and Rathaus, V. (2002) *Arch Dis Child* **87**(2), 135-138

### FOOTNOTES

\* This study was supported by 1) National Institutes of Health Grant DK38452 (to D.B. and S.B.); 2) Cystic Fibrosis Foundation grant BRETON05P0 (to S.B.); and 3) grants from the Committee of American Memorial Hospital of Reims, France, the Conseil Régional de Champagne-Ardenne, France, and the Ministère des Affaires Etrangères (Concours Lavoisier), France (to C.P.). The work performed in the Microscopy Core Facility of the Massachusetts General Hospital Program in Membrane Biology was supported by Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease Grant DK43351 and Boston Area Diabetes and Endocrinology Research Center Award DK57521.

**TABLE 1: COMPOSITION OF LUMINAL AND BASOLATERAL SOLUTIONS**

	Control Luminal Solution (mM)	Glycerol Solution (mM)	Basolateral solution
NaCl	55	55	100
KCl	5	5	5
MgSO <sub>4</sub>	-	-	1.2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1	1
Glucamine Cl	-	-	10
Raffinose	120	0 (or 60)	-
CaCl <sub>2</sub>	1.8	1.8	1.8
MgCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	1.2	1.2	-
Na acetate	4	4	4
Na <sub>3</sub> Citrate	1	1	1
Glucose	5.5	5.5	5.5
Alanine	6	6	6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	3	3
NaHCO <sub>3</sub>	5	5	25
Glycerol	-	120 (or 60)	-
Na Cyclamate	25	25	-
Osmolarity (mOsm/kg H <sub>2</sub> O)	331	334	297
pH	6.85	6.83	7.41

## FIGURE LEGENDS

**Fig 1: Epididymal tubules perfused in vitro and exposed to different luminal solutes.** Epithelial cells can be distinguished from the connective tissue and muscle cells surrounding the tubule. Replacement of raffinose (A), an impermeant solute, by glycerol (B) induced an increase in epithelial cell height. C-D: Higher magnification pictures in the presence of luminal raffinose (C) or glycerol (D). Cell volume was determined from the height of epithelial cells (black lines), and was expressed relative to the initial control value.

**Fig 2A: Cell swelling induced by luminal isotonic addition of glycerol – Inhibition by phloretin.** A) Top trace: Averaged increase in cell volume upon luminal addition of 120 mM glycerol (n=8). Cell returns to control value upon removal of glycerol. Bottom trace: Phloretin (500 mM) significantly reduced the glycerol-induced cell swelling (n=10). B) Initial rates of cell swelling induced by glycerol under control conditions (Glycerol) or in the presence of phloretin (Glycerol + Phloretin). \* =  $p < 0.005$ , Student t-test for unpaired experiments.

**Fig 3: Effect of cAMP on glycerol-induced cell swelling.** Left bars: Control tubules subjected to two consecutive pulses of 60 mM glycerol (GLY60). Identical initial rates of cell swelling were detected. Middle bars: Tubules were subjected to a first glycerol pulse (GLY60) followed by addition of cpt-cAMP for 5 min and a second pulse of glycerol still in the presence of cpt-cAMP (GLY60 cAMP). cAMP induced a significant increase in the initial rate of cell swelling. Right bars: Tubules were subjected to a first glycerol pulse (GLY60) followed by addition of cpt-cAMP for 5 min and a second pulse of glycerol in the presence of cpt-cAMP and phloretin (GLY60 cAMP phloretin). Phloretin inhibited cAMP-activated glycerol-induced cell swelling.

\*  $p < 0.02$ , \*\*  $p < 0.0005$ , Student t-test for paired experiments.

**Fig 4: Cryosections of rat epididymis and vas deferens double-stained for AQP9 and NHERF1.** AQP9 (red) and NHERF1 (green) are located in the apical membrane of principal cells from the initial segments (A-C), caput (D-F), cauda (G-I) regions of the epididymis, and in the vas deferens (J-L). Merge panels (C, F, I, L) show co-localization of AQP9 with NHERF1 (yellow). In the cauda epididymidis, clear cells, negative for AQP9 also express abundant NHERF1 in their apical membrane (green staining in I). Bars = 50  $\mu\text{m}$

**Fig 5: A) Co-immunoprecipitation of NHERF1 with AQP9.** NHERF1 was co-immunoprecipitated with AQP9 (IP AQP9) from epididymal BBM. No signal was detected using Protein A-conjugated beads alone (IP Control). Two bands were detected using the NHERF1 antibody indicating the presence of phosphorylated and non-phosphorylated NHERF1 in the co-immunoprecipitated sample (IP AQP9). A similar doublet was also detected in the total BBM protein extract (BBM) that was used for the IP. B) Presence of phosphorylated and non-phosphorylated NHERF1 in the epididymis. BBM were incubated overnight in the absence (-) and presence (+) of intestine alkaline phosphatase. Top panel: 40 mg of epididymis total homogenate were loaded onto each lane. In the treated sample, the lower molecular weight NHERF1 band is predominant, compared to the non-treated sample, where the higher phosphorylated band is more abundant. Lower panel: the same membrane was re-incubated with anti-actin antibody as a loading control.

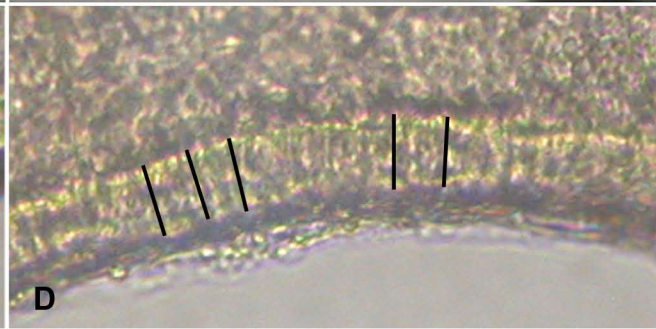
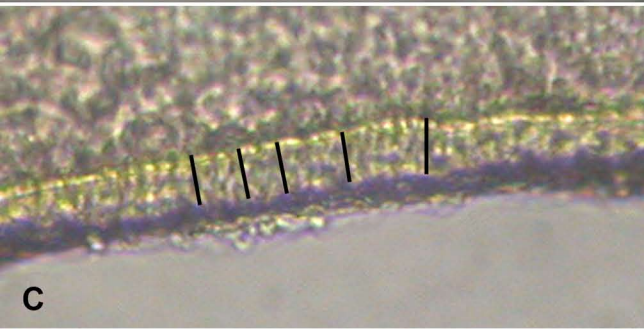
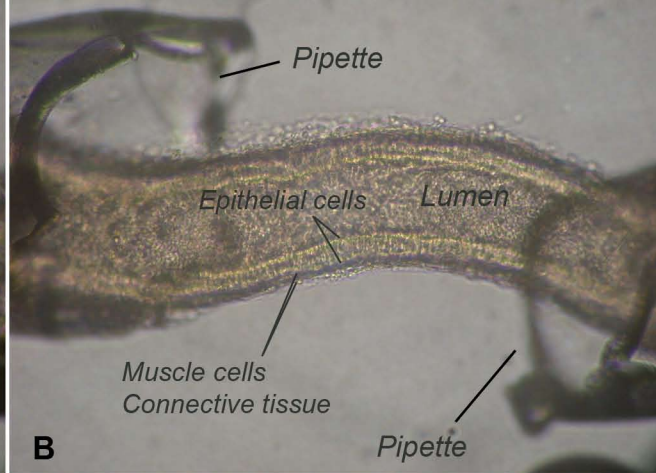
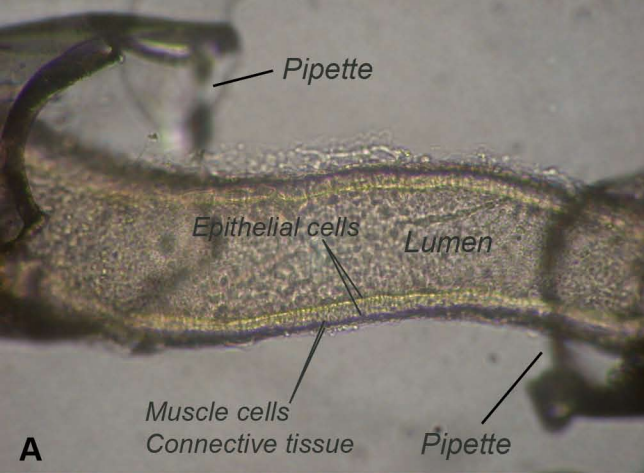
**Fig 6: The c-terminus of AQP9 facilitates co-immunoprecipitation of NHERF1.** The anti-AQP9 antibody was pre-incubated with the AQP9 peptide containing the SVIM motif prior to co-immunoprecipitation using epididymal BBM. Top panel: Immunoblot for NHERF1. Bottom panel: The same membrane was re-stained for AQP9. A progressive displacement of AQP9 was observed when the anti-AQP9 antibody was pre-incubated with increasing concentrations of the AQP9 peptide (compare lane 2 (no peptide) with lanes 3 and 4). In lane 4, a complete replacement of AQP9 by the peptide was

achieved. The amount of co-immunoprecipitated NHERF1 is directly proportional to the level of displacement of AQP9 by the AQP9 peptide.

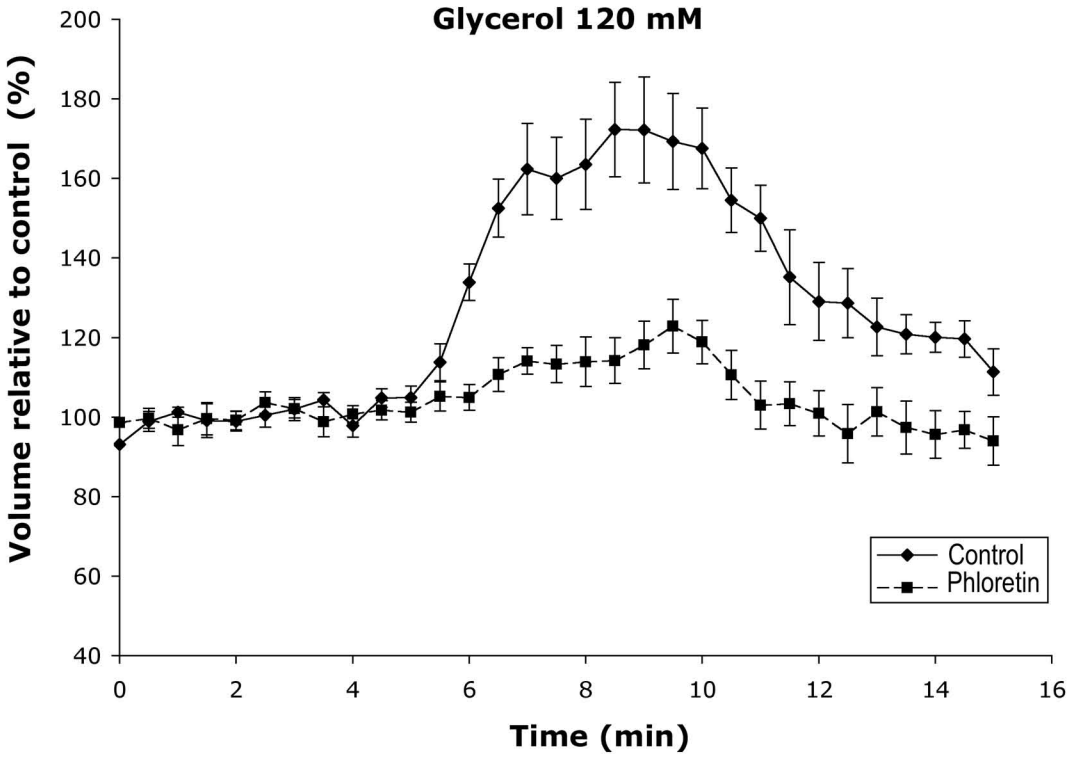
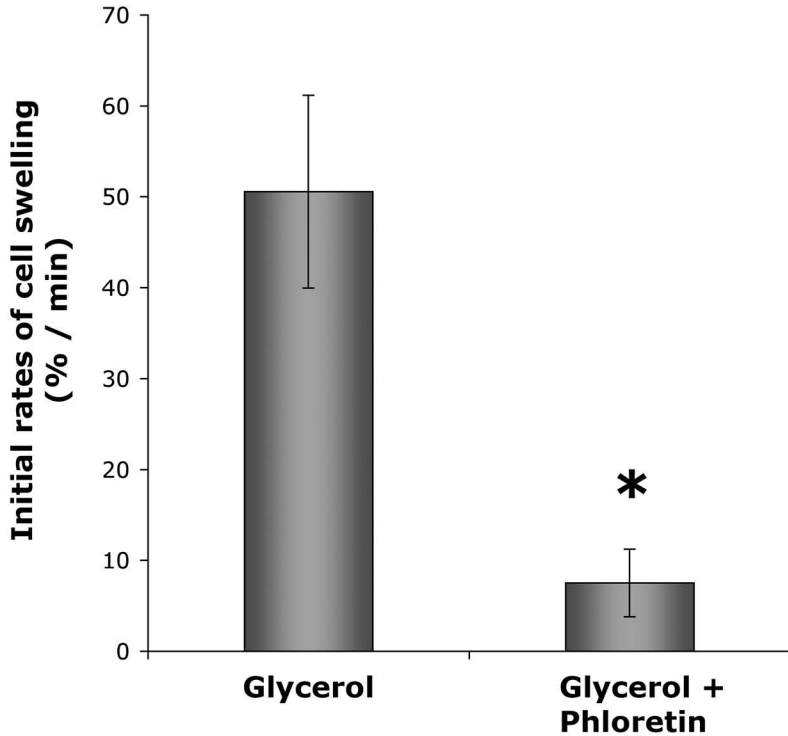
IP Control (Protein A-beads alone), IP AQP9 IgG (No peptide), IP AQP9 + peptide (IP after pre-incubation with the AQP9 peptide), BBM (protein extract from epididymal brush border membranes; lane 6), lane 5: no sample.

**Fig 7: Direct interaction between the C-terminus of AQP9 and NHERF1. Top panel)** Overlay of biotinylated peptide containing the last c-terminal 15 amino acids of AQP9 (30 mg/ml) onto membranes containing various constructs of GST-NHERF1. Binding of AQP9 peptide was detected in lanes containing PDZ1 (GST-PDZ1) or PDZ2 (GST-PDZ2) domains of NHERF1, a NHERF1 construct containing both PDZ domains (GST-PDZ1-PDZ2), and the full length of NHERF1 (GST-NHERF1). No binding was detected in the control lane containing GST alone (GST), or lanes containing a NHERF1 construct lacking both PDZ domains (GST-IC270) or lacking PDZ1 domain (GST-149). A higher amount of AQP9 was detected in the lane containing PDZ1 compared to PDZ2, indicating higher affinity for PDZ1. **Bottom panel)** The same membrane was stained with Coomassie Blue to illustrate the relative quantity and size of the immobilized NHERF1 fusion proteins.

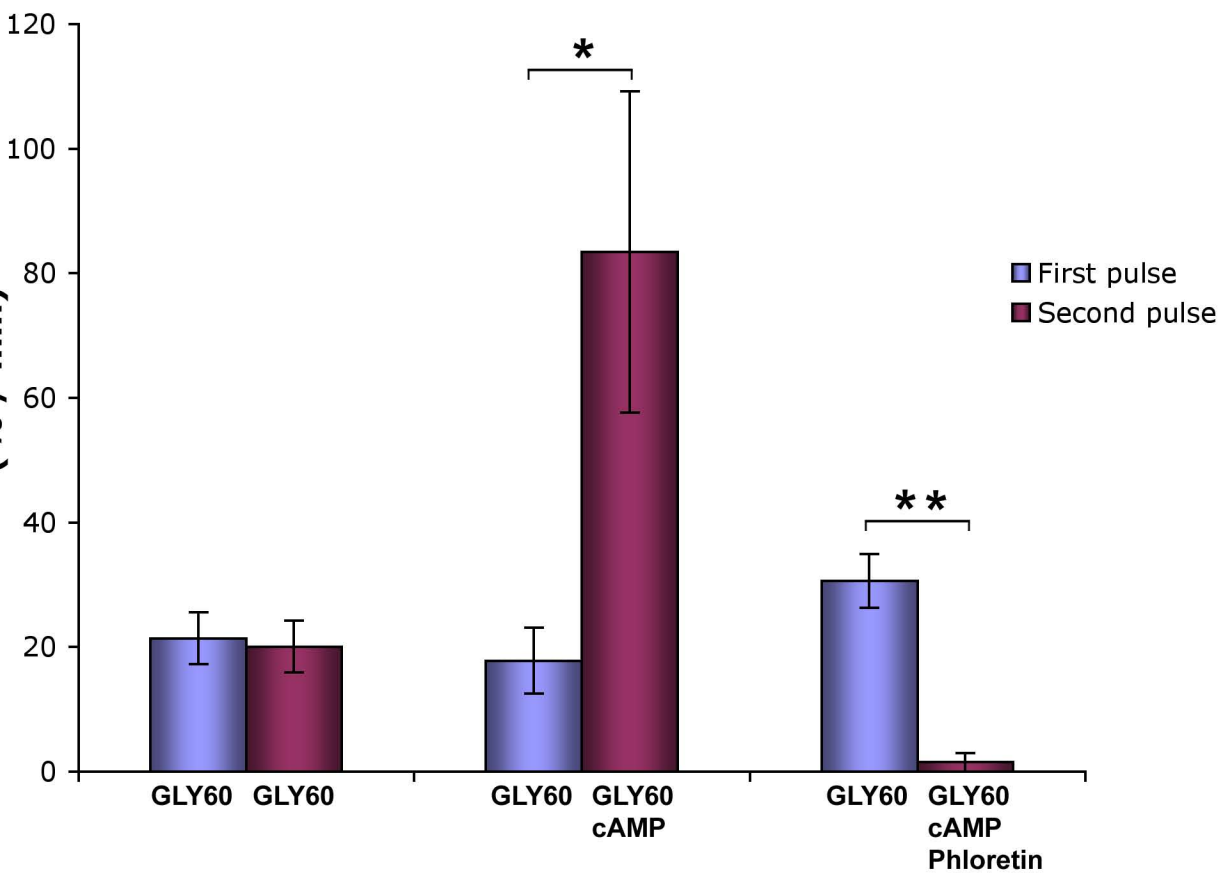
**Fig. 8) Pull-down of NHERF1 with GST-AQP9 constructs:** Epididymal BBM (left panel) or kidney lysate (right panel) were incubated with sepharose beads conjugated with GST-AQP9 fusion proteins. NHERF1 was pulled down from both preparations using the AQP9 construct corresponding to the last 20 amino acids of the c-terminal tail of AQP9 (GST-AQP9-c-term). In contrast, no NHERF1 was detected in the samples incubated with the GST-AQP9 c-terminus construct lacking the SVIM motif (GST-AQP9-truncated). A lower molecular band, corresponding to GST-AQP9 is also detected with the anti-NHERF1 antibody, which was raised using a GST-NHERF1 construct, and therefore detects GST, in addition to NHERF1. This band provides visualization of the amount of GST-AQP9 that was used for the pull-down assay, and serves as a loading control. Abundant NHERF1 is detected in total kidney lysate.



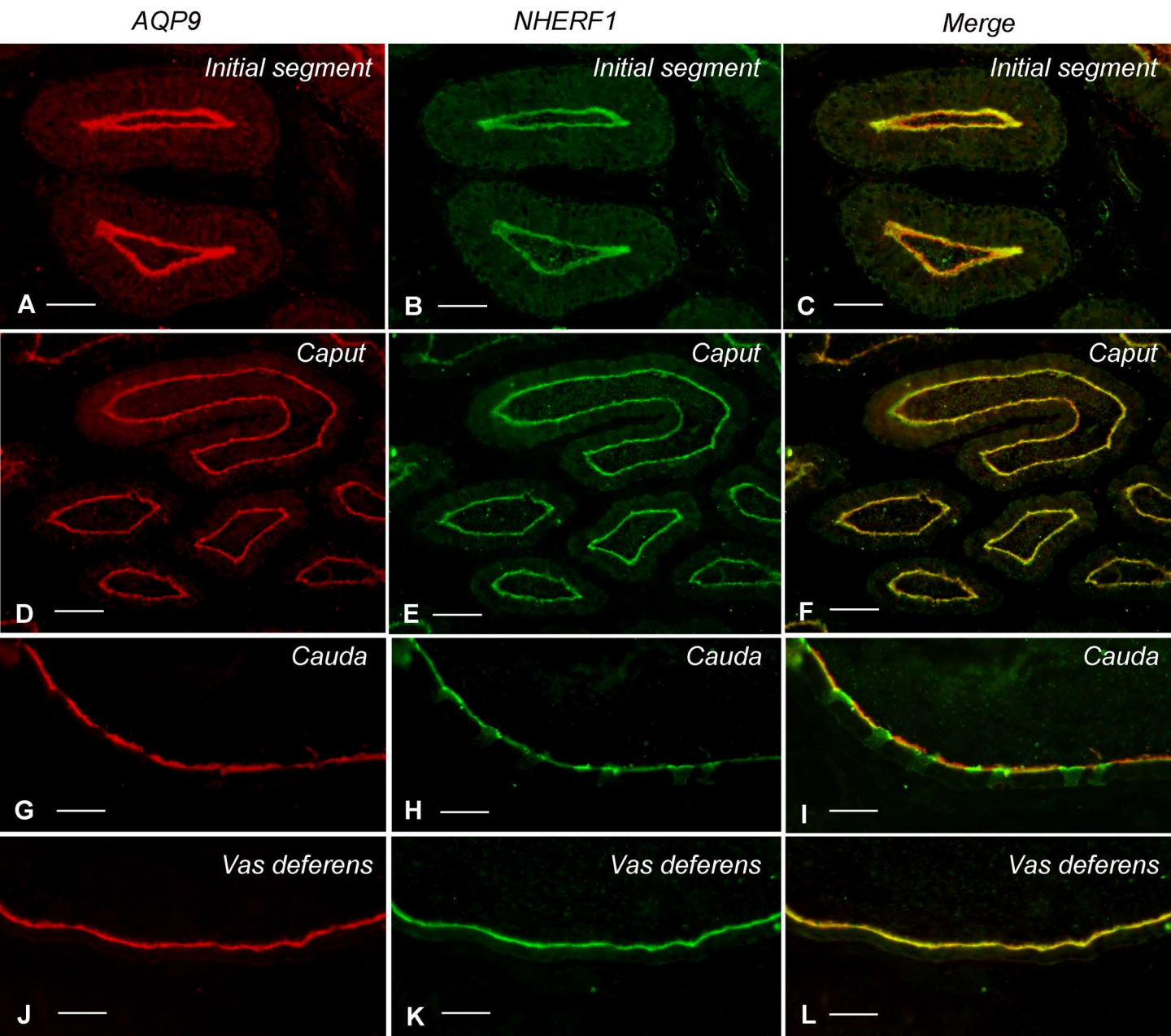


**A****B****Fig. 2**

**Initial rates of cell swelling  
(% / min)**

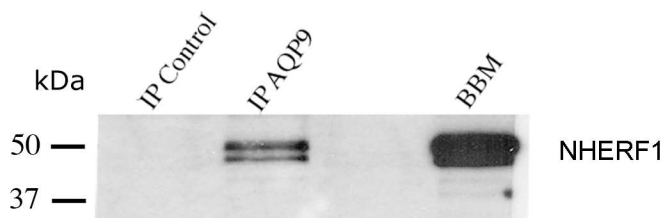


**Fig. 3**



**Fig. 4**

A



B

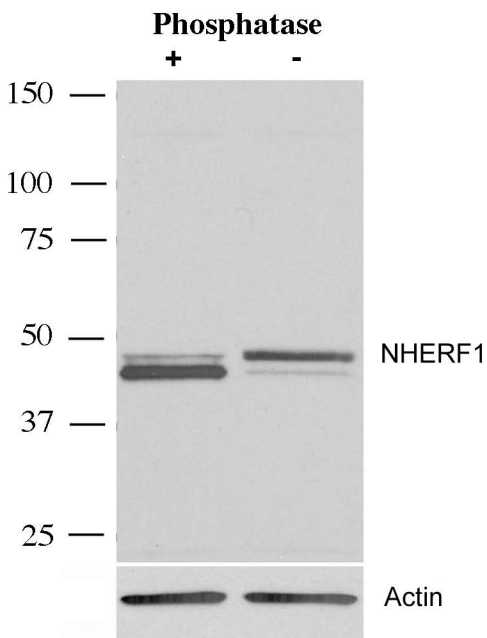
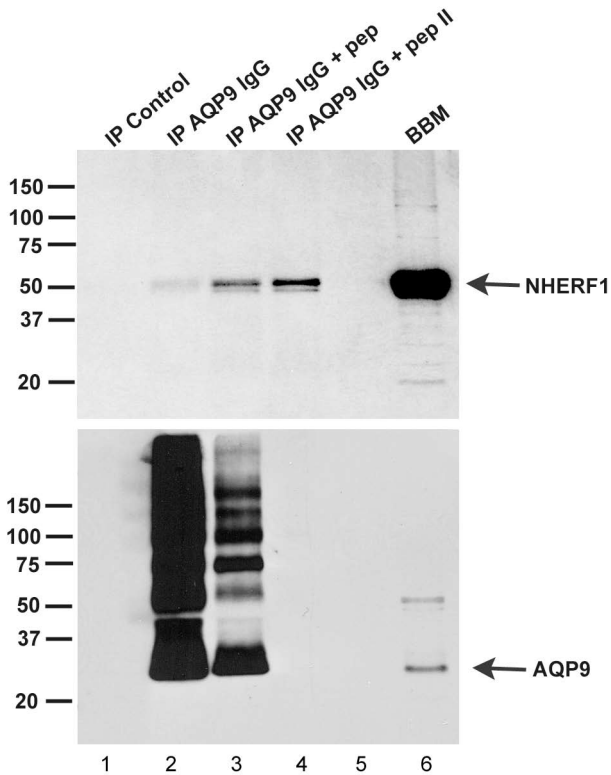
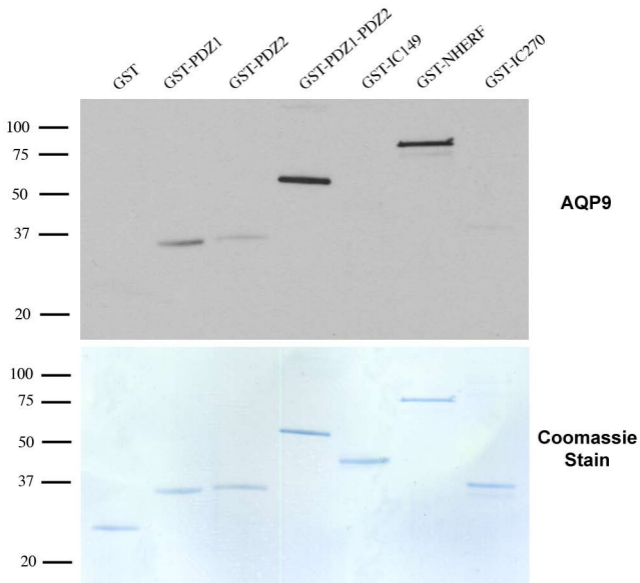


Fig. 5



**Fig. 6**



**Fig. 7**

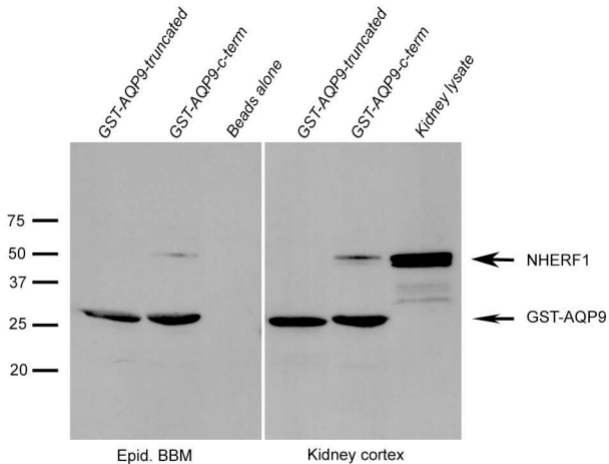


Fig. 8