# TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	X
Remerciements	xiii
Avant-propos	xiv
Chapitre 1. Introduction	1 <b>2</b> 2
1.1.3Les causes et diagnostics de l'infertilité masculine1.1.4L'impact de l'environnement sur la fertilité masculine1.1.5Comment surmonter l'infertilité masculine ?	2 3 5 7
1.2 L'épididyme	9
1.2.1       L'origine et l'anatomie de l'epididyme         1.2.2       L'histologie de l'épididyme         1.2.2.1       Les cellules principales	9 11
<ul> <li>1.2.2.2 Les cellules claires</li> <li>1.2.2.3 Les cellules basales</li></ul>	12 12 12
<ul><li>1.2.3 Les fonctions de l'épididyme</li><li>1.2.4 Les particularités de l'épididyme qui en font un bon modèle d'étude</li></ul>	13
1.3 Les vésicules extracellulaires	15
<ul> <li>1.3.1 Les vésicules extracellulaires</li></ul>	15 16 17 17 18
communication intercellulaire	
1.4 Les microARNs	19
1.4.1 Les différents types d'ARN	19
1.4.2 La découverte des microARNs	20
1.4.3 La biogenèse des microARNs	21
1.4.4 I ranscription des genes et formation du microAKN primaire	21 22
1.4.4.2 Exportation du microARN précurseur et 2 <sup>em</sup> étape de maturation	
<ul><li>1.4.4.3 Sélection du brin guide et association avec la protéine Argonaute</li><li>1.4.4.4 Régulation post-transcriptionnelle</li></ul>	23

1.4.5	La nomenclature des microARNs	25
1.4.6	L'implication des microARNs dans la fertilité masculine	26
1.5	Les biomarqueurs séminaux pour l'évaluation de l'infertilité mascul	ine
	27	
1.5.1	Qu'est-ce qu'un biomarqueur	27
1.5.2	2 Déterminer l'infertilité masculine	27
1.5.3	Différencier les étiologies de l'azoospermie	28
1.6	Problématique	. 29
1.6.1	Hypothèse	29
1.6.2	2 Objectifs	30
Chapitre	e 2. Rôle des microARNs dépendants de l'enzyme Dicer1 dans le	
contrôle	paracrine des gènes énididymaires	31
2 1	Pásumá	
2.1	A betweet	24
2.2	AUSLI act	. 34
2.5	Introduction	
2.4	Materials and methods	.31
2.4.1		
2.4.2	Mouse fissues	
2.4.3	MigroDNA migrocreate profiling	
2.4.4	Whole transprint expression profiling	
2.4.3	Bioinformatics analyses	
2.4.0	<ul> <li>Distinction displayers</li> <li>Production / isolation of extracellular vesicles (EVs) from DC2 cell lines</li> </ul>	30
2.4.7	Immunocytochemistry	40
2.4.0	Characterization of extracellular vesicles (EVs) by high-sensitivity flow	
evto	metry (HS-FCM) and zetasizer	40
2 4 1	0 HS-FCM	41
2.4.1	1 Zetasizer Nano-ZS	41
2.4.1	2 Small RNA purification	42
2.4.1	3 Reverse transcription and quantitative real-time PCR (gRT-PCR)	42
2.4.1	4 qRT-PCR on transcripts	42
2.4.1	5 qRT-PCR on miRNAs	43
2.4.1	6 Western-blot	44
2.4.1	7 Immunofluorescence on spermatozoa	44
2.4.1	8 Immunohistochemical staining	45
2.4.1	9 Statistical analysis	45
2.5	Results	. 46
2.5.1	Identification of Dicer1-dependent microRNAs in principal cells from the	
prox	imal epididymidis	46
2.5.2	<i>miR-210, miR-672, miR-191</i> and <i>miR-204</i> are secreted from principal cells	s via
extra	cellular vesicles	48
2.5.3	Gene expression pattern is altered in the corpus and cauda epididymidis fr	om
Dice	r1 cKO mice	51
2.5.4	In silico analysis of gene expression changes observed in the distal	
epidi	idymidis of Dicer1 cKO mice	55

2.6 2.7	Discussion Bibliographie	59 63
Chapitre	e 3. Détection de facteurs d'origine épididymaire dans le plasma	
séminal	humain	69
Résumé	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	70
Abstract	t	71
3.1	Introduction	72
3.2	Matériels et méthodes	74
3.2.1	Collection d'échantillons et création de la bio banque	.74
3.2.2	Isolement et concentration d'exosomes	.75
3.2.3	L'analyse de suivi de nanoparticules	.76
3.2.4	Immunobuvardage contre deux antigènes de surface des exosomes	.76
3.2.5	Extraction et purification d'ARN d'exosomes	.77
3.2.6	RT-qPCR contre des petits ARNs	.77
3.2.7	Immunobuvardage contre les protéines PATE4 et AZGP1 sur un extrait	
d'exe	osomes	.77
3.3	Résultats	78
3.3.1	Validation de la taille des exosomes	.78
3.3.2	Présence de petits ARNs dans les exosomes du plasma séminal humain	.81
3.3.3	AZGP1 est une protéine associée aux exosomes du fluide séminal humain	.82
3.4	Discussion	82
Chapitre	e 4. Conclusion	87
Bibliog	caphie	91
Annexe		05

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Références limites pour l'analyse de la semence selon l'Organisation Mondiale
de la Santé
Tableau 1.2 Caractéristiques spermatiques
Tableau 2.1 List of murine mature miRNAs displaying a reduced or increased intensity of
detection in Dicer1 cKO vs. control (Ctrl) mice
Tableau 2.2 Association of target genes predicted to be regulated by miRNAs candidates 57
Tableau 3.1 Valeurs médianes et écart type des critères de semence des deux cohortes de
patients

# LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Variation de la concentration spermatique	5
Figure 1.2 Régression linéaire de la densité moyenne des spermatozoïdes	.6
Figure 1.3 Épididyme murin1	0
Figure 1.4 Histologie de l'épididyme1	1
Figure 1.5 Schématisation des méthodes de sécrétion des exosomes et des microvésicules1	7
Figure 1.6 Biogenèse classique des microARNs2	2
Figure 2.1 miRNA signature change in the proximal epididymis region (i.e. initial	
segment/caput) of Dicer1 cKO mice	7
Figure 2.2 Secretion of Dicer1-dependent miRNAs from DC2 cells via extracellular	
vesicles (EVs)4	9
Figure 2.3 Impact of Dicer1-dependent factors on epididymal gene expression5	3
Figure 2.4 Protein Expression level of Zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1) in the	
epididymis of Dicer1 cKO and control mice5	;4
Figure 2.5 Localization of Zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1) on spermatozoa from wild	
type mice5	6
Figure 2.6 The "Reproductive system disease" network is the most significantly modified	
in the cauda epididymis of Dicer1 CKO compared to control mice according to Ingenuity	
Pathway Analysis (IPA) analysis	9
Figure 3.1 Isolement d'exosomes à partir de plasma séminal humain	60
Figure 3.2 Présence de miR-204, 672 et 191 ainsi que d'AZGP1 dans les exosomes du	
fluide séminal humain (A)	31

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

Ago : Protéine argonaute

AQP9 : Aquaporine 9

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

AZGP1 : Zn-alpha 2-glycoprotein

cKO : Délétion conditionnelle

DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene 8

FIV: Fécondation in vitro

Hsp70: 70 kilodalton heat shock proteins

ICSI : Injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde

miARN : microARN

MV : Microvésicule

MVE : Endosome multivésiculaire

NOA : Azoospermie non obstructive

NTA : L'analyse de suivi de nanoparticules (Nanoparticle Tracking Analysis)

OA : Azoospermie obstructive

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAP : Phosphatase acide prostatique

PATE4 : Prostate And Testis Expressed 4 protein

piARN: ARN interagissant avec la protéine Piwi (Piwi interactings RNA)

pré-miARN: microARN précurseur

pri-miARN: micoARN primaire

PSA : Antigène spécifique de la prostate

RISC: *RNA-induced silencing complex* 

siARN: Petits ARN interférents

TRBP: the human immunodeficiency virus Transactivating response RNA-binding protein

TEX101: Testis-expressed protein 101

VE : Vésicule extracellulaire

3'UTR : Région 3' non traduite (three prime Untranslated Transcribed Region)

"Goutte à goutte, l'eau creuse la pierre."

- Proverbe français

# REMERCIEMENTS

Par ce que sans l'aide de bien des gens, je n'aurais pas pu me rendre aussi loin.

J'aimerais tout d'abord souligner ma reconnaissance à Clémence Belleannée pour avoir cru en moi en m'acceptant dans son laboratoire comme première étudiante. Je te remercie de m'avoir si bien encadré durant ma formation, de m'avoir transmis tes connaissances et de m'avoir donné l'opportunité de présenter six fois à l'oral.

Je voudrais dire aussi un gros merci à Christine Légaré pour avoir été une personne ressource en laboratoire et qui m'a été d'une grande aide pour mes différents protocoles.

J'aimerais remercier également les gens de mon équipe, tout particulièrement Agathe Bernet pour avoir partagé ses belles années avec moi.

Je souhaite évidemment souligner ma reconnaissance aux divers organismes subventionnaires qui m'ont appuyé financièrement au cours de mes études de deuxième cycle, soit la Fondation du CHU de Québec et le Centre de recherche en Reproduction, Développement et Santé Intergénérationnelle (CRDSI).

Finalement, j'aimerais remercier toute l'équipe de la clinique de fertilité CReATe à Toronto, spécialement le Dr. Clifford L. Librach et Sergey Moskovtsev pour leur accueil et la chance qu'ils m'ont donné de vivre un stage Mitacs dans leurs laboratoires.

Rapport-gratuit.com ( Le numero 1 mondial du mémoires

# **AVANT-PROPOS**

Ce mémoire est présenté avec insertion d'articles et comporte quatre chapitres. Dans le premier chapitre, une revue de littérature définit les différents sujets de ma recherche. L'infertilité et le système reproducteur masculin sont introduit pour laisser place par la suite aux vésicules extracellulaires et au concept de biologie moléculaire des miARNs. L'objectif de cette introduction vise à mettre en contexte les résultats et conclusions de mon travail.

Le second chapitre est représenté par l'article qui a été publié dans la revue scientifique PLoS ONE en octobre 2016 (Jerczynski O, Lacroix-Pépin N, Boilard E, Calvo E, Bernet A, Fortier MA, et al. (2016) Role of Dicer1-Dependent Factors in the Paracrine Regulation of Epididymal Gene Expression. PLoS ONE 11(10): e0163876. doi:10.1371/journal. pone.0163876). Cette étude comparative met en évidence les changements d'expressions génétiques au niveau de l'épididyme murin lorsque l'enzyme Dicer est absente au niveau proximal de ce même organe. Étant première auteur du manuscrit, j'ai fait 75% du travail. En effet, j'ai aidé à l'analyse des résultats de micropuce et fait les validations d'expression au niveau du transcrit. J'ai aussi procédé aux différents marquages protéiques sur tissus et immunobuvardage. J'ai finalement fait les associations in silico entre certains gènes et les miARNs, participé à l'ébauche du matériel et méthodes ainsi qu'à la révision finale du papier. En ce qui concerne les autres auteurs : Nicolas Lacroix-Pépin a réalisé la partie culture cellulaire du projet ainsi que l'isolement des vésicules extracellulaires. Nous avons collaboré avec Éric Boilard pour son cytomètre en flux. Ézequiel Calvo a effectué les analyses bioinformatiques et Ida Björkgren et Petra Sipilä nous ont fourni le modèle de souris cKO pour l'enzyme Dicer dans la tête de l'épididyme. Agathe Bernet m'a aidé pour l'optimisation des amorces et Michel A. Fortier nous a fourni une lignée cellulaire et partagé du matériel. Clémence Belleannée a conçu et supervisé le projet, rédigé et révisé le manuscrit.

Le troisième chapitre présente ce que j'ai réalisé lors de mon stage Mitacs d'une durée de six mois, où trois mois se sont déroulés à la clinique de fertilité CReATe à Toronto. Cette collaboration est en continuité avec mon projet de maîtrise, où j'ai été amenée à évaluer le potentiel de deux protéines : AZGP1 et PATE4 ainsi que quatre miARNs : miR-210, miR-

672, miR-191 et miR-204 en tant que nouveaux marqueurs extracellulaires pour le diagnostic non invasif de certains types d'infertilité masculine. Lors de ce stage, j'ai fait la collecte d'échantillons de plasmas séminaux et de spermatozoïdes humains afin de créer une bio banque. J'ai également effectué le protocole d'isolement d'exosomes à partir de plasmas séminaux et toutes les approches moléculaires de ce projet afin de détecter les molécules extracellulaires.

Finalement, le dernier chapitre énonce les grandes conclusions de ce mémoire.

Chapitre 1. Introduction

# 1.1 L'infertilité masculine

#### 1.1.1 Qu'est-ce que l'infertilité ?

Chaque année, plus de sept millions de couples dans le monde sont incapables de concevoir un enfant (Pan *et al.*, 2018). C'est un problème qui touche environ 15% des couples, où l'homme et la femme sont impliqués de manière égale à cette impasse (Gnoth *et al.*, 2005; Greenhall & Vessey, 1990). Parmi ceux-ci, 20% de ces cas peuvent être attribués à un facteur masculin uniquement (Moskovtsev *et al.*, 2007). L'infertilité est envisagée lorsqu'après 12 mois de rapports sexuels réguliers et non protégés, une grossesse n'est toujours pas survenue (Nana. *et al.*, 2011). Basée sur les observations cliniques, la probabilité que la femme tombe enceinte est évaluée à 20% par cycle ovarien (World Health Organization, 1993). Ainsi, de manière cumulative, le taux de grossesse chez les couples fertiles est estimé à 93% sur une période d'un an. Après cette période, comme l'augmentation de cette probabilité cumulative de grossesse est de seulement 7%, la consultation médicale pour l'infertilité est justifiée (Sullivan, 2004). Toutefois, il ne faut pas confondre ce terme avec la stérilité, où l'infertilité est une diminution des probabilités de conception tandis que la stérilité est l'incapacité totale d'engendrer une grossesse.

## 1.1.2 Qu'elles sont les références utilisées pour diagnostiquer l'infertilité masculine ?

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) est une institution spécialisée de l'Organisation des Nations unies pour la santé publique créée en 1948 (World Health Organization, 2018b). Celle-ci a pour objectif d'harmoniser les normes et connaissances dans le domaine médical afin d'amener tous les pays du monde à un niveau de santé optimal. Ses priorités actuelles comprennent entres autre les maladies transmissibles, le vieillissement, la nutrition, la santé au travail, les abus de substance et la santé sexuelle et reproductive. Ainsi, le programme de l'OMS portant sur la reproduction humaine (HRP) a été créé en 1972 afin de promouvoir la coopération scientifique et technique entre pays développés et en développement et la coordination des efforts mondiaux en recherche dans le domaine (World Health Organization, 2018a). Le manuel de laboratoire pour l'examen et le traitement du sperme humain, publié la première fois par l'HRP en 1980 est devenu la norme mondiale pour les

laboratoires d'andrologie et les cliniques de fertilité (Mbizvo *et al.*, 2012). Il fournit entre autres des références inférieures limites, où une bonne qualité spermatique doit dépasser ces valeurs à la hausse. Ces références prennent compte du nombre de spermatozoïdes, de leur motilité, de leur forme et bien d'autres caractéristiques (Tableau 1.1). Sa cinquième édition a été publiée en 2010 et constitue le document le plus téléchargé de l'HRP. Étant traduites en plusieurs langues, ces normes se sont établies en tant que référence mondiale par rapport à d'autres manuels européens et américains. Celui-ci a d'ailleurs été cité 2384 fois dans des références de revues scientifiques (Mbizvo *et al.*, 2012).

 Tableau 1.1 Références limites pour l'analyse de la semence selon l'Organisation

 Mondiale de la Santé

OMS 2010	2
Volume de l'éjaculat (mL)	1.5
Concentration spermatique (10 <sup>6</sup> /mL)	15
Motilité totale (%)	40
Morphologie spermatique (% normaux)	4
pH	7.2

### 1.1.3 Les causes et diagnostics de l'infertilité masculine

Les causes d'infertilité masculine peuvent être classées dans trois grandes catégories majeures: les facteurs pré testiculaires (hypogonadisme ou troubles génétiques); les facteurs testiculaires (problèmes associés à la spermatogenèse ou cryptorchidie); et post-testiculaire (problèmes associés à la maturation spermatique, obstruction au niveau de l'épididyme, infections bactériennes ou déficience du système immunitaire) (Sullivan, 2004). Il est intéressant de remarquer que 30% des cas d'infertilité masculine sont encore aujourd'hui non classables parmi ces trois catégories et sont alors considérés idiopathiques, soit de cause médicale non connue (Jungwirth *et al.*, 2012). De manière générale, si une infertilité masculine est suspectée chez un couple, les médecins vont proposer au patient de passer un spermogramme dans une clinique, car c'est une intervention non invasive et simple à réaliser. C'est en fait la seule technique qui permet d'obtenir un diagnostic qualitatif de la semence chez l'homme, contrairement aux multiples outils et ressources disponibles pour détecter

l'infertilité chez la femme (S. Smith *et al.*, 2003). L'homme fournit ainsi un échantillon d'éjaculat au laboratoire qui procédera alors au lavage et à l'examen standardisé de la semence selon le manuel de l'OMS pour l'examen et traitement du sperme humain (Lu *et al.*, 2010). Le Tableau 1.2 résume les différents résultats que l'on peut obtenir suite à un spermogramme :

Diagnostic	Caractéristique(s)
oligozoospermie	faible production de spermatozoïdes
azoospermie	absence de spermatozoïdes
nécrozoospermie	spermatozoïdes morts
tératozoospermie	spermatozoïdes mal formés
asthénozoospermie	spermatozoïdes à faible motilité
normozoospermie	normaux

#### **Tableau 1.2 Caractéristiques spermatiques**

Ce diagnostic peut être de plus cumulatif de plusieurs anomalies, par exemple l'oligoasthénotératozoospermie qui est assez fréquente. Ces spermatozoïdes sont alors en quantité insuffisante (oligozoospermie), présentent une mobilité réduite (asthénozoospermie) et sont malformés (tératozoospermie). Malheureusement, le nombre de spermatozoïdes éjaculés peut fluctuer au sein d'un même homme selon différents facteurs, rendant l'information de la concentration spermatique peu stable si prit seul en considération comme critère décisif (Figure 1.1). Ce paramètre est tellement variable que celui-ci peut jusqu'à être similaire entre un homme fertile et infertile (RZ., 1951). C'est donc pourquoi certaines cliniques vont jusqu'à l'analyse de trois échantillons avant de donner un résultat (Lu *et al.*, 2010). Ainsi, même si les paramètres de la semence sont constamment utilisés pour catégoriser l'infertilité masculine, il faudrait toujours compléter avec d'autres analyses pour générer un diagnostic plus représentatif. Par exemple, une investigation hormonale pourrait être faite afin de dépister des dysfonctionnements endocriniens en cas de paramètres anormaux du sperme. Une analyse approfondie de l'histoire familiale et du caryotype pourrait permettre aussi de détecter certains troubles génétiques, comme le syndrome de Klinefelter





Figure 1.1 Variation de la concentration spermatique (Lu *et al.*, 2010) Variations du nombre et de la concentration des spermatozoïdes évaluées selon les méthodes recommandées par l'OMS en fonction du temps. Résultats compilés d'éjaculats de cinq jeunes hommes sains participant à une étude de contraception hormonale masculine, groupe placébo.

1.1.4 L'impact de l'environnement sur la fertilité masculine

Depuis les dernières années, la concentration spermatique mondiale a grandement diminuée (Figure 1.2). Une récente méta-analyse a d'ailleurs souligné ce déclin significatif entre les années 1973 et 2011 chez les hommes provenant des pays industrialisés (Levine *et al.*, 2017), soulignant le fait qu'il y aurait peut-être des variations géographiques dépendantes (Jorgensen *et al.*, 2001). Même si l'OMS met à jour ces données de référence pour l'examen et traitement du sperme humain, ce type d'information peut être assez alarmant. La sphère scientifique se penche alors depuis à essayer de comprendre pourquoi nous assistons à un tel

phénomène. Par exemple, Oliva *et al.* ont étudié la relation possible entre l'exposition à différents agents environnementaux et les hommes cherchant un traitement contre l'infertilité. Ils ont montré que les facteurs environnementaux tels que les pesticides et les solvants contribuent effectivement à la baisse de la concentration spermatique, aggravant ainsi les effets de facteurs de risque génétiques ou médicaux préexistants (Oliva *et al.*, 2001).



**Figure 1.2 Régression linéaire de la densité moyenne des spermatozoïdes (Elisabeth Carlsen, 1992)** Compilation des résultats de 61 publications entre les années 1938 et 1990, où la grosseur des cercles est proportionnelle au logarithme du nombre de sujets de l'étude.

La pollution pourrait donc jouer un rôle de perturbateur endocrinien (Carpenter & Sly, 2016) (Fathi Najafi *et al.*, 2015; Sinclair, 2000). L'apport nutritionnel aurait également un effet sur la qualité de la semence, où l'ingestion fréquente d'aliments lipophiles comme les produits carnés ou le lait nuirait à la concentration spermatique (Mendiola *et al.*, 2009). Puisque la raison exacte de cette baisse n'est pas encore connue, d'autres études devront être réalisées afin d'en connaître davantage.

## 1.1.5 Comment surmonter l'infertilité masculine ?

Dépendamment de la cause principale de l'infertilité masculine, plusieurs avenues sont possibles afin de pallier ce problème. Les cliniques de fertilité amènent donc une aide-externe au patient afin d'augmenter ces chances de conception. Lorsqu'il n'y a pas de réponse claire à l'infertilité masculine du patient, certaines cliniques peuvent suggérer de faire un test de fragmentation d'ADN sur la semence (M.Sergerie, 2005). En effet, les spermatozoïdes avec un ADN endommagé peuvent être caractérisés par une capacité réduite à provoquer une grossesse (Evgeni *et al.*, 2014). Néanmoins, il est tout de même possible d'utiliser ces spermatozoïdes à des fins de fécondation.

Les techniques les moins invasives, d'un point de vue masculin, proposées par les centres de reproduction assistée sont tout d'abord le rapport sexuel synchronisé et l'insémination artificielle, tous deux associés ou non à une stimulation ovarienne contrôlée. La stimulation des ovaires est pratiquée quand la femme est soupconnée également d'avoir des problèmes de fertilité ou pour maximiser les chances de fécondation. Ces techniques sont priorisées lorsque le diagnostic de l'infertilité masculine est léger ou encore comme première étape d'une démarche d'un diagnostic idiopathique. Le rapport sexuel synchronisé consiste en la pratique de l'identification du moment de l'ovulation et donc de la période fertile de la femme pour augmenter la probabilité d'une grossesse. En effet, la conception est favorable environ cinq jours et quelques heures après l'ovulation (Manders et al., 2015). Par conséquent, pour être efficaces, les rapports sexuels doivent avoir lieu pendant cette période. L'insémination artificielle est quant à elle l'introduction de sperme à l'aide d'un cathéter souple dans le cervix ou l'utérus de la femme. De manière générale, l'insémination offre aux hommes subfertiles de meilleures chances de conception qu'un rapport sexuel synchronisé (Cohlen et al., 2000). Quand le pouvoir fécondant des spermatozoïdes est moindre ou après plusieurs tentatives des deux premières techniques, la fécondation in vitro (FIV) est de mise. Comme le terme *in vitro* veut dire : en dehors du contexte biologique normal, c'est un critère assez vaste pour décrire précisément une technique. Ceci a donc englobé durant les dernières décennies une multitude de procédés de reproduction assistée. De nos jours, deux principales méthodes peuvent être décrites par cette caractéristique. La première vise à mettre en contact des ovocytes et des spermatozoïdes sur un pétri. Il y aura ensuite développement sous incubation des embryons et finalement transfert d'un blastocycte dans l'utérus de la femme. Quant à la dernière technique, celle-ci ne laisse toutefois plus aucune chance à la nature de participer à la sélection des gamètes sexuelles, car c'est un embryologiste qui aura à s'acquitter de cette tâche. L'*intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) est en effet la micro-injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte mature. Ce qui fait la force de cette technique c'est qu'elle ne fait aucune discrimination en termes de qualité de l'éjaculat du patient, car un seul spermatozoïde par ovocyte est nécessaire. La motilité n'est même plus un critère de sélection, contrairement à la fécondation in vitro conventionnelle qui nécessite au minimum que 30% des spermatozoïdes soient en parfaite condition (Riedel *et al.*, 1989). Il est même rendu possible d'utiliser l'ICSI pour les hommes ne possédant pas de spermatozoïde éjaculé causé par une azoospermie, obstructive ou non. Les gamètes mâles sont donc prélevés à l'aide d'une biopsie épididymaire en amont de l'obstruction ou d'une biopsie testiculaire (Vloeberghs *et al.*, 2015).

Depuis le premier bébé éprouvette née en 1978 en Grande-Bretagne, les techniques de reproduction assistée sont utilisées maintenant partout autour du globe (Devroey & Van Steirteghem, 2004). Cette avancée majeure dans le domaine de la reproduction a été entre autres reconnue par la nomination de Robert Edward pour le prix Nobel de 2010. Ces nouvelles technologies permettent d'augmenter considérablement le taux de naissance de certains pays tel que la Serbie (38.3% plus de grossesses grâce à l'assistance médicale en reproduction) (Nygren et al., 2011). L'ICSI est la technique de reproduction la plus utilisée actuellement puisque de nombreux centres l'utilisent même si le spermogramme du patient est normal (Jones et al., 2012). Toutefois, des préoccupations liées au caractère invasif de cette méthode et à la sélection plutôt arbitraire du spermatozoïde utilisé induisent encore aujourd'hui des questionnements concernant la fiabilité totale de l'ICSI. Par exemple, est-ce que l'âge d'un donneur de sperme influence le développement embryonnaire suite à une intervention de procréation assistée (Ghuman et al., 2016)? On pourrait se demander également si les enfants nés de grossesses uniques conçus par l'ICSI présentent un risque plus élevé de malformations (Lacamara et al., 2017). Également, peu d'informations sont encore connues sur les effets de cette technique à long terme. Est-ce que la micro-injection

Rapport-gratuit.com Le numero 1 mondial du mémoires

aurait un impact sur le développement et au niveau générationnel (Yu *et al.*, 2011)? Puisque l'ICSI soulève son lot de questions, il est donc important que la communauté scientifique continue de faire des recherches dans le domaine de la reproduction afin d'élucider tous les questionnements entourant cette pratique. Celle-ci contourne peut-être bien des problèmes, mais n'amène pas de piste de compréhension concrète des différentes facettes de l'infertilité masculine. Sans compter que certains types d'infertilité masculine ont une cause génétique, risquant alors de transposer ce même problème à la progéniture via l'ICSI (Alukal & Lamb, 2008). Ainsi, c'est plutôt en définissant les acteurs moléculaires de la capacité reproductive d'un individu que l'on pourra fournir un diagnostic objectif et ainsi adéquatement proposer des pistes de solution.

# 1.2 L'épididyme

### 1.2.1 L'origine et l'anatomie de l'épididyme

L'épididyme (en Grèque, epi pour 'sur' et didumoi pour 'testicule') prend origine des canaux de Wolff qui constituent, avec les canaux de Müller, l'appareil génital primitif des mammifères lors du stade embryonnaire et indifférencié (Sullivan & Saez, 2013). La différenciation ou sélection du sexe de l'embryon chez l'homme a lieu à la 8<sup>e</sup> semaine dépendamment de s'il y a production d'hormone de régression müllérienne de la part des testicules de l'embryon. En effet, si tel est le cas, les canaux de Müller vont dégénérer et laisser place au développement complet des voies génitales masculines (Ribeiro et al., 2016). L'épididyme est ainsi un organe du système reproducteur mâle accolé physiquement au testicule, reliant celui-ci par les vas efferents aux vas deferens (Belleannee et al., 2012). C'est un tubule unique et circonvolué sur lui-même, pouvant mesurer jusqu'à 1 mètre chez la souris et six mètres chez l'homme (Hinton et al., 2011). Il est subdivisé en trois régions anatomiques, soit le *caput* par sa forme bulbeuse, le *corpus* de forme allongé ainsi qu'au niveau distal et un peu plus gonflé, le *cauda* (Turner, 2008) (Figure 1.3). Même si cette régionalisation est retrouvée chez tous les mammifères, les rongeurs ont quant à eux une région supplémentaire nommée le segment initial et qui est retrouvée au niveau proximal, précédant le caput (Sullivan & Mieusset, 2016). De manière encore plus descriptive, l'épididyme peut être finalement subdivisé en segments intra-régionaux. Ils sont définis aux

endroits où le tubule est séparé par un septum, soit du tissu conjonctif (Domeniconi *et al.*, 2016). Par exemple, dix segments sont visibles chez l'épididyme murin (Figure 1.3). Même si le nombre de ces sous-segmentations est constant pour la plupart des espèces, peu d'informations sont connues sur le rôle de ces cloisons. Toutefois, certaines études ont réussi à démontrer leur imperméabilité, faisant alors penser que ceux-ci pourraient permettre de contrôler la communication paracrine intercellulaire ou encore limiter la propagation d'une infection bactérienne épididymaire (Stammler *et al.*, 2015).



Figure 1.3 Épididyme murin (Jelinsky *et al.*, 2007) Schémas démontrant les trois régions anatomiques principales de l'épididyme ainsi que les dix segments visibles de cet organe chez la souris.

Dans mon projet, nous utilisons l'épididyme murin comme modèle d'étude. Toutefois, il faut savoir qu'il existe certaines différences entre l'épididyme des rongeurs et celui de l'homme. Mis à part le fait que le segment initial et les septas sont absents chez les hommes, notons que le diamètre intraluminal épididymaire chez l'homme est relativement petit et que la partie distale de cet organe est peu développée. Ceci explique donc la capacité limitée du réservoir spermatique de l'homme en comparaison à l'épididyme murin (Sullivan & Mieusset, 2016).

## 1.2.2 L'histologie de l'épididyme

L'épididyme est composé d'un épithélium pseudostratifié, ce qui veut dire que malgré son allure de multicouche, toutes les cellules sont en contact avec le milieu intraluminale où baignent les spermatozoïdes. L'épithélium est constitué de plusieurs types cellulaires, dont les cellules principales, les cellules claires, les cellules basales et les cellules en halo (Belleannee *et al.*, 2012; Cornwall, 2009)(Figure 1.4).



Figure 1.4 Histologie de l'épididyme (Belleannee *et al.*, 2012) Schéma d'une coupe transversale du tubule épididymaire démontrant les différents types cellulaires de cet organe.

1.2.2.1 Les cellules principales

Comme leur nom l'indique, les cellules principales sont les cellules les plus abondantes de l'épithélium épididymaire. En effet, elles représentent 80% de la population cellulaire de cet organe (Belleannee *et al.*, 2012). Leur fonction est entre autres de relarguer au niveau luminal des protéines ou autres molécules impliquées dans la maturation spermatique. Elles ont aussi la capacité de sécréter des vésicules extracellulaires et d'exprimer spécifiquement l'aquaporine 9 (AQP9), une protéine impliquée dans le transport hydrique (Breton *et al.*, 2016). De plus, il a été remarqué que la forme de cette cellule change selon son emplacement le long de l'épididyme humain. Effectivement, les cellules principales sont d'apparence

allongée et rectangulaire au niveau de la région proximale et démontrent une forme plutôt carrée au niveau distal (Joseph *et al.*, 2011).

## 1.2.2.2 Les cellules claires

En termes de proportion, les cellules claires augmentent en nombre de manière croissante le long de l'épididyme. Exprimant spécifiquement la V-ATPase, le rôle de ces cellules est d'acidifier le milieu extracellulaire afin de garder les spermatozoïdes matures immobiles durant leur transit épididymaire. (Brown & Breton, 2000; Maxson & Grinstein, 2014). De plus, les cellules claires ont la capacité d'endocyter certaines particules du fluide épididymaire à l'aide de leur microvillosité, par exemple la gouttelette cytoplasmique qui se détache lors de la maturation spermatique (Hermo *et al.*, 1988)

# 1.2.2.3 Les cellules basales

De forme pyramidale, les cellules basales sont retrouvées sur le pourtour de l'épithélium épididymaire (Figure 1.4). L'une des extrémités de celle-ci a la particularité d'être capable de s'allonger pour devenir une projection cytoplasmique. Celle-ci peut même se rendre jusqu'au niveau de la lumière épididymaire afin de jouer le rôle de senseur dans le milieu extracellulaire de l'organe. Le fait de capter de l'information du fluide épididymaire permettrait aux cellules basales d'engendrer une communication intercellulaire avec les cellules claires afin de moduler le niveau de proton dans le lumen (Shum *et al.*, 2008).

# 1.2.2.4 Les jonctions serrées

L'épithélium de l'épididyme est hautement organisé et structuré. C'est entre autres grâce aux jonctions serrées si cette architecture est maintenue. Elles permettent aux cellules de s'accrocher entre elles et étant constituées de protéines intracellulaires, les jonctions serrées les relient également au cytosquelette (Gregory & Cyr, 2014). C'est grâce à celles-ci si le transport intercellulaire dans l'épithélium est unidirectionnel et que certaines cellules sont polarisées (B. Kim & Breton, 2016). Elles contrôlent aussi la prolifération cellulaire et

l'efficacité de la barrière avec le système sanguin (Gregory & Cyr, 2014; B. Kim & Breton, 2016) . Ce dernier rôle est crucial pour le développement d'un milieu optimal pour la maturation spermatique. Effectivement, la production de spermatozoïdes débute à la puberté, soit lorsque le système immunitaire de l'homme est déjà acquis, plus précisément les mécanismes de reconnaissance du soi. Les spermatozoïdes sont donc considérés comme des corps étrangers. Afin de minimiser le déclenchement d'une réaction auto-immune, les jonctions serrées permettraient donc d'exclure des deux tiers supérieurs de l'épithélium toutes cellules du système immunitaire (Dym & Romrell, 1975). Il peut arriver toutefois dans certains cas que des spermatozoïdes s'échappent de la trajectoire naturelle du tractus reproducteur pour s'agglomérer ailleurs dans l'épithélium épididymaire. Ceci mène alors la formation d'un granulome spermatique, soit une réaction inflammatoire localisée. Considéré néanmoins comme une lésion bénigne, le granulome peut être traité en chirurgie par excision de l'amas cellulaire (Wolf-Bernhard Schill, 2008).

#### 1.2.3 Les fonctions de l'épididyme

L'épididyme a quatre fonctions principales : transporter, immunoprotéger, participer à la maturation et stocker des spermatozoïdes. Tout d'abord, en fonction de son emplacement anatomique, l'épididyme sert à transport les gamètes mâles. Effectivement, c'est grâce à celui-ci si les spermatozoïdes peuvent rejoindre les *vas deferens*. Deuxièmement, l'épididyme crée un environnement de choix, particulièrement grâce aux jonctions serrées de son épithélium, afin d'immunoprotéger les cellules germinales du système immunitaire (Gregory & Cyr, 2014). Troisièmement, c'est grâce au transit dans l'épididyme si les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant. En effet, à la sortie d'un tubule séminifère du testicule, les spermatozoïdes sont complètement formés et morphologiquement normaux, mais n'ont pratiquement aucun habilité de se mouvoir ou encore de reconnaître un ovule (Sullivan & Mieusset, 2016). Le transit des spermatozoïdes dans l'épididyme, d'une durée de deux à six jours chez l'homme, joue donc un rôle important dans la maturation des gamètes sexuels mâles (Cornwall, 2009). Des évidences physiologiques montrent qu'il y a un remodelage des protéines de surfaces sur la tête du spermatozoïde lors de son passage dans l'épididyme et modification de la composition lipidique de la membrane plasmique de celui-

ci (Sullivan & Mieusset, 2016). De plus, comme le matériel génétique du spermatozoïde est quiescent du fait qu'il est extrêmement condensé, l'apparition subséquente de nouvelles protéines à sa sortie du testicule provient naturellement de l'épididyme. Par exemple, de leur rôle sécrétoire, les cellules principales de l'épithélium transfèrent aux spermatozoïdes une multitude de protéines, dont la dicarbonyl/I-xylulose réductase qui est impliquée dans la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide de l'ovocyte(Akintayo et al., 2015). L'implication de l'épididyme dans la maturation spermatique a été validée aussi par l'interprétation de différents résultats obtenus de FIV avec différentes populations spermatiques (Cooper, 1993). Toutefois, certains résultats ont réussi à démontrer le contraire en prouvant qu'une fécondation était possible avec des spermatozoïdes proximaux ou testiculaires (Mathieu *et al.*, 1992). Bien que ce genre de résultats soient contradictoires, rendant ainsi l'étude fonctionnelle de l'épididyme plus complexe, les ratios de réussite de conception sont néanmoins toujours plus élevés lorsqu'il y a utilisation de spermatozoïdes éjaculés (Rojas et al., 1992). Quatrièmement, l'épididyme sert de réservoir spermatique. En effet, la forme légèrement gonflée au niveau distal de l'épididyme permet de concentrer un maximum de spermatozoïde au même endroit. Par contre, cette capacité de stockage est nettement moindre chez l'homme que chez d'autres espèces. Ceci est dû au fait que l'homme à une région caudale épididymaire peu développée et quasi indifférentiable visuellement avec les vas deferens (Sullivan & Mieusset, 2016). C'est donc pourquoi la plupart des cliniques d'andrologie demandent 2 à 7 jours d'abstinence avant de fournir un échantillon d'éjaculat représentatif : le réservoir spermatique diminue assez rapidement. En effet, une étude a même démontré que le fait d'éjaculer chaque jour pendant deux semaines diminue significativement le volume moyen ainsi que la concentration spermatique retrouvée dans l'éjaculat (Welliver et al., 2016). Néanmoins, considérant le fait qu'une relation sexuelle n'est pas toujours synchronisée avec le cycle ovarien de la femme, l'épididyme participe à créer un réservoir hétérogène de cellules germinales. Dans ce sens, les cellules nouvellement matures vont se mélanger aux plus aniciennes dans l'éjaculat, augmentant alors la fenêtre de fécondation. Les spermatozoïdes de l'homme peuvent ainsi être viables pour une période de 24 à 48 heures dans le tractus reproducteur femelle (Sullivan & Saez, 2013). Toutefois après cette période, comme la plupart des cellules ont déjà capacités, les spermatozoïdes ont perdu leur pouvoir fécondant et sont alors phagocytés (Eisenbach, 2003).

#### 1.2.4 Les particularités de l'épididyme qui en font un bon modèle d'étude

L'épididyme est un organe de choix pour les études d'expression génétique, car ces gènes sont soumis à une expression spatialement régionalisée le long de celui-ci (C. M. Rodriguez et al., 2001). Parmi ces gènes, notons la famille des beta-defensines qui sont des petits peptides antimicrobiens jouant un rôle au niveau du système immunitaire et dans la maturation spermatique (Zhou et al., 2004). Ainsi, l'avantage de sélectionner l'épididyme comme modèle d'étude est que l'on peut facilement réaliser des délétions conditionnelles d'expression génique en sélectionnant un gène promoteur dont l'expression est restreinte au sein de cet organe. Certains se sont alors posé la question à savoir si nous devions plutôt percevoir l'épididyme comme une série d'organes placé côte à côte (Domeniconi et al., 2016). Afin de maintenir cette segmentation physiologique, l'épithélium épididymaire est régulé par de nombreux facteurs. Parmi les plus importants, notons les androgènes et œstrogènes, les facteurs testiculaires (lumicrines) et la température (Belleannee et al., 2012; Cornwall, 2009; Sullivan & Mieusset, 2016). Finalement, un autre avantage de l'épididyme est qu'il nous permet d'étudier un système de communication intercellulaire dans un système clos. Ainsi, tous les facteurs extracellulaires libérés dans la lumière de l'épididyme sont soit internalisés, dégradés ou libérés à la sortie de l'organe. Deux principaux modes de sécrétion sont retrouvés chez l'épididyme, soit la sécrétion mérocrine et apocrine et seront discutés plus en détail dans la section 1.3.

# **1.3** Les vésicules extracellulaires

# 1.3.1 Les vésicules extracellulaires

On retrouve une panoplie de vésicules extracellulaires (VEs) dans les fluides biologiques, dont la salive, le sang, l'urine, le lait maternel et le plasma séminal (Lasser *et al.*, 2011). Les VEs au sein de l'épididyme ont été découvertes pour la première fois en 1985 au niveau de l'épididyme du hamster où il a été remarqué que ceux-ci interagissaient avec la surface de l'acrosome du spermatozoïde (Yanagimachi *et al.*, 1985). Comme les VEs forment une famille complexe de vésicules membranaires, variant entre elles par leur mécanisme de sécrétion, leur taille ou encore de leurs protéines de surface, les VEs qui sont retrouvées au

niveau du fluide épididymaire ont toutes été regroupées sous le nom d'épididymosome (Sullivan, 2015). De manière générale, on peut grossièrement séparer la population vésiculaire en trois grands groupes, soit les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques (Gyorgy *et al.*, 2011) (Figure 1.5). Une caractéristique commune aux trois types de ces vésicules est qu'elles sont toutes composées d'une bicouche de phospholipides et elles peuvent également toutes transporter des protéines, des miARNs et des ARNm (Mathivanan *et al.*, 2010).

## 1.3.1.1 Les exosomes

Les exosomes sont des petites vésicules d'environ 50-100 nm de diamètre, soit de taille similaire aux virus. Ils prennent naissance dans la cellule, s'accumulant dans un endosome multivésiculaire (MVE) (Gyorgy *et al.*, 2011) (Figure 1.5). En effet, les exosomes proviennent de l'endocytose, car ils présentent à leur surface la transferrine, soit un marqueur protéique utilisé pour le suivi de l'internalisation (Thery *et al.*, 2002). Par la suite, les MVEs vont fusionner avec la membrane plasmique de la cellule afin de relâcher les exosomes grâce à une sécrétion de type mérocine (Robaire & Hinton, 2002). Le système mérocrinien est le mode de sécrétion le plus courant, entre autres utilisé par les glandes exocrines du corps humain. Une particularité de cette voie de sécrétion est que la cellule en exocytose ne s'effrite pas durant le processus, n'endommage pas ainsi sa membrane plasmique et son intégrité (J. D. Smith & Hearn, 1979). Ce type de sécrétion peut de plus être spontanée ou induite (Thery *et al.*, 2009). Les exosomes exposent généralement la phosphatidylserine et présentent à leur surface plusieurs marqueurs protéiques tels que les molécules CD9, CD81 CD63 et l'HSP70 (Gyorgy *et al.*, 2011; Mathivanan *et al.*, 2010). Les exosomes sont le type vésiculaire le plus documenté par la communauté scientifique.

## 1.3.1.2 Les microvésicules

Les microvésicules (MVs) sont de plus grande taille que les exosomes, ayant un diamètre pouvant aller jusqu'à 1µm (Gyorgy *et al.*, 2011) (Figure 1.5). Elles sont donc d'ordre de grandeur des bactéries ou encore des complexes protéiques. Elles sont formées par bourgeonnement de la cellule, emprisonnant ainsi le contenu du cytoplasme. Contrairement aux exosomes, leur production est déclenchée uniquement par un stimulus d'activation ou d'un début d'apoptose cellulaire (Beyer & Pisetsky, 2010). Les MV ont particulièrement été étudiées chez les plaquettes (Thery *et al.*, 2009).



**Figure 1.5 Schématisation des méthodes de sécrétion des exosomes et des microvésicules** (**Raposo & Stoorvogel, 2013**) Les MVs bourgeonnent directement à partir de la membrane plasmique, alors que les exosomes s'accumulent tout d'abord dans un MVE. Celui-ci libère par la suite les exosomes par fusion avec la membrane plasmique ou fusionne plutôt ave le lysosome et se désintègre.

# 1.3.1.3 Les corps apoptotiques

Les corps apoptotiques sont, comme les MVs, produits par bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule mère. Ce qui les différencie de ces dernières est que celles-ci sont beaucoup plus grosses en termes de taille, soit de 1 à 4 um de diamètre (Hristov *et al.*, 2004). Comme leur nom l'indique, ces vésicules sont produites lorsque la cellule est en train de

mourir. La fragmentation cellulaire en phase d'apoptose servirait entre autres à faciliter l'action phagocytaire (Beyer & Pisetsky, 2010).

## 1.3.2 La sécrétion apocrine dans l'épididyme

Les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant grâce au transit dans l'épididyme. Ainsi, l'hypothèse que l'épithélium épididymaire participerait à la maturation des gamètes mâles en transférant différentes molécules a été soulevée par le domaine scientifique. Pour qu'une protéine soit normalement sécrétée par exocytose, celle-ci doit présenter dans sa séquence une section codante pour un peptide signal (Blobel & Dobberstein, 1975). Sans celui-ci, la protéine reste dans l'environnement interne de la cellule mère. Toutefois, le fait que les spermatozoïdes aient à leur surface certaines protéines avec une ancre GPI, soit une modification post traductionnelle liant un glycolipide à l'extrémité C-terminale du peptide, expose l'existence d'une deuxième méthode de sécrétion au niveau de l'épididyme qui contourne la voie mérocrine (Cornwall, 2009; Paulick & Bertozzi, 2008; Sullivan & Saez, 2013). En effet, la sécrétion apocrine n'implique pas le réticulum endoplasmique ni l'appareil de Golgi. Elle engendre plutôt la formation de bulles apicales contenant des organites et des vésicules de différentes tailles (Sullivan *et al.*, 2005). Ces bulles se détacheraient ensuite de la surface cellulaire et leur contenu serait finalement libéré lorsque les bulles subissent une fragmentation. Contrairement à la sécrétion mécrocrine, la sécrétion apocrine est ainsi accompagnée de la perte d'une partie du cytoplasme. Ce type de sécrétion est de plus particulièrement étudié dans le tractus reproducteur mâle (Sullivan, 2015). La protéine P26h, qui est impliquée dans l'attachement du spermatozoïde à l'ovocyte chez le hamster, est un exemple de protéine avec une encre GPI (Legare et al., 1999). Grâce à leur propriété sécrétoire, les cellules participant à la production de ces VEs dans l'épididyme seraient majoritairement les cellules principales et à plus petite échelle les cellules dendritiques (Montecalvo et al., 2012).

Rapport-grasuit.com LE NUMERO I MONDIAL DU MÉMOIRES

1.3.3 Les méthodes d'internalisation des vésicules et leur rôle dans la communication intercellulaire

La communication intercellulaire est une caractéristique clé des organismes multicellulaires et peut être médiée par trois méthodes : contact direct cellule-cellule, transfert de molécules sécrétées ou transfert intercellulaire de VE (Raposo & Stoorvogel, 2013). Les VEs sont un bon moyen pour transférer des molécules, car elles protègent leur cargaison de la dégradation enzymatique pendant le transit dans l'environnement extracellulaire. Ceci assure donc une efficacité de rendement dans la communication intercellulaire. Afin que ces molécules soient prises en charge par une cellule receveuse, la VE doit soit fusionner avec la membrane plasmique ou être internalisée par endocytose (Mulcahy et al., 2014). Les bicouches lipidiques se rapprochent jusqu'à la formation d'un pore de fusion, ce qui mène alors une restructuration de la membrane plasmique et mélange des milieux aqueux (Mulcahy et al., 2014). Pour que la VE soit internalisée par cette méthode, celle-ci doit exprimer à sa surface des protéines impliquées dans la liaison cellulaire, telles que les SNARE et les protéines Rab afin d'initialiser un premier contact avec la cellule cible (Duman & Forte, 2003; Hutagalung & Novick, 2011). Comme pour la fusion des membranes, l'endocytose nécessite aussi l'aide des protéines de surface afin d'amorcer la prise en charge de la VE. Parmi celles-ci, notons les tétraspanines tels que CD9 ainsi que les lectines (Mulcahy et al., 2014). Une fois internalisée par cette méthode, la VE peut soit fusionner avec la membrane de l'endosome ou être dirigée au lysosome pour être dégradée.

# 1.4 Les microARNs

### 1.4.1 Les différents types d'ARN

Les miARNs font partie de la famille des petits ARNs non codants, qui inclut entre autres les ARNs interférants (siARNs) et les piwi ARNs (piARNs) (Bartel, 2009). Ayant tous entre 20 et 30 nucléotides, ceux-ci varient entre eux par leur rôle distinct et leur origine de biosynthèse. En effet, les miARNs proviennent de longues séquences d'ARNs monocaténaires qui se replient sur eux-mêmes en forme d'épingle à cheveux. Ils sont codés par des gènes qui leur sont spécifiques et sont impliqués dans la répression de la traduction

ou dans la dégradation de l'ARNm (Grosshans & Filipowicz, 2008). En contrepartie, les siARNs sont formés par clivage de longues molécules d'ARNs bicaténaires et sont particulièrement importants pour combattre les transposons et les infections virales. Finalement, les piARNs sont formés à partir de longs précurseurs monocaténaires, s'associent avec la sous-famille Piwi des protéines Argonautes (Ago) et sont essentiels pour le développement des cellules germinales.

#### 1.4.2 La découverte des microARNs

Les miARNs ont été découvert pour la première fois en 1993 par le laboratoire de Victor Ambros chez le vers C. elegans (R. C. Lee et al., 1993). En effet, ils ont remarqué que le gène lin-4 ne codait pas pour une protéine, mais bien pour un petit ARN d'envion 22 nucléotides de longs ayant une séquence anti-sens complémentaire pour l'ARN codant pour le gène lin-14. En se liant à la séquence d'ARN de lin-14, ce petit ARN est capable de contrôler d'expression de celui-ci. Les effets de cette régulation entre *lin-4* et *lin-14* ont ainsi mené à la compréhension d'un des mécanismes de régulation des différents stades de développement larvaire de C. elegans. C'est toutefois les travaux de Craig Mello et Andrew Fire qui leur ont valu le « Prix Nobel de physiologie ou de médecine » pour la découverte du phénomène d'ARN interférent en 2006. En effet, par leurs expériences, ils ont réussi à démontrer que la transfection de molécule d'ARN double brins étaient plus efficace pour interférer les fonctions d'un gène cible qu'un oligonucléotide simple brin chez C. elegans. (Fire et al., 1998). Comme seulement quelques molécules d'ARN bicaténaires injectées étaient nécessaires pour voir un effet d'interférence sur le nématode et ses descendants, ceci suggéra alors qu'il y avait un mécanisme de biosynthèse avec une composante catalytique capable d'amplifier ce processus au sein des cellules. Dans ces mêmes années, le phénomène biologique a aussi été étudié chez les plantes, plus particulièrement chez les pétunias, où de petits ARNs étant capables de contrôler l'expression des gènes impliqués dans la pigmentation du pétale de fleur ont été découverts (Napoli et al., 1990).

#### 1.4.3 La biogenèse des microARNs

Les miARNs matures sont des petits ARNs non codants d'une longueur allant de 20 à 22 nucléotides. Toutefois, avant d'être fonctionnel au sein d'un complexe protéique, les miARNs subissent plusieurs étapes de maturation. Voici donc ci-bas les étapes classiques (Figure 1.6). Toutefois, des exceptions à la règle sont présentes dans le règne du vivant, comme les mitrons (Berezikov *et al.*, 2007). En effet, leur biogenèse contourner la première étape de clivage essentiel à la formation des miARNs par une étape d'épissage.

## 1.4.4 Transcription des gènes et formation du microARN primaire

Les gènes codants pour les miARNs sont propres à chacun d'eux. Leur séquence peut soit être localisée au niveau des régions introniques ou dans les régions d'ADN non codantes (Y. K. Kim & Kim, 2007; A. Rodriguez *et al.*, 2004). Des miRNAs provenant de l'ADN intronique, environ un tiers de ceux-ci ont des régions d'initiation de la transcription indépendantes de leurs promoteurs hôtes (Ozsolak *et al.*, 2008). Ainsi, les miARNs peuvent posséder leur propre promoteur de transcription. Néanmoins, les miARNs ont la possibilité aussi d'être cotranscrits avec leur gène hôte (A. Rodriguez *et al.*, 2004). Dans la majorité des cas, l'enzyme qui s'occupe de la transcription des gènes des miARNs dans le noyau cellulaire est l'ARN polymérase II (Y. Lee *et al.*, 2004). Ainsi, les transcrits possèdent les caractéristiques des produits de cette enzyme, à savoir une coiffe 7-méthyl-guanosine en 5' et une queue polyadenylée en 3' (Cai *et al.*, 2004). Les transcrits produits se nomment microARNs primaires (pri-miARNs), sont de longs de plusieurs nucléotides et sont distinctifs par une structure en tige et boucle.



**Figure 1.6 Biogenèse classique des microARNs (Winter et al., 2009)** La production du miARN primaire par l'ARN polymérase II et le clivage de celui-ci par le complexe Drosha-DGCR8 se déroule dans le noyau. L'épingle à cheveux qui en résulte, le miARN précurseur, est exportée du noyau par Exportin-5. Dans le cytoplasme, la RNase Dicer se lie à l'ARN double-brin et clive l'épingle à cheveux à sa longueur mature. Le brin fonctionnel du duplex de miARN va s'associer à la protéine Argonaute 2 afin de former le complexe RISC tandis que l'autre brin sera dégradé.

1.4.4.1 1<sup>re</sup> Étape de maturation des microARNs primaires

La structure en épingle à cheveux du pri-miARN est reconnue par un complexe nucléaire qui réalise la première étape de maturation de ceux-ci. Ce complexe est formé de la RNase III Drosha et de son cofacteur DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) (Y. Lee *et al.*, 2003). C'est toutefois grâce à DGCR8 qui lie l'ARN double brin si Drosha peut jouer son rôle d'endoribonucléase (Y. K. Kim & Kim, 2007). En effet, la délétion de DGCR8 diminue à lui seul la quantité de pri-miARN clivés dans la cellule (Landthaler *et al.*, 2004). Le clivage du pri-miARN amène à la production d'un microARN précurseur (pré-miARN) toujours sous forme d'une tige-boucle, d'environ 70 nucléotides et avec une extrémité 3' plus

longue de 2 nucléotides que l'extrémité 5'. Cette dernière caractéristique est la signature de la réaction de clivage médiée par une RNase-III (Y. Lee *et al.*, 2003).

# 1.4.4.2 Exportation du microARN précurseur et 2<sup>em</sup> étape de maturation

Le pré-miARN est ensuite transporté vers le cytoplasme via l'Exportin-5. C'est une protéine faisant partie de la famille des karyophérines et qui est dépendante de la GTPase Ran pour avoir l'énergie nécessaire pour la translocation de molécule d'ARN du noyau (Yi *et al.*, 2003). Suite à son export, le pré-miARN est pris en charge par une deuxième RNase, soit l'enzyme cytoplasmique Dicer. Cette protéine possède de multiples domaines, y compris deux domaines RNase III universellement conservés et un domaine PAZ (Gurtan *et al.*, 2012). Le domaine PAZ est une région qui lie l'ARN en reconnaissant les extrémités 3' et 5' du pré-miARN, et ce, de manière indépendante de la séquence. C'est donc grâce au positionnement de PAZ que subséquemment les domaines de RNAse coupent au bon endroit le pré-miARN. La RNAse IIIA clive le brin 3' et le domaine RNAse IIIB le brin 5' (Gurtan *et al.*, 2012). Quant à lui, le cofacteur TRBP (*the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*), est une protéine ayant trois domaines de liaison à l'ARN et serait nécessaire au recrutement de la protéine Ago2 (Chendrimada *et al.*, 2005). Suite à l'activité de Dicer, le pré-miARN n'a plus sa forme en épingle à cheveux et est maintenant réduit à être une molécule d'ARN double brin entre 20 et 22 nucléotides.

## 1.4.4.3 Sélection du brin guide et association avec la protéine Argonaute

Un seul des deux brins du pré-miARN est sélectionné afin de s'associer avec la protéine Argonaute (Ago) pour former le complexe ribonucléoprotéique RISC (*RNA induced silencing complex*). En incorporant ce fragment, le complexe RISC acquiert la capacité de reconnaître spécifiquement la séquence complémentaire de son fragment et c'est Ago qui clivera finalement cet ARNm. Ce processus est appelé interférence ARN (ARNi). Généralement, le brin du pre-miARN ayant l'extrémité 5' la moins stable thermodynamiquement est celui qui deviendra de brin guide pour la régulation posttranscriptionnelle, tandis que l'autre brin passager sera dégradé (Ro *et al.*, 2007). Chez l'homme, il existe 8 membres protéiques de la famille des Ago (Sasaki *et al.*, 2003). Toutefois, seule la protéine Ago2 est impliquée dans le complexe RISC (Meister *et al.*, 2004). L'interaction entre la protéine Ago2 et le miRNA sélectionné serait dépendante de l'extrémité phosphorylée de celui-ci, où une forte proportion d'adénine et d'uridine sont conservées dans cette région (Frank *et al.*, 2010). Cependant, pour certains miARNs, le choix du brin mature dépend du type cellulaire qui les produit et peut donc varier d'un tissu à l'autre (Ro *et al.*, 2007).

## 1.4.4.4 Régulation post-transcriptionnelle

Même si le miARN mesure entre 20 et 22 nucléotides de long, seuls les nucléotides 2 à 8 en 5' sont importants pour la reconnaissance de l'ARNm (B. P. Lewis et al., 2003). Cette région clé du miARN est appelée seed region (Cai et al., 2004). Toutefois, un appariement supplémentaire en 3' est parfois observé, ce qui permet de renforcer l'interaction du complexe miARN-Ago. Les sites de liaison des miARNs se situent habituellement en 3' de la région non codante de l'ARNm (Cai et al., 2004; Meister et al., 2004). Les possibilités d'association sont donc très grandes, car un seul miARN est capable de contrôler l'expression de plus d'un ARNm cible et que chaque ARNm peut être régulé par plusieurs miARNs. Grâce au miARN, la reconnaissance spécifique permet finalement à la protéine Ago de cliver l'ARNm visé, inhibant ainsi toute traduction de cet ARNm. Malgré le fait que le rôle des miARNs soient plutôt réducteur d'expression génique, certains phénomènes enclenchant la traduction ont été observés (Cai et al., 2004). Les miARNs peuvent être relargués dans le milieu extracellulaire dans le but de réguler l'expression des gènes de manière paracrine chez les cellules avoisinantes. La détermination des miARNs qui sont localisés dans les exosomes par exemple serait fait sur la base d'une séquence conservée des miARNs appelée EXOmotif. En effet, les EXOmotifs GGAG et UGCA seraient présents au niveau 3' dans environ 70% des miARNs extracellulaires (Villarroya-Beltri et al., 2013).

## 1.4.5 La nomenclature des microARNs

Les miARNs ont depuis été retrouvés chez presque tout le domaine du vivant, en passant par les virus jusqu'à l'homme (Bartel, 2009). Plus de 2588 miARNs matures ont été identifiés chez l'humain jusqu'à maintenant (http://mirbase.org). Il n'est donc pas étonnant de savoir que plus de 60% de nos gènes sont sous le contrôle des miARNs (Friedman *et al.*, 2009). En effet, il a été démontré que la région cible des miRNAs a hautement été conservée chez les vertébrés, car 44 000 sites de liaison de 87 familles de miARN sont présents chez 23 espèces différentes de vertébré (Friedman *et al.*, 2009). Ayant donc subsisté au cours de l'évolution, les miARNs constituent ainsi l'une des classes de molécule les plus abondantes pour la régulation génétique et sont impliqués dans la quasi-totalité des processus physiologiques cellulaires.

Comme le domaine des miARNs est en plein émergence, la communauté scientifique a rapidement dû mettre en place une méthode de nomenclature afin d'harmoniser le nom de ces petits ARNs non codants. Les miARNs sont nommées en utilisant le préfixe "miR" et un numéro d'identification unique (Ambros *et al.*, 2003). L'espèce peut aussi être mentionnée avec un acronyme latin. De manière générale, le numéro est attitré de manière séquentielle, donc plus le numéro est petit, plus ce miARN devrait avoir été découvert en premier. Comme les miARNs provenant d'une même famille ont des séquences presque identiques, à l'exception d'un ou deux nucléotides, ils sont annotés avec une lettre minuscule supplémentaire à la fin de leur numéro. Si toutefois la séquence est identique entre-deux miARNs au sein d'un même organisme, un tiret suivi d'un chiffre est ajouté à la suite du numéro d'identification. Finalement, la nature de l'ARN (5' ou 3') est jointe à la toute fin. Par exemple, le miARN mmu-miR-205-5p est un miARN retrouvé chez la souris (mmu pour *Mus Musculus*), son numéro d'identification est le 205 et le brin d'ARN associé à la protéine Ago2 est le brin 5'.
#### 1.4.6 L'implication des microARNs dans la fertilité masculine

Depuis les dix dernières années, la communauté scientifique s'est intéressée à comprendre le lien reliant les miARNs et la fertilité masculine. Même si l'inactivation d'un seul gène codant pour un miARN conduit rarement à un dérèglement physiologique en raison d'effets compensatoires par d'autres miARNs, il a été découvert que l'absence de deux familles de miARNs chez la souris, soit miR-34b/c et miR-449, engendre l'infertilité (Wu et al., 2014). En effet, une diminution du nombre de spermatozoïdes ainsi qu'une déformation morphologique de ceux-ci est notable chez les descendants. L'inactivation des enzymes impliquées dans la biogenèse des miARNs dans le système reproducteur mâle de souris a permis aussi de souligner l'importance de ces molécules dans l'acquisition du pouvoir fécondant. Par exemple, l'absence de l'enzyme Dicer dans les cellules de Sertoli, soit les cellules somatiques de soutien de l'épithélium des cellules germinales mâles, entraîne la stérélité due à l'absence complète de spermatozoïde et à la dégénérescence progressive des testicules (Papaioannou et al., 2009). De manière similaire, l'absence de cette même enzyme au niveau proximal de l'épididyme provoque entre autres la désorganisation de l'épithélium de cet organe et un déséquilibre dans l'expression des récepteurs stéroïdiens, menant alors à une infertilité chez les souris mâles (Bjorkgren et al., 2015; Bjorkgren et al., 2012).

Au niveau de l'épididyme, les recherches sur les miARNs ont révélé que l'expression de ceux-ci variait selon le stade jeune ou adulte de l'homme, indiquant que les miARNs sont importants pour le développement postnatal de l'épididyme (Zhang *et al.*, 2010). La signature en miARNs de l'épididyme est de plus spécifique et différente d'une région anatomique à l'autre, soulignant l'expression extrêmement segmentée de cet organe (Belleannee *et al.*, 2012). Si l'on s'intéresse plus spécifiquement aux miARNs extracellulaires, il a été découvert que les épididymosomes ont la capacité de transporter de petits ARNs non codants comme les miARNs et que ceux-ci, dépendamment de leur région de sécrétion dans cet organe, ne contiennent pas tous les mêmes miARNs (Belleannee *et al.*, 2013; Reilly *et al.*, 2016).

# 1.5 Les biomarqueurs séminaux pour l'évaluation de l'infertilité masculine

#### 1.5.1 Qu'est-ce qu'un biomarqueur

Un biomarqueur se réfère généralement à un indicateur mesurable d'un état ou d'une condition biologique (Strimbu & Tavel, 2010). Ils existent donc sous forme diverse, moléculaire comme les miARNs ou encore protéique. Pour qu'un biomarqueur soit optimal, il doit être détectable de manière fiable et rapide, non invasive et finalement de façon peu coûteuse. L'étude des biomarqueurs pour l'évaluation de l'infertilité masculine est une thématique d'actualité puisque ceux-ci pourraient servir à fournir une information complémentaire aux tests réalisés en andrologie ou affirmer un diagnostic, et ce sans engendrer trop de manipulations supplémentaires. En effet, ces biomarqueurs se retrouvent au même titre que les spermatozoïdes dans un éjaculat, plus précisément au niveau du plasma séminal. Comme celui-ci est composé des sécrétions des organes internes du système reproducteur masculin, la signature moléculaire spécifique du plasma séminal peut refléter un dysfonctionnement potentiel de la prostate, du testicule ou encore de l'épididyme (Talluri *et al.*, 2017). Ainsi, les biomarqueurs séminaux peuvent aider à déterminer l'infertilité masculine, différencier les étiologies de l'azoospermie ou encore pour prédire le succès des techniques de reproduction assistée(Bieniek *et al.*, 2016).

#### 1.5.2 Déterminer l'infertilité masculine

Les cliniciens s'appuient généralement sur l'analyse du sperme pour évaluer l'infertilité masculine. Cependant, comme les valeurs de l'OMS sont sujettes à des changements et réévaluations, il est devenu évident qu'une telle analyse est insuffisante pour déterminer l'état de fertilité du partenaire masculin (S. E. Lewis, 2007). Milardi *et al.* ont alors décidé d'identifier des protéines séminales impliquées dans le pouvoir fécondant. Ainsi, en utilisant des échantillons de plasma séminaux de 5 hommes fertiles ayant conçu dans les 3 mois avant le début de l'étude, ils ont découvert 83 protéines communes dans tous les échantillons, dont certaines pouvant être impliquées dans le pouvoir fécondant, telles que la séménogéline et la lactoferrine (Milardi *et al.*, 2012). Dans ce même ordre d'idée, l'équipe de Jodar *et al.* ont

décidé de mettre en évidence des miARNs de nature spermatique nécessaire afin d'engendrer une grossesse. En effet, à l'aide de 96 couples participants ayant une infertilité idiopathique, ils ont découvert que l'absence de certains miARNs spermatiques réduit le pourcentage de naissance de 73 à 27% (Jodar et al., 2015). Abu-Halima et al. se sont intéressés à cette même problématique, voulant valider un ensemble de cinq miARN, à savoir, hsa-miR-34b, hsamiR-34b, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-429, et hsa-miR-122 comme biomarqueurs de l'infertilité masculine. Ils ont constaté que hsa-miR-429 était significativement surexprimé et que les quatre autres miARNs étaient sous exprimés chez les hommes subfertiles ou ayant une azoospermie non obstructive par rapport aux sujets témoins normaux (Abu-Halima et al., 2014). Finalement, les biomarqueurs séminaux peuvent servir à discerner les différents sous-types d'infertilité masculine. Par exemple, Wang et al. ont réalisé une analyse protéomique comparative de plasma séminaux d'hommes asthénozoospermiques et normozoospermiques afin d'identifier des variations d'expression protéiques, comme la protéine DJ-1. Celle-ci est impliquée dans le contrôle du stress oxydatif et est sousreprésentée de moitié dans le plasma séminal de patients asthénozoospermiques (J. Wang et al., 2009).

## 1.5.3 Différencier les étiologies de l'azoospermie

Comme la méthode clinique actuelle pour différencier les cas d'azoospermie non obstructive (NOA) des cas obstructifs (OA) nécessitent souvent une intervention chirurgicale pour un diagnostic concluant, Batruch *et al.* ont comparé le protéome de plasma séminaux de patients NOA aux protéomes d'hommes fertiles et d'hommes post-vasectomisés. Ainsi, ils ont découvert qu'il y a 34 et 18 protéines surexprimées et sous-exprimées respectivement entre le groupe témoin et les patients NOA (Batruch *et al.*, 2012). Bon nombre des protéines identifiées étaient de nature testiculaire ou épididymaire et étaient finalement liées au pouvoir fécondant. Plus spécifiquement, Drabovitch et al. ont analysé l'expression de 18 biomarqueurs potentiels dans 119 échantillons de plasma séminaux d'hommes normozoospermiques et d'azoospermiques. Ils ont réussi à identifier deux protéines extracellulaires variant en termes d'expression entre les hommes OA et les NOA, soit ECM1 qui est exprimée par l'épididyme et TEX101, une protéine d'origine testiculaire (Drabovich

Rapport-gratuit.com Le numero 1 mondial du mémoires

*et al.*, 2013). L'utilité clinique de TEX101 en ELISA a d'ailleurs été démontrée pour évaluer la réussite chirurgicale de la vasectomie et de permettre la spécification du type d'azoospermie (Korbakis *et al.*, 2017).

# 1.6 Problématique

Au Canada, l'infertilité touche environ 1 couple sur 10 souhaitant avoir des enfants. De ces derniers, plus de 60% sont causés par des facteurs masculins ou par une combinaison de facteurs des deux sexes. Malgré les différents tests effectués en clinique, 30% de ces cas d'infertilités resteront inexpliqués. Comme ce problème de santé est grandissant, nous voulons mieux comprendre les mécanismes de base qui contrôlent la fertilité chez l'homme. Notre projet de recherche vise ainsi à déchiffrer la complexité de la signalisation des miARNs extracellulaires dans l'épididyme, l'organe du système reproducteur mâle responsable de la maturation et du transport des spermatozoïdes.

#### 1.6.1 Hypothèse

La grande famille des molécules d'ARNs est présente dans tous les types cellulaires. Parmi ceux-ci, les miARNs contrôlent l'expression des gènes cibles et régulent de nombreuses fonctions physiologiques. Ils peuvent également être impliqués dans la communication intercellulaire suite à leur transfert via des VEs d'une cellule à l'autre. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les miARNs au sein de l'épididyme participent à ce mécanisme. Plus spécifiquement, que les miARNs de la région proximale de cet organe (segment initial / caput) pourraient agir comme régulateur paracrine de l'expression des gènes épididymaires des régions distales (corpus, cauda). Nous pensons que ce phénomène participe à l'acquisition du pouvoir fécondant mâle et qu'une dérégulation de ces composants peut entraîner des problèmes de fertilité. Également, nous croyons au potentiel de certaines molécules extracellulaires impliquées dans cette communication intercellulaire comme marqueur non invasif pour le diagnostic des dysfonctions associées aux problèmes d'infertilité.

#### 1.6.2 Objectifs

Mon projet peut se séparer grossièrement en quatre objectifs. Tout d'abord, à l'aide d'un modèle de souris infertile cKO pour Dicer, le premier objectif est de déterminer quels miARNs sont différentiellement exprimés au niveau proximal de l'épididyme en comparaison à des souris témoins et valider parmi ceux-ci lesquels sont encapsulés dans des vésicules extracellulaires. Afin d'atteindre cet objectif, une expérience de type micropuce sera effectuée. Les miARNs significativement variant vont être ensuite validés par qPCR. En ce qui concerne la détermination du mode de sécrétion de ces miARNs, une culture cellulaire de cellule épididymaire va être réalisée afin d'isoler les exosomes du surnageant. La présence des différents miARNs d'intérêts va ensuite être analysée par qPCR. Le deuxième objectif de cette étude est d'identifier quels gènes au niveau de la région distale de l'épididyme sont affectés par l'absence des miARNs proximaux. Pareillement au premier objectif, une expérience comparative sera faite suivie de validations par différentes méthodes, comme la qPCR, l'immunobuvartage et l'immunofluorescence. Le troisième objectif consiste quant à lui à démontrer s'il y a un lien reliant les miARNs et gènes variants. Pour ce faire, des études in sillico à l'aide de différents logiciels et bases de données seront réalisées. Finalement le dernier objectif de ce projet a pour but de transposer cette présente étude chez l'homme afin de déterminer si nos molécules d'intérêts ont un profil d'expression et d'interaction similaire que chez le modèle murin. Afin de réaliser cette tâche, ce dernier objectif peut se séparer en trois sous-objectifs, où le premier est de tout d'abord récolter des échantillons humains. Cette étape va être entre autres réalisée en collaboration avec une clinique de fertilité. Deuxièmement, les exosmoses du plasma séminal vont être isolés grâce à une colonne de chromatographie par exclusion de taille. Finalement, je vais pouvoir tester par immunobuvardage et par qPCR la présence de protéine et de miARNs d'intérêts dans les extraits d'exosomes.

Chapitre 2. Rôle des microARNs dépendants de l'enzyme Dicer1 dans le contrôle paracrine des gènes épididymaires

# Role of Dicer1-dependent factors in the paracrine regulation of epididymal gene expression

Olivia Jerczynski<sup>1</sup>, Nicolas Lacroix-Pépin<sup>1</sup>, Eric Boilard<sup>2</sup>, Ezequiel Calvo<sup>3</sup>, Agathe Bernet<sup>1</sup>, Michel A. Fortier<sup>1</sup>, Ida Björkgren<sup>4,#a</sup>, Petra Sipilä<sup>4,5</sup>, Clémence Belleannée<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Department of Obstetrics, Gynecology and Reproduction, Université Laval, CHU de Québec Research Center (CHUL),, Quebec City, Quebec, Canada.

<sup>2</sup> Department of Immunity and Infectious Diseases, Université Laval, CHU de Québec Research Center (CHUL), Quebec City, Quebec, Canada.

<sup>3</sup> Endocrinology unit, CHU de Québec Research Center (CHUL), Quebec City, Quebec, Canada.

<sup>4</sup> Department of Physiology, Institute of Biomedicine, University of Turku, Turku, Finland.

<sup>5</sup> Turku Center for Disease Modeling, University of Turku, Turku, Finland.

<sup>#a</sup> Current Address: Department of Molecular and Cell Biology, UC Berkeley, USA

<sup>\*</sup> Corresponding author

E-mail to CB: <u>Clemence.Belleannee@crchudequebec.ulaval.ca</u>

**Keywords:** Epididymis, microRNAs, Dicer1, intercellular communication, infertility, paracrine factors

Running title: Paracrine control of epididymal gene expression

# 2.1 Résumé

Dicer1 est une endoribonucléase impliquée dans la biogenèse des miARNs. Puisque les miARNs vésiculaires peuvent participer à un mécanisme de communication intercellulaire, le rôle de ceux-ci dans la régulation des gènes impliqués dans la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes a été investigué au niveau de l'épididyme, un organe du système reproducteur mâle reliant le testicule au Vas deferens. Plus spécifiquement, nous avons étudié le rôle des miARNs dépendants de Dicer1 dans la région proximale de l'épididyme (segment initial/Caput) comme régulateur paracrine de l'expression des gènes épididymaires des régions distales (Corpus, Cauda). Une analyse différentielle par micropuce/ANOVA a été réalisée en comparant le profil d'expression génique de souris contrôles à celui de souris cKO pour Dicer1 (Defb41<sup>iCre/wt</sup>;Dicer1<sup>fl/fl</sup>) au niveau des cellules principales de la région proximale de l'épididyme. 20 miARNs montrent une altération significative de leur intensité d'expression en l'absence de Dicer1 au niveau de la tête de l'épididyme (facteur de variation> 2 ou <-2; p <0,01). Plus spécifiquement, miR-210, miR-672, miR-191 et miR-204, qui sont des miARNs sous-exprimés dans le modèle murin invalidé génétiquement, ont la capacité d'être sécrétés via des exosomes dérivés d'une lignée immortalisée de cellules principales isolées de l'épididyme proximal chez la souris (cellules DC2). Par la suite, PATE4 et AZGP1, deux protéines impliquées dans la motilité spermatique ont été identifiés comme affichant d'importantes variations génétique d'expression dans la région distale épididymaire des souris cKO; Corpus et Cauda respectivement (facteur de variation> 2 ou <-2; p <0,001 ). Des analyses in silico ont permis de mettre en lumière une régulation plausible du gène Pate4 avec les miR-204 et miR-210. Finalement, l'impact de l'absence de la ribonucléase Dicer1 au niveau proximal de l'épididyme a été corrélé in silico avec une dérégulation du système immunitaire et reproducteur chez les souris cKO. En conclusion, notre étude suggère que les produits de Dicer1 sont des régulateurs des fonctions épididymaires pouvant contribuer au phénotype d'infertilité observé chez les souris cKO mâle. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour l'identification de biomarqueurs pour le diagnostic non invasif de certains types l'infertilité masculine.

# 2.2 Abstract

Dicer1 is an endoribonuclease involved in the biogenesis of miRNAs. Since vesicular miRNAs can participate in an inter-cellular communication mechanism, their role in the regulation of genes involved in post-testicular sperm maturation has been investigated in the epididymis, an organ of the male reproductive system joining the testicle to the Vas deferens. More precisely, we studied the role of Dicer1-dependent miRNAs in the proximal region of the epididymis (initial segment / Caput) as a paracrine regulator of epididymal genes expression in distal regions (Corpus, Cauda). Differential analysis by microchip / ANOVA was performed by comparing the gene expression profile of control mice to cKO mice for Dicer1 ( $Defb4l^{iCre/wt}$ ;  $Dicer1^{fl/fl}$ ) in the major cells of the proximal region of the epididymis. RESULTS: 20 miRNAs show a significant alteration in their expression intensity in absence of Dicer1 in the epididymis head (> 2 or <-2; p <0.01). More specifically, miR-210, miR-672, miR-191 and miR-204, which are under-expressed miRNAs in the genetically invalidated murine model, can be secreted via exosomes derived from an immortalized line of main cells isolated from the proximal epididymis in mice (DC2 cells). Subsequently, AZGP1 and PATE4, two proteins involved in sperm motility were identify exhibiting significant variations in gene expression in the epididymal distal region of the cKO mice; Corpus and Cauda respectively (variation factor> 2 or <-2; p <0.001). In silico analyzes revealed plausible regulation of the Pate4 gene with miR-204 and miR-210. Finally, the impact of the absence of Dicer1 ribonuclease at the proximal epididymis level was correlated in silico to deregulation of the immune and reproductive system in cKO mice. Our study suggests that Dicer1 products are important regulators of epididymal functions and may participate in the infertility phenotype observed in the cKO male mice. These results open new prospects for the identification of biomarkers for the non-invasive diagnosis of of male infertility.

# 2.3 Introduction

Dicer1 is an RNase III enzyme involved in the canonical biogenesis of functional microRNAs (miRNAs) through trimming of miRNA precursors (pre-miRNA). Small (~22 nt) non-coding single-stranded miRNAs bind to target mRNAs and induce their degradation or inhibit their translation into proteins via RNA interference [1], for review [2, 3]. MicroRNAs are endogenously produced by all cells, following several steps of maturation. First, miRNAs are transcribed in the nucleus as long primary miRNA (pri-miRNA) transcripts by RNA polymerase II, and cleaved by the DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8)/Drosha complex to form 70-nt-long stem-loop pre-miRNA. Following their export to the cytoplasm via Exportin 5, pre-miRNA undergo cleavage by Dicer1 to produce ~22-nt-long doublestranded miRNAs. One miRNA strand is finally assembled into the RNA-induced silencing complex (RISC) with Argonaute (AGO) proteins to interfere with the 3'-untranslated region (UTR) of target mRNA. This association results in the cleavage or translational repression of the target transcript. Since the expression of nearly 60% of human genes-and their respective biological pathways-is regulated at the post-transcriptional level by miRNAs, these small molecules are involved in the control of major pathological conditions (for review [3]), many of them being associated with male reproductive tract dysfunction leading to infertility [4-7].

MicroRNAs participate in a well-conserved mechanism of intercellular communication, as they can be released from cells and disseminated by extracellular fluids to reach and modify the functions of remote target cells [8]. These extracellular miRNAs (ex-miRNAs) can be found associated with different carriers such as high- and low-density lipoproteins [9, 10], ribonucleoproteins [11], or encapsulated and protected from RNAse assault in cell-derived extracellular vesicles (EVs) [12, 13]. Extracellular vesicles encompass a complex diversity of vesicles–including microvesicles and exosomes–that differ in terms of size, mode of secretion, lipid, protein and nucleic acid composition [8, 14]. Thus, ex-miRNAs transported in EVs belong to a category of paracrine messengers that stably exist in most biological fluids [15], including fluids found in the male reproductive system [16-18].

Similarly to other biological systems, male reproductive tract functions are regulated by Dicer1-dependent factors, including miRNAs, and by EVs secreted by distinct secretory

organs such as the prostate and the epididymis [17, 19]. The epididymis governs the acquisition of sperm motility and oocyte binding ability and is a single long tubule, located downstream of the testis [20-22]. It is divided into three distinct regions: the proximal (initial/segment caput), median (corpus), and distal (cauda) regions. During epididymis transit, spermatozoa interact with the epididymal fluid, which is composed of different factors that are sequentially secreted/reabsorbed by distinct cell types of the surrounding epithelium. Principal cells are the main epithelial cells of the epididymis and are specialized in protein secretion via the classical exocytosis pathway and apocrine secretion of EVs, referred to as epididymosomes (for review [23]). Extracellular vesicles are capable of transferring proteins involved in different steps of the fertilization process to the sperm surface [24-27], as well as non-coding RNAs, including transfer RNA-derived fragments (tRFs) and miRNAs [28-30].

MicroRNAs are thought to be important in fertility since the double inactivation of *miR-34b/c* and *miR-449* miRNA clusters results in male infertility due to reduced sperm production and decreased sperm motility [6, 31]. In addition, the conditional deletions of the major enzymes involved in miRNA biogenesis (*i.e.* Dicer1 or Dgcr8) impair primordial germ cell development [32, 33] spermatogenesis, and sperm maturation [4, 5, 7, 34]. The importance of Dicer1 in epididymis homeostasis and sperm maturation has been shown in the *Defb41*<sup>*scrowe*</sup>;*Dicer1*<sup>*psp*</sup> mouse model. Epithelial dedifferentiation, abnormal lipid homeostasis, and sperm maturation defects are observed in these mice. For instance, sperm cells isolated from the distal epididymis of *Defb41*<sup>*scrowe*</sup>;*Dicer1*<sup>*psp*</sup> mice are predominantly immotile, and present with a decreased ability to bind and fertilize an oocyte [34].

Recognizing that 1) Dicer1-dependent factors are required for complete sperm maturation in the epididymis, and that 2) miRNAs are potent mediators of intercellular communication in most biological systems, we investigated the role of Dicer1-dependent factors, in the downstream paracrine regulation of epididymal gene expression. To this end, we used a combination of microarray approaches, technologies adapted to EV characterization and powerful bioinformatics tools along with the *Defb41*<sup>crew</sup>;*Dicer1*<sup>nn</sup> mouse model and DC2 cell lines. Thus, our study contributes to deciphering the intercellular communication pathways that support epididymal homeostasis and fertility.

### 2.4 Materials and methods

#### 2.4.1 Ethics

Our study on mouse epididymal samples was conducted in accordance with the requirements defined by the NIH Guide to animal experimentation. Animal experiments were approved by the ethical committee of the Institutional Review Board of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ)(CPAC license #13-105-3, C. Belleannée).

#### 2.4.2 Mouse tissues

Epididymides from *Dicer1*<sup>neg</sup> (Control) and *Defb41*<sup>coneg</sup>;*Dicer1*<sup>neg</sup> (Dicer1 conditional knock-out (Dicer1 cKO)) were used in this study. In this genetically modified mouse model, the enzyme Dicer1 has been conditionally inactivated in the principal cells of the initial segment/caput epididymidis by a Cre–Lox system under the control of the  $\beta$ -defensin 41 promoter [5, 34]. Briefly, Dicer1 recombination was catalyzed by Defb41<sup>coneg</sup> before puberty (starting from postnatal day 12). The defensin-41 promoter was chosen as an epididymides from sacrificed mice were dissected into three main anatomical regions, *i.e.* the initial segment/caput, the corpus and the cauda. Paired tissue samples obtained from the same epididymal region were pooled and weighed. Tissues were directly snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}$ C until use to prevent RNA degradation. Spermatozoa were collected from adult C57BI/6 mice (n=4) for fluorescent immunostaining.

#### 2.4.3 Total RNA extraction and purification from mouse tissues

Total RNA was isolated from the initial segment/caput, the corpus and the cauda epididymal regions from three control and three Dicer1 cKO mice. Frozen tissues were powdered with a pestle and mortar on dry ice, and homogenized in RLT lysis buffer (Qiagen). Ribonucleic acid was purified with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol, and potential genomic DNA contamination was eliminated with the RNase-free DNase set (Qiagen). Total RNA was eluted in RNAse-free water and its concentration was quantified with a NanoDrop 1000 microvolume spectrophotometer (Thermo Scientific). Ribonucleic acid quality was assessed with the Agilent RNA 6000 pico and Agilent RNA

nano kits on a 2100 Bioanalyzer by the transcriptomic core facility of the CHUQ (Agilent). The RNA integrity numbers were in the range of 8.10 to 9.60 (S1 Fig.). Samples were stored at  $-80^{\circ}$ C until use.

### 2.4.4 MicroRNA microarray profiling

Total RNA samples from the proximal epididymis (*i.e.* initial segment/caput) of three control and three Dicer1 cKO mice were used for microarray comparative analysis to identify Dicer1-dependent mature miRNAs produced by principal cells in this region. For each sample, 400 ng of total RNA were labeled with the FlashTag Biotin HSR Labeling Kit (Affimetrix, Santa Clara, USA) and hybridized to the GeneChip miRNA 4.0. Array (Affymetrix). This array covers 203 organisms, including human, rat and mouse, and contains 30,424 probe-sets, of which 1,908 correspond to murine mature miRNA sequences and 1,255 to miRNA precursor sequences. Probe-sets refer to nucleic sequences released in miRBase v.20.0 (http://www.mirbase.org/). Microarrays were scanned using the Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G and the Affymetrix GeneChip Command Console Software (Affymetrix, Santa Clara, CA), to produce the intensity files. The image data were analyzed with Expression Console software for quality control (Affymetrix) (S2 Fig.) and extracted with GeneChip Operating Software (GCOS v 1.4; Affymetrix). CEL files were imported and analyzed with Partek Genomics Suite 6.5 software (Partek Incorporated), following a Robust Multiarray Analysis (RMA) background correction. All miRNA microarray data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository database for public access (#GSE77139).

## 2.4.5 Whole-transcript expression profiling

Total RNA samples from the *corpus* and the *cauda* epididymal regions of three controls and three Dicer1 cKO mice were used to determine the transcript signature found in these regions. Microarray analyses were performed by the CHUQ Gene Expression Platform (Quebec, Canada). Samples were hybridized to the GeneChip Mouse Gene 2.0 ST (Affymetrix). This array encompasses 35,240 transcript probe-sets, from three transcript data sources (*i.e.* RefSeq, Ensembl and IncRNA db). As described above, microarrays were scanned using the Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G and Affymetrix GeneChip Command Console

Rapport-grastuit.com LE NUMERO I MONDIAL DU MÉMOIRES

software (Affymetrix, Santa Clara, CA), to produce the intensity files. The image data were analyzed with Expression Console Software for quality control (Affymetrix) (S2 Fig.) and extracted with the GeneChip Operating Software (GCOS v 1.4; Affymetrix). CEL files were imported and analyzed with Partek Genomics Suite 6.5 software (Partek Incorporated). All gene expression microarray data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository database for public access (pending number).

#### 2.4.6 Bioinformatics analyses

Robust Multiarray Analysis (RMA) background correction was applied to all microarrays prior to expression analysis by using Partek's software (Partek Incorporated, St Louis, MO, USA). Differentially expressed miRNAs or transcripts were analyzed by ANOVA pair-wise comparison between the distinct epididymal regions of Dicer1 cKO *vs*. Control mice. Principal component analysis (PCA), unsupervised hierarchical clustering, and volcano plots were performed with Partek Genomics Suite 6.5 software.

*In silico* study of biological pathways modified in Dicer1-cKO mice were performed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (http://www.ingenuity.com/), Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, (http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp), and the ClueGO Cytoscape program v2.2.2, 2015 (http://www.ici.upmc.fr/cluego/). Unless specified otherwise, stringency cut-off for gene set analysis was set to a fold-change > 1.5 and p < 0.01.

## 2.4.7 Production/isolation of extracellular vesicles (EVs) from DC2 cell lines

DC2 cells are immortalized murine principal cells isolated from the caput epididymidis that were kindly provided by Professor Marie-Claire Orgebin-Crist (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN). DC2 cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Invitrogen, ON, Canada) supplemented with 5α-di-hydrotestosterone (DHT, 1 nM) and 10% fetal bovine serum (Invitrogen, ON, Canada) at 32.8°C as described previously [35]. Confluent monolayers of DC2 cells were washed twice with PBS prior to treatment. For fluorescent detection of EVs secreted from epididymal principal cells, DC2 cells were incubated for 30 min with 10 μM CellTracker Green CMFDA Dye (Life Technologies, ON, Canada) in IMDM without serum, and then washed again twice

with PBS as previously described [36]. Cells were then incubated with 1  $\mu$ M calcium ionophore with or without exosome-free serum for 30 min or 24 h. To produce exosome-free serum, FBS was filtered through a 0.22- $\mu$ m-pore-size membrane (Sarstedt, QC, Canada) and centrifuged overnight at 120 000 × g. This was followed by another centrifugation for 80 min at 120 000 × g [37]. Efficiency of EV depletion was assessed by high-sensitivity flow cytometry (HS-FCM) and zetasizer as described below. After incubation, cell culture supernatants were collected and centrifuged for 10 min at 800 × g to eliminate cells and apoptotic bodies, then aliquoted and frozen at -80°C prior to analysis. For EV purification, the supernatant was filtered and centrifuged for 80 min at 120 000 × g and then washed with PBS and centrifuged again for 80 min at 120 000 × g. The pellet was then resuspended in 150 µl of PBS.

#### 2.4.8 Immunocytochemistry

For immunostaining, the DC2 cells were cultured on an 8-chamber slide (Lab-Tek, Nunc Inc. Naperville, Illinois), then washed twice with PBS and fixed in precooled (-20°C) 100% methanol solution for 2 min. Cells were then washed again twice with PBS and air-dried prior to storage at -20°C until use. The fixed cells were serially hydrated for 15 min with PBS, then treated with PBS pH 7.2 containing 1% SDS for 4 min at room temperature. The slides were washed twice with PBS for 5 min then incubated with PBS containing 1% (w/v) BSA (Sigma, St-Louis, MO) for 15 min. The fixed cells were incubated with FITC-conjugated anti-cytokeratin antibody (1:100, F3418, Sigma, St-Louis, MO) overnight at 4°C in a moist chamber. Cells were then washed twice in high salt PBS (PBS containing 2.7% (w/v) NaCl) for 5 min and then washed twice with PBS for 5 min. DAPI mounting medium (VectaShield, H-1200, Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used prior to coverslip application and immunofluorescence-stained samples were examined with a Zeiss Axioskop 2 epifluorescence microscope (Carl Zeiss Canada).

# 2.4.9 Characterization of extracellular vesicles (EVs) by high-sensitivity flow cytometry (HS-FCM) and zetasizer

Extracellular vesicles secreted from cultured DC2 cells were analyzed using highly sensitive technologies, such as HS-FCM and nanosizer, which were adapted for the detection of small particles.

#### 2.4.10 HS-FCM

CMFDA-positive EVs were directly detected from cell culture supernatants with a FACS Canto II (BD Biosciences, CA, USA) equipped with powerful blue laser (100 mW) and a forward scatter (FSC) coupled to a photomultiplier tube (PMT) "small particles option" (FSC-PMT). This sensitive approach allows the detection of labelled EVs without performing a preliminary purification step. With the exception of Tween 20, all buffers used for flow cytometry were filtered through a  $0.22 \cdot \mu$ m-pore-size membrane. In brief, 50  $\mu$ l of cell culture supernatants were incubated for 30 min at room temperature, either alone or in the presence of Triton X-100 (0.05%), EDTA (50 µM) or Tween 20 (15%) as negative controls prior to antibody/probe labelling [36, 38]. Each antibody/probe was incubated in annexin V buffer alone, in the absence of cell culture supernatant to determine the background noise. EVs were characterized according to exposure of exosome-like vesicle markers such as CD9, and phosphatidylserine. For EV labeling, 2.5 µl of fluorescent V450conjugated annexin V (BD Biosciences, CA, USA) and/or 0.25 µg of FITC-conjugated anti-CD9 antibody (Abcam, ON, Canada) were incubated for 30 min in annexin V buffer with the cell culture supernatant at room temperature in a final volume of 200 µl. For all conditions, 15-µm diameter polystyrene microspheres (Polyscience, PA, USA) were added to each tube, and 1,500 beads per sample, determined by fluorescence, were acquired for acquisition normalization, as previously described [39]. Flow cytometry detection was performed using a Fourier optical transformation unit. Data were analyzed with the FloJo program.

#### 2.4.11 Zetasizer Nano-ZS

Size distribution of small particles was analyzed with the Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Ltd., Malvern, United Kingdom) on culture cell supernatants or purified EVs as previously described [40]. This approach uses the Dynamic Light Scattering (DLS) system by measuring Brownian motion of small particles in suspension, which correlates with particle size. Phosphate buffered saline or cell culture medium without EVs were used as negative controls. The data represent the average of two sets of 12–17 measurements, performed at 4°C.

#### 2.4.12 Small RNA purification

Small-sized RNAs (< 100 nt), including miRNAs, were purified from DC2-derived EVs and caput epididymidis. After solubilization of the EV pellet or of the powdered-tissue in lysis buffer, small RNAs were purified using the mirVana TM miRNA Isolation Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendation and following the procedure for small RNA enrichment. Small RNAs were eluted in 50  $\mu$ l of RNAse-free water at 90°C. Small RNA concentration was determined using a NanoDrop 1000 microvolume spectrophotometer.

#### 2.4.13 Reverse transcription and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

The most significant changes detected in transcript and miRNA levels between Control and Dicer1 cKO mice were validated by qRT-PCR using two adapted methodologies.

#### 2.4.14 qRT-PCR on transcripts

Real-time PCR quantification of transcripts differentially expressed in the corpus and cauda was performed to validate the cDNA microarray results. In brief, 200 ng of total RNA extracts were denatured with 2 µg of random primers and 10 mM of each dNTP for 5 min at 65°C and then transferred directly onto ice. After addition of First-Strand Buffer (Life Technologies), 0.2 µM dithiothreitol (Invitrogen), 40 units of RNase inhibitor (Invitrogen) and 200 units of SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies), the mixture was incubated for 10 min at 25°C, 60 min at 42°C and finally 15 min at 70°C. Quantitative RT-PCR was performed on reverse transcribed (RT) templates with specific primers by using the LightCycler FastStart SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). As a first step, temperature gradients and standard curves were performed to determine the optimal annealing temperatures and to assess primer efficiencies for each primer set. Three to four points were used to plot the standard curve. For the qRT-PCR reaction, 0.5  $\mu$ M of specific forward and reverse primers and 4  $\mu$ l of cDNA samples were added to the SYBR Green I master mix (Roche). A negative control performed in absence of RT template (NTC) was included. Samples were incubated at 95°C for 10 min followed by 45 cycles of three amplification steps: 95°C for 10 s, the optimal primer-specific temperature for 10 s and 72°C for 30 s. Samples were denatured at 95°C for 10 s and then cooled to 65°C for 60 s at 20°C per second for melting-curve analysis. Fluorescence signals were continuously collected at 530 nm from 65°C to 95°C, with a temperature change rate of 0.2°C per second. Primers used in this study and their respective characteristics are listed in S1 Table. Each qRT-PCR reaction was performed in duplicate on three biological replicates and normalized to *Gapdh*. Amplified products were resolved on a 2% agarose gel and sequenced to certify specificity of amplification. Results are expressed as relative quantification values based on cycle threshold (Ct) comparison between the different samples, and were analyzed using the Pfaffl method to calculate fold inductions [41].

#### 2.4.15 qRT-PCR on miRNAs

Quantitative RT-PCR of miRNAs differentially expressed in the initial segment/caput epididymidis was performed to validate miRNA microarray results, as previously described [42, 43]. In brief, specific miRNAs present in total RNA extracts were first reverse transcribed using a stem-loop primer. Ten to 15 ng of total RNA extract were denatured with 1 μM of the appropriate stem-loop primer, and 10 mM of each dNTP for 5 min at 65°C and then transferred directly onto ice. After addition of First-Strand Buffer (Life Technologies), 10 mM dithiothreitol (Invitrogen), 4 units of RNase inhibitor (Invitrogen) and 50 units of SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies), the mixture was incubated for 30 min at 16°C, followed by 60 cycles of: 30 s at 30°C, 30 s at 42°C and 1 s at 50°C. A final 5min incubation at 85°C was performed to inactivate the reverse transcriptase. Quantitative RT-PCR was performed with 4  $\mu$ l of cDNA samples added to 0.5  $\mu$ M of forward and universal primer and 4 µl SYBR Green I master mix, for a total volume of 10 µl. A notemplate control was included (NTC) in each PCR reaction. Samples were incubated at 95°C for 5 min followed by 42 cycles of two amplification steps: 95°C for 5 s and 60°C for 10 s. Samples were denatured at 95°C for 10 s and then cooled to 65°C for 60 s at 20°C per second for melting-curve analysis. Fluorescent signals were continuously collected at 530 nm from 65°C to 95°C. All the miRNAs primers used in this study are listed in S2 Table. The qPCRs were performed in duplicate on three biological replicates and normalized to Let7b expression. Amplified products were resolved on a 3.5% agarose gel to confirm the size of the amplified product. Results are expressed as relative quantification values based on cycle threshold (Ct) comparison between the different samples and were analyzed using the Pfaffl method to calculate fold inductions.

#### 2.4.16 Western-blot

Protein extraction from initial segment/caput, corpus and cauda epididymides from control (n=3) and Dicer1 cKO (n=3) mice was done mechanically on ice in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50mM Tris, 0,1% SDS, 1% Triton, 0,5% deoxycolate, 1mM EDTA, pH 7,4). Cell debris was removed by centrifugation at 4°C for 15 minutes. Protein extracts were denatured and reduced by boiling in Laemmli sample buffer at 90 °C for 5 minutes. According to the dynamic range of Zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1, also known as ZAG) and β-actin detection (S3 Fig.), 20µg of proteins were loaded on SDS-PAGE gel of 10% acrylamide and transferred onto cellulose membranes using the Trans-Blot Turbo system (Bio-Rad). Membranes were blocked in 5% milk in PBS containing 0,05% Tween 20 for 1 hour and then incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal antibody against AZGP1 (Antibodies-online Inc. Atlanta, No. ABIN2707262)(1:500) in 5% milk in PBS 1X. After three washes in PBS with 0.05% Tween 20, membranes were incubated with a donkey antirabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase for 1 h at room temperature. After three further washes, antibody binding was detected with the Western Lightning Plus-ECL reagent (PerkinElmer, Inc, Waltham, MA 02451) and the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Quantification of AZGP1 was performed by measuring the band volume intensity with ImageLab system (BioRad) and normalized on  $\beta$ -actin expression.

#### 2.4.17 Immunofluorescence on spermatozoa

Epididymal spermatozoa were collected from the cauda epididymidis by intraluminal perfusion with PBS [44] and treated for immunofluorescence as previously described [45]. After extensive washes in PBS, spermatozoa were fixed in Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative (PLP) for 15 min, permeabilized with 2% Triton X-100 for 15 minutes, washed in PBS, and blocked for 30 min in 1% BSA/PBS. Spermatozoa were incubated overnight at 4 C with polyclonal rabbit antibody against AZGP1 or purified rabbit IgG (negative control), diluted to 5 mg/ml and for 30 minutes at room temperature with Alexafluor 488-conjugated goat anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch

Laboratories), diluted to 2 mg/ml. Peanut agglutinin (PNA) -FITC (Sigma) was added at final concentration of 50µg/ml to label the sperm acrosomal region. After washes in PBS, a drop of sperm suspension was deposited on surperfrost slides (Fisherbrand, Pittsburgh, PA) and counterstained with Vectashied mounting medium containing DAPI. Image acquisition was performed on Olympus IX81-ZDC fluorescent microscope equipped with a Spinning Disc confocal system (Quorum Technologies, Guelph, ON) and Metamorph NX software.

#### 2.4.18 Immunohistochemical staining

Cryosections of 10 µm were prepared from paraffin-embedded epididymal tissues from control (n=3) and Dicer1 cKO (n=3) mice. Following deparaffinization, endogenous peroxidase activity was quenched with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) in methanol for 10 minutes. Sections were washed for 5 minutes in 95 % ethanol and 5 minutes in PBS. Non-specific binding sites were blocked with 10% goat serum in PBS for 1 h. Antibodies against AZGP1 were diluted (1:50) in DAKO (Dako North America, Inc.) and applied overnight at 4<sup>c</sup>C. For control sections, PBS replaced the primary antibodies. Sections were subsequently incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibody for 60 min, and with ABC elite reagent (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, Ca) for 30 min. Immunostaining was revealed using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC). Mayer's haematoxylin solution was used for counterstaining, and mounted under cover slips using an aqueous mounting medium (Sigma). Slides were observed under a Zeiss Axioskop2 Plus microscope linked to a digital camera from Qimaging. Images were captured using the QCapture Pro (Qimaging Instruments).

#### 2.4.19 Statistical analysis

*HS-FCM*. Data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test as post-hoc test with 95% confidence intervals using the GraphPad Prism 5 program. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Each experiment was repeated at least three times.

qRT-PCR on cDNA. Data were analyzed by multiple t-tests corrected for multiple comparisons using the Holm-Sidak method with 95% confidence intervals using the GraphPad Prism 5 program. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Each experiment was repeated on three biological samples/group.

*qRT-PCR on miRNAs*. Data were analyzed by unpaired t-test with 95% confidence intervals using the GraphPad Prism 5 program. Each experiment was repeated on three biological samples/group.

# 2.5 Results

2.5.1 Identification of Dicer1-dependent microRNAs in principal cells from the proximal epididymidis

Principal cells of the epididymis participate in the secretion of EVs, referred to as epididymosomes (For review, [17]). These EVs transport a large diversity of small non-coding RNAs, including miRNAs, and participate in extracellular communication mechanisms between somatic cells and the maturing sperm cells [28, 30, 46]. In order to identify Dicer1-dependent miRNAs that are mainly derived from principal cells of the proximal epididymidis, we performed a comparative microarray analysis of the miRNA profile found in Dicer1 cKO *vs*. control mice.

Analysis of variance analysis performed on these datasets indicates that the miRNA signature is significantly modified in the Dicer1 cKO mouse, with decreased detection of 114 mature miRNAs and increased detection/enrichment of 40 mature miRNA sequences (fold change > 2 or < -2 and p-value < 0.01) (Fig 2.1). Most of these miRNAs are highly conserved as 91% are positively detected by the miRNA probe-sets from more than four distinct organisms. Among murine miRNAs that display highly significant changes (fold change > 2 or < -2 and p-value < 0.01), nine mature miRNAs (*miR-138-5p*, *miR-204-3p*, *miR-425-5p*, *miR-672-5p*, *miR-99b-3p*, *miR-191-5p*, *miR-200c-3p*, *miR-671-3p*, and *miR-652-3p*) were detected with a lower intensity level in Dicer1 cKO mice compared with the control, whereas five miRNAs (*miR-205-5p*, *miR-7019-5p*, *miR-7653-5p*, *miR-466-5p* and *miR-669-5p*) were slightly enriched in the Dicer1 cKO mice (Table 2.1). The mature miRNA most affected by Dicer1 inactivation in principal cells is *miR-138-5p*, as its expression intensity is decreased by a factor of 26 with an intensity level below the threshold of detection in Dicer1 cKO mice.

Contrary to the mature miRNA species, the expression of murine stem-loop precursors is not significantly modified in Dicer1 cKO mice vs. control (fold change > 1.5 or < -1.5, p-value < 0.01), with the exception of *pre-miR-375*, which shows a 1.7-fold downregulation.



Figure 2.1 miRNA signature change in the proximal epididymis region (i.e. initial segment/caput) of Dicer1 cKO mice (A) The different miRNA profiles of Dicer1 cKO and control mice are plotted on the volcano plot according to two-way ANOVA parameters, *i.e.* p-value and fold-change. Only miRNAs with a fold change above 2 and a p-value below 0.01 (red lines) are annotated. (B) Changes in mature miRNA production in Dicer1 cKO were assessed by qRT-PCR. Data represent experimental duplicates on n = 3 biological samples per group and are normalized to Let-7b expression. ns: non-significant, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*p < 0.001.

	MicroRNA	Fold-Change (Dicer1 cKO <i>vs</i> . Ctrl)	P-value (Dicer1 cKO <i>vs</i> . Ctrl)
p in Dicer1 Down in Dicer1 cKO cKO	mmu-miR-138-5p	-26,449	0,00106
	mmu-miR-204-3p	-4,49045	0,00140
	mmu-miR-425-5p	-4,24086	0,00380
	mmu-miR-672-5p	-3,74912	0,00271
	mmu-miR-99b-3p	-2,71028	0,00362
	mmu-miR-191-5p	-2,65916	0,00001
	mmu-miR-200c-3p	-2,57172	0,00340
	mmu-miR-671-3p	-2,47448	0,00744
	mmu-miR-652-3p	-2,14466	0,00837
	mmu-miR-205-5p	2,07404	0,00226
	mmu-miR-7019-5p	2,12703	0,00265
	mmu-miR-7653-5p	2,3651	0,00209
	mmu-miR-466m-5p	3,2093	0,00585
	mmu-miR-669m-5p	3,2093	0,00585

Tableau 2.1 List of murine mature miRNAs displaying a reduced or increased intensity of detection in Dicer1 cKO vs. control (Ctrl) mice

We used qRT-PCR to assess the detection level of eight mature miRNA candidates whose expression intensity is changed in the proximal epididymidis of Dicer1 cKO compared with control mice (Fig 1B). Among these, six miRNAs (*miR-138*, *miR-187*, *miR-375*, *miR-204*, *miR-210* and *miR-672*) are consistently and significantly detected at a lower intensity level (*i.e.*, elevated Cq value or Cq values below the detection threshold) in Dicer1 cKO vs. control mice. At the opposite, *miR-133* and *miR-205* display a significant increased expression level in Dicer1 cKO compared to control group.

# 2.5.2 *miR-210*, *miR-672*, *miR-191* and *miR-204* are secreted from principal cells via extracellular vesicles

Extracellular vesicles secreted by epithelial cells of the epididymis are heterogeneous in terms of size, nucleic acid content, lipid composition, and marker protein exposure [27, 30, 47, 48]. Whereas a significant amount of epididymal fluid can be collected from the intraluminal compartment of large mammalian species by microperfusion, epididymal fluid retrieval from the proximal mouse epididymis is challenging and the yield is insufficient for

Rapport-gratuit.com Le numero 1 mondial du mémoires

downstream analyses. In our study we used the previously characterized DC2 epididymal cell line [35, 49] to 1) isolate and "characterize" EVs secreted by principal cells of the proximal epididymis and to 2) determine the route of secretion of Dicer1-dependent miRNAs (Fig 2.2A).



**Figure 2.2 Secretion of Dicer1-dependent miRNAs from DC2 cells via extracellular vesicles (EVs)(A)** Schematic view of DC2 derived EVs analysis. DC2 cells were cultured, labelled with CMFDA dye and stimulated with calcium ionophore to induce EVs production. EVs were characterized according to i) their surface antigens (*e.g.* CD9 marker, phosphatidylserine (PS) by flow cytometry, and to ii) their miRNA content by RT-PCR. (**B**) Detection of *Cftr* (principal cell marker) and *Atp6v1b1* (B1 V-ATPase subunit, clear cell marker) in cauda epididymis and DC2 cell line extracts by end-point PCR. Immunostaining for cytokeratin (green) on DC2 cells. Nuclei were counterstained with DAPI. (**C**) Size

distribution of EVs released from DC2 cells in culture measured in a Zetasizer. This plot is representative of acquisitions performed twice on three distinct biological replicates. (**D**) Detection of CMFDA-positive EVs released from CMFDA-labeled DC2 cells by High-Sensitivity Flow Cytometry (HS-FCM). Supernatants from DC2 cells stimulated or not with 1  $\mu$ M calcium ionophore for 30 min or 24 h were analyzed by HS-FCM for EV detection after annexin V (phosphatidylserine detection) and CD9 labeling. Controls include Triton X-100 0.05% that solubilizes most membranous particles, and EDTA 50  $\mu$ M that inhibits annexin V labelling. (**E**) Detection of Dicer1-dependent miRNAs in DC2-derived EVs by end-point PCR in cells, whole tissue, and extracellular medium extracts. CM: culture medium; EVs: purified extracellular vesicles; DC2: culture medium-free DC2 cells; WE: whole epididymis; NTC: no-template control.

As shown by immunofluorescent staining (Fig 2.2B), DC2 cells are positive for cytokeratin protein, a marker of epithelial cells. In addition, these cells express the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (Cftr) principal cell marker and are negative for the B1 subunit of the V-ATPase (Atp6v1b1) clear cell marker (Fig 2.2B)[49]. This confirms that DC2 cells maintain their differentiated cell features under the culture conditions used in our study. As assessed by zetasizer analysis, the size distribution of particles released from DC2 cells after 24 h in culture falls between the range of 90–400 nm, with a mean peak at 192.2  $\pm$  32.06 (diameter nm  $\pm$  standard deviation) (Fig 2.2C). This size distribution aligns with the size range previously assessed by electron microscopy for epididymosomes collected from epididymal tissue [48]. In order to further define the properties of the small particles released from DC2 cells, we used HS-FCM to examine the presence of specific EV markers (i.e. phosphatidylserine exposure and CD9 exosomal marker detection) and determined their membrane susceptibility to detergents (Figs 2.2A,D). Since HS-FCM is a highly-sensitive detection method, we pre-stained DC2 cells with CMFDA Cell Tracker Green in order to limit the detection of non-specific particles. In addition, all experiments were performed on DC2 cells cultured with medium containing EV-depleted FBS (refer to Material and Methods section). In the non-stimulated control condition, the concentration of CMFDA/annexin Vpositive EVs and CMFDA/CD9-positive EVs was approximately 700 EVs and 350 EVs per  $\mu$ l of cell culture supernatant (Fig 2.2D). Both EV subpopulation concentrations significantly increased after 24 h of treatment in the presence of 1  $\mu$ M calcium ionophore, with fold increases of 4.2 and 3.5, respectively. Of importance was the observance of 90–95% cell viability after 24 h of treatment with the calcium ionophore (not shown), which suggests that apoptotic bodies were not major components measured in DC2 cell culture supernatants. In addition, EV solubilization by detergent (Triton X-100, 0.05% and Tween 20, 15%) and calcium chelation by EDTA, which inhibits annexin V binding, significantly decreased CMFDA/annexin V-positive and CMFDA/CD9-positive EV concentration.

We next verified the susceptibility of Dicer1-dependent miRNAs to be released from principal cells via EVs. To this end, we isolated EVs derived from DC2 cells, and collected medium-free DC2 cells. The respective miRNA content of these samples was analyzed by end-point PCR (Fig 2.2E). Among Dicer1-dependent miRNAs investigated (Fig 2.1), *miR-138* and *miR-375* were detected in both DC2 cell extracts and whole epididymis control tissue, whereas these miRNAs were undetected in EV extracts. Conversely, *miR-210*, *miR-672* and *miR-191* and *miR-204* were present in both cell and EV extracts, suggesting the presence of a selective mechanism of miRNA secretion from principal cells of the epididymis.

# 2.5.3 Gene expression pattern is altered in the corpus and cauda epididymidis from Dicer1 cKO mice

Segmented gene expression in the epididymis is regulated by several factors, including hormones, transcription factors and paracrine factors [21, 50]. In this study, we provide evidence that the production of some miRNAs is reduced in the Dicer1 cKO mouse model, and that epididymal principal cells from the proximal epididymis secrete some of these miRNA *in vitro*. To assess whether Dicer1-dependent factors, including miRNAs, could act as paracrine factors in the control of epididymal gene expression, we performed a comparative microarray analysis on gene expression patterns found in the corpus and cauda regions of Dicer1 cKO *vs*. control mice. Segment-specific expression of transcripts (*e.g.* members of the Defensin family) and miRNAs (*e.g. miR-204-5p and miR-196*) along the epididymis of control and Dicer1-cKO mice validated the purity of the tissue analysed (S4 Fig.). Analysis of variance performed on these datasets indicates that the expression level of 141 genes is significantly changed (p < 0.001) in the distal regions of the Dicer1 cKO epididymis. Among the significantly changed genes, 35 up- and down- regulated genes (2 and 31, respectively) in the cauda epididymidis of Dicer1 cKO are

displayed (Fig 2.3A, right panel). Of importance is that none of the most significant changes identified by ANOVA overlap between the corpus and the cauda epididymis, suggesting that these two epididymal regions respond distinctly to Dicer1-dependent factors. *Pate4*, *Azgp1*, *Pdcl2 and Oxct2b* are four genes encoding the prostate and testis expressed 4 protein, the Zn-alpha 2-glycoprotein, Phosducin-like protein 2 and Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 2B, respectively. According to microarray analysis, these genes display a significant fold change in expression that has been validated by qRT-PCR (Fig 2.3B, C).

The consequence of Dicer1 invalidation on AZGP1 protein expression was assessed by western-blot and immunohistochemistry in control and Dicer1 cKO mice (Figs 2.4). A unique band corresponding to the glycosylated form of AZGP1 (48 KDa [51]) was detected in mouse epididymal tissue extracts by western-blot (S3 Fig.). Protein quantification indicated a significant six-fold increase of AZGP1 detection from the cauda epididymidis of Dicer1 cKO compared to control mice (Fig 2.4A). Protein expression of AZGP1 displayed a regionalized pattern of expression as evidenced by immunohistochemistry performed on longitudinal sections of control and Dicer1 cKO mouse epididymides (Fig 2.4B,C). For instance AZGP1 is highly expressed in the initial segment/caput epididymis, in apparently all cell types of the epithelium in control and Dicer1 cKO mice (Fig 2.4B,C<sub>a</sub>), and is undetectable in negative controls (Fig 2.4C<sub>act</sub>). While its expression level in the cauda epididymidis of Dicer1 cKO mice (Fig 2.4B,C<sub>a</sub>), which is in agreement with AZGP1 quantification measured by western-blot.



**Figure 2.3 Impact of Dicer1-dependent factors on epididymal gene expression (A)** Transcripts with the most significantly altered expression in the corpus (left) or the cauda (right) epididymidis of the Dicer1 cKO mouse model are displayed on heat maps. Significance threshold: fold change > 2 or < -2, p-value < 0.002. n = 3 mice per group. (B) Relative Log 2 intensity levels of Prostate and testis expressed 4 (*Pate4*), Zinc-alpha-2glycoprotein (*Azgp1*), Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 2B (*Oxct2b*), and Phosducin-like protein 2 (*Pdcl2*) in the corpus and cauda epididymidis of Dicer1 cKO and control mice after microarray analyses on n = 3 biological samples per group. (C) Expression changes of *Pate4*, *Azgp1*, *Oxct2b and Pdcl2* were validated by qRT-PCR in the caput, corpus and cauda regions from control and Dicer1 cKO mice. qRT-PCR data shown as means and standard deviations of results obtained from n = 3 biological samples per group after normalization to *Gapdh* expression. Unpaired t-test corrected for multiple comparison using the Holm-Sidak method. ns: non significant, \*p<0.05, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.



Figure 2.4 Protein Expression level of Zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1) in the epididymis of Dicer1 cKO and control mice(A) Relative quantification of AZGP1 protein in the cauda epididymis of Dicer1 cKO and control mice by western blot. Statistical significance was assessed by Student t-test from n=3 replicates per group. (B) Longitudinal section of a mouse epididymis from a Dicer1 cKO mouse stained by immunohistochemistry for AZGP1. Image taken at 2.5 X. *Fp*: Fat pad. (C) Immuno-detection of AZGP1 on the proximal caput (a, b), distal caput (c, d), corpus (e, f) and cauda (g, h) epididymidis of control (a, c, e, g) and Dicer1 cKO (b, d, f, h) mice. Bar = 200  $\mu$ m. Negative controls in absence of primary antibody are shown in insets (a', c', e', g'). Bar = 250  $\mu$ m.

While AZGP1 is detected at a high level within the epididymal epithelium (Fig 2.4), this secreted glycoprotein might also interact with the maturing sperm cells in the epididymis. In order to assess this possible interaction, we detected AZGP1 by immunofluorescence on spermatozoa from the cauda epididymis of wild-type mice (Fig 2.5). A strong signal was observed for AZGP1 on the sperm equatorial segment, below the PNA-stained acrosomal region (Fig 2.5, top panel), and was absent in the isotype control condition (Fig 2.5, Ctrl). As assessed by confocal microscopy on low magnification pictures (Fig 2.5, bottom panel + AZGP1), the proportion of spermatozoa positive for AZGP1 is between 85-95%.

2.5.4 *In silico* analysis of gene expression changes observed in the distal epididymidis of Dicer1 cKO mice

According to *in silico* target prediction, several Dicer1-dependent miRNAs could potentially bind to and regulate target mRNA whose expression in significantly modified in Dicer1 cKO mice (Table 2.2). For instance, among Dicer1-dependent miRNAs, miR-210, miR-204, miR-672, miR-191 and miR-296 are predicted to regulate 13 distinct transcripts whose expression is significantly modified in the corpus or cauda epididymidis of Dicer1 cKO mice. These transcripts encode proteins involved in lipid metabolism (*e.g.* Free fatty acid receptors 4/5, AZGP1), cytoskeleton formation (*e.g.* Cytokeratin 19 and Beta-tubulin), calcium transportation (*e.g.* PATE4, Calcium-activated chloride channel regulator 2), and transcription factors (*e.g.* B-cell lymphoma 3 protein, Myeloid cell nuclear differentiation antigen).



Figure 2.5 Localization of Zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1) on spermatozoa from wild type mice Sperm acrosomal region and nuclei were labelled with Peanut agglutinin lectin (PNA) and DAPI, respectively. Pictures were taken at 100X (top) and 20X (bottom) after immunostaining in the presence (+ AZGP1) or absence (Ctrl, - AZGP1) of antibody against AZGP1. Bars = 5  $\mu$ m (top) and 20  $\mu$ m (bottom).

Since miRNAs are not the only Dicer1- dependent factors that could trigger gene expression changes observed in the distal region of Dicer1 cKO mice, we performed a more exhaustive *in silico* analysis on whole transcript microarrays by using dedicated bioinformatics tools (*i.e.* Ingenuity Pathway Analysis (IPA), GSEA, ClueGO). Several pathways or functions have been highlighted in the distinct epididymal regions.

miDNA condidatos	Predicted target genes	Complete gene name	Software		
mikina candidates			Targetscan	Microcosm	IPA*
mmu-miR-191-3p	Clca2	Calcium-activated chloride channel regulator 2	х		
mmu-miR-191-3p	Prmt8	Protein arginine N-methyltransferase 8		х	
mmu-miR-191-3p	Mnda	Interferon-activable protein 205-B		х	
mmu-miR-204-5p	Pate4	Prostate and testis expressed protein 4			х
mmu-miR-204-5p	Krt19	Keratin, type I cytoskeletal 19	х		
mmu-miR-204-5p	Ffar4	Free fatty acid receptor 4	х		
mmu-miR-210-5p	Pate4	Prostate and testis expressed protein 4	х		
mmu-miR-210-5p	Lrrc18	Leucine-rich repeat-containing protein 18	х		
mmu-miR-210-5p	Bcl3	B-cell lymphoma 3 protein		х	
mmu-miR-210-5p	Tubb6	Tubulin beta-6 chain		х	
mmu-miR-296-3p	Azgp1	Zinc-alpha-2-glycoprotein		х	
mmu-miR-672-3p	Ffar4	Free fatty acid receptor 5	х		
mmu-miR-672-3p	Mcm5	DNA replication licensing factor MCM5	х		
mmu-miR-672-3p	Theg	Testicular haploid expressed gene protein	x	x	

Tableau 2.2 Association of target genes predicted to be regulated by miRNAs candidates

Only miRNAs and transcripts displaying significant expression changes (P<0.02 and P<0.05, respectively) in Dicer1-cKO mice compared to Control are shown. The distinct softwares used for *in silico* target prediction are indicated.

\* *In silico* prediction performed by using the Ingenuity Upstream Regulator Analysis in IPA. The analytical tool is based on prior knowledge of expected effects between transcriptional regulators and their target genes stored in the Ingenuity® Knowledge Base

Immune dysfunction (corpus)

According to IPA analysis performed on genes with significantly changed expression levels in the corpus epididymidis (fold-change > 1.5, p-value < 0.01), 18 networks encompassing 4 or more modulated genes were identified from 426 probe-sets. Among the top-10 networks (S5 Fig.), candidates associated with inflammatory functions and defence mechanisms were prominently associated with this epididymal region. These biological pathways were also confirmed by other bioinformatics programs such as GSEA and ClueGO. The latter identify inflammatory and immune defence responses as the most significantly altered functions in the corpus epididymidis of Dicer1 cKO mice. In addition, network analysis performed with more stringent parameters (fold-change > 2 and p-value < 0.001) on 24 probe-sets, sheds light on the alteration seen in the Dicer1 cKO epididymides with the "lipid metabolism, small molecule biochemistry, cell-to-cell signalling and interaction" networks highlighted (S6 Fig.). One of these networks involves *Pate4*, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine molecules.

#### Epigenetics regulation (corpus)

Upstream Regulator Analysis (URA) performed on our datasets, identified molecules located upstream of the changed genes to potentially explain the observed expression changes. We focused our study on the transcription factors and miRNAs that are potential modulators of gene expression in our model. According to this analysis, the corpus epididymis is significantly enriched with upstream regulators (UR) with elevated z-scores. Among the most significant URs, we identified 4 regulators associated with epigenetic control (*i.e.* histone deacetylases 1 and 2 (HDAC1 and HDAC 1), lysine (K)-specific demethylase 5B (KDM5B), and tripartite motif-containing 24 (TRIM24)). Furthermore, we identified 25 miRNAs with a significant UR potential (z-score > 2), including *miR-200* and *miR-204*-two miRNAs predicted to target and regulate the *Pate4* expression level. As shown in Fig 2E, *miR-204* is present in EVs derived from DC2 epididymal cells *in vitro*.

Sperm motility and physiopathologies of the male reproductive system (cauda)

Among the top ten networks that are significantly modified in the cauda epididymidis of Dicer1 cKO compared to control mice (S7 Fig.), "Reproductive system Disease" pathway displays the highest significance score, and encompasses a total of 29 transcripts. Interactions between the molecules involved in this pathway are displayed in Fig 2.6 and include AZGP1, which is shown as a regulator of downstream Akt signalling pathway. In addition, male reproductive and sperm motility dysfunctions display an important redundancy among pathways modified in the cauda epididymidis (not shown), which is in accordance with the reduced sperm motility and male infertility phenotypes observed in the Dicer1 cKO mouse model [5, 34].

Rapport-grastuit.com ( LE NUMERO I MONDIAL DU MÉMOIRES



Figure 2.6 The "Reproductive system disease" network is the most significantly modified in the cauda epididymis of Dicer1 CKO compared to control mice according to Ingenuity Pathway Analysis (IPA) analysis Only probe-sets displaying a fold change >1.5 and a p-value <0.01 were considered

# 2.6 Discussion

In most–if not all–biological fluids, EVs and their cargo participate in well-orchestrated mechanisms of intercellular communication to control organ/systems physio-pathological conditions [8, 52, 53]. While such a long-distance signalling process is challenging to assess

in the circulatory system, the epididymis represents an ideal enclosed and well-regulated model system to decipher the role of extracellular factors *in vivo*. In the present study we investigated the role of Dicer1-dependent factors, including miRNAs, in the paracrine regulation of epididymal genes by using the previously described *Defb41*<sup>across</sup>;*Dicer1*<sup>mf</sup>(Dicer1 cKO)mousemodel [5, 34].

In this genetically modified mouse model, the enzyme Dicer1 has been conditionally inactivated in the principal cells of the initial segment/caput epididymidis. This allowed the detection of 114 Dicer1-dependent miRNAs that have matured in this specific cell type, as they are significantly reduced or absent in the Dicer1 cKO vs. control. However, since miRNAs are ubiquitously present in whole epididymis extracts, *i.e.* in sperm cells and somatic cells from both the epithelium and the connective tissue [54, 55], it is possible that we have underestimated the number of Dicer1-dependent miRNAs produced specifically by principal cells. Furthermore, whereas miRNA maturation predominantly occurs via a Dicer1-mediated canonical process, other Dicer1-independent routes of maturation exist and are not considered in our approach [56]. Despite these limitations, 9 mature miRNAs exhibited significant and markedly reduced expression levels, including *miR-204*, a miRNA found particularly enriched in the proximal mouse epididymis [55] and *miR-138-5p*, a potential tumor suppressor that inhibits *cyclin D1 (Ccnd1)* expression [57].

As one miRNA can target up to several hundred mRNAs for degradation [2], we expected that Dicer1-dependent decrease/suppression of several miRNAs in the epididymis could have a profound impact on gene expression levels. Indeed, our results demonstrated significant region-specific changes in genes such as *nitric oxide synthase 1 (Nos1)* and *testis expressed 13A (Tex13a)* that usually show consistent levels of expression along the epididymis of wild type mice. This suggests that Dicer1–dependent factors derived from the proximal epididymis, could control gene expression levels in the distal epididymal regions in a paracrine-like manner. While it is tempting to link impairment of miRNA maturation with gene expression changes, we cannot exclude that other Dicer1-dependent factors, such as somatic endogenous small interfering RNAs (endo-siRNAs) may be involved in post-transcriptional gene regulation [58]. Furthermore, according to studies showing the role

of DICER1 as a mRNA and long non-coding RNA binding protein as well as a nuclear factor in charge of heterochromatin formation [61, 62], its direct or indirect effect on miRNAindependent gene expression is also plausible.

Dicer1 deletion also triggered significant enrichment of some miRNAs in the IS/caput epididymis. Considering that 1) deletion of Dicer1 only occurs in the principal cells of the epididymis and that 2) whole epididymis extracts were used in our study, Dicer1 is still present/active in other epithelial cell types and stromal cells. As a consequence, some Dicer1–dependent miRNAs may be over-represented in Dicer1 cKO compared to control mice. A compensatory mechanism from Dicer1 expressed in adjacent tissues (*e.g.* efferent ducts) is also possible [5]. The explanation for the miRNA enrichment observed in Dicer1 cKO might therefore be a combination of these factors.

Since principal cells are specialized in the secretion of EVs called epididymosomes that transport a wide array of small non-coding RNAs [28, 30], we hypothesized that Dicer1dependent miRNAs could be secreted via EVs and internalized by downstream target cells to control gene expression. To assess this hypothesis, we investigated the presence of Dicer1dependent miRNAs in EVs derived from epididymal principal cells (DC2 cells) in vitro. We first showed that DC2 cells secrete EVs in the 90-400 nm size range that possess markers associated with distinct EV populations and/or functions. For instance, as previously shown in the epididymal fluid [27, 36], populations of DC2-derived EVs expose the CD9 antigen, a marker of exosomes [63], and phosphatidylserine (PS), a phospholipid also present on exosomes and microparticles. Exposure of PS on EVs mediates intercellular communication through binding to milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8/SED-1) localized on recipient cells [64]. This glycoprotein is localized on the sperm surface and on epididymal epithelial cells and participates in epididymal fluid homeostasis [65-67]. Even if it has to be kept in mind that immortalized cell lines do not behave alike primary cells [68], DC2 cells share common features with principal cells of the epididymis regarding EV and miRNA production. For instance, DC2-derived EVs possess recognition molecules known to be important to intercellular communication, and DC2 cells express some miRNA candidates also found in epididymal principal cells (e.g. miR-210, miR-672, miR-191, miR-204). These miRNAs being secreted via DC2-derived EVs, they constitute potential candidates in the paracrine regulation of epididymal gene expression.
The comprehensive bioinformatics analysis of these microarray data indicated a potential association between proximal Dicer1-dependent miRNAs and distal gene expression /biological pathways (Table 2). For instance, miR-204 is a secreted miRNA predicted to target the *Pate4* transcript and other associated genes that are involved in the control of sperm motility. *Pate4* belongs to a gene family that is predominantly expressed in the epididymis and is proposed to interact with spermatozoa to modulate their motility, capacitation and acrosome reaction [69, 70]. Therefore, Pate4 and miR-204 are interesting targets that couldat least in part-explain the reduced motility phenotype observed in Dicer1 cKO mice [34]. In addition, we showed that AZGP1 is a glycoprotein highly expressed in a regionalized manner along the mouse epididymis, and that is localized on the sperm equatorial region. Our results indicate that AZGP1 expression is significantly increased in the cauda epididymidis of Dicer1 cKO at both the transcriptional and protein levels. This protein participating to the control of sperm forward motility[71], its deregulation in the epididymis by Dicer1-dependent factors including miR-296 might also have consequences on sperm motility. Both PATE4 and AZGP1 being proteins secreted into the extracellular environment, they might thus constitute appealing targets for the non-invasive diagnosis of male infertility.

In conclusion, epithelial cells of the epididymis are specialized cells that communicate with each other in order to control the environment surrounding sperm during their maturation. In our study, we showed that Dicer1-dependent factors from the proximal epididymis, including miRNAs, (1) are released from principal cells of the epididymis and (2) impact, either directly or via alteration of pronounced changes in epididymal functions (*e.g.* epithelial dedifferentiation, abnormal lipid homeostasis), the profiles of epididymal gene expression in the downstream regions. While further *in vivo* studies will be required to unravel the complete extracellular vesicular and miRNA cargo signalling system in the epididymis, our study sheds light on new molecular candidates that may be important in the control of male fertility.

## 2.7 Bibliographie

1. Mello CC. Return to the RNAi world: rethinking gene expression and evolution (Nobel Lecture). Angewandte Chemie. 2007;46(37):6985-94. doi: 10.1002/anie.200701713.

2. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 2009;136(2):215-33. Epub 2009/01/27. doi: S0092-8674(09)00008-7 [pii] 10.1016/j.cell.2009.01.002.

3. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol. 2009;11(3):228-34. doi: 10.1038/ncb0309-228.

4. Korhonen HM, Meikar O, Yadav RP, Papaioannou MD, Romero Y, Da Ros M, et al. Dicer is required for haploid male germ cell differentiation in mice. PLoS One. 2011;6(9):e24821. Epub 2011/09/29. doi: 10.1371/journal.pone.0024821 PONE-D-11-12538 [pii].

5. Björkgren I, Saastamoinen L, Krutskikh A, Huhtaniemi I, Poutanen M, Sipilä P. Dicer1 ablation in the mouse epididymis causes dedifferentiation of the epithelium and imbalance in sex steroid signaling. PLoS One. 2012;7(6):e38457. Epub 2012/06/16. doi: 10.1371/journal.pone.0038457 PONE-D-12-02487 [pii].

6. Wu J, Bao J, Kim M, Yuan S, Tang C, Zheng H, et al. Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(28):E2851-7. doi: 10.1073/pnas.1407777111.

7. Romero Y, Meikar O, Papaioannou MD, Conne B, Grey C, Weier M, et al. Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. PLoS One. 2011;6(10):e25241. doi: 10.1371/journal.pone.0025241.

8. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borras FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J Extracell Vesicles. 2015;4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.

9. Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, Wiese CB, Shoucri BM, Lambert G, et al. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. Nat Commun. 2014;5:3292. Epub 2014/03/01. doi: ncomms4292 [pii] 10.1038/ncomms4292.

10. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nat Cell Biol. 2011;13(4):423-33. Epub 2011/03/23. doi: ncb2210 [pii] 10.1038/ncb2210.

11. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(12):5003-8. Epub 2011/03/09. doi: 1019055108 [pii] 10.1073/pnas.1019055108.

12. Thery C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. F1000 Biol Rep. 2011;3:15. Epub 2011/08/31. doi: 10.3410/B3-15 15 [pii].

13. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007;9(6):654-9. Epub 2007/05/09. doi: ncb1596 [pii] 10.1038/ncb1596.

14. Crescitelli R, Lasser C, Szabo TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. J Extracell Vesicles. 2013;2. doi: 10.3402/jev.v2i0.20677.

15. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clin Chem. 2010;56(11):1733-41. Epub 2010/09/18. doi: clinchem.2010.147405 [pii] 10.1373/clinchem.2010.147405.

16. Hoog JL, Lotvall J. Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryoelectron microscopy. J Extracell Vesicles. 2015;4:28680. doi: 10.3402/jev.v4.28680.

17. Sullivan R. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. Asian J Androl. 2015;17(5):726-9. doi: 10.4103/1008-682X.155255.

18. Ronquist G. Prostasomes are mediators of intercellular communication: from basic research to clinical implications. Journal of internal medicine. 2012;271(4):400-13. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02487.x.

19. Ronquist GK, Larsson A, Stavreus-Evers A, Ronquist G. Prostasomes are heterogeneous regarding size and appearance but affiliated to one DNA-containing exosome family. The Prostate. 2012;72(16):1736-45. doi: 10.1002/pros.22526.

20. Orgebin-Crist MC. Studies on the function of the epididymis. Biol Reprod. 1969;1:Suppl 1:155-75.

21. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. Hum Reprod Update. 2009;15(2):213-27. Epub 2009/01/13. doi: dmn055 [pii] 10.1093/humupd/dmn055.

22. Cooper TG. Epididymis and sperm function. Andrologia. 1996;28 Suppl 1:57-9.

23. Sullivan R, Saez F. Epididymosomes, prostasomes and liposomes; their role in mammalian male reproductive physiology. Reproduction. 2013. Epub 2013/04/25. doi: REP-13-0058 [pii] 10.1530/REP-13-0058.

24. Caballero J, Frenette G, D'Amours O, Belleannee C, Lacroix-Pepin N, Robert C, et al. Bovine sperm raft membrane associated Glioma Pathogenesis-Related 1-like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. J Cell Physiol. 2012. Epub 2012/05/04. doi: 10.1002/jcp.24099.

25. Suryawanshi AR, Khan SA, Joshi CS, Khole VV. Epididymosome-mediated acquisition of MMSDH, an androgen-dependent and developmentally regulated epididymal sperm protein. J Androl. 2012;33(5):963-74. Epub 2011/12/31. doi: jandrol.111.014753 [pii] 10.2164/jandrol.111.014753.

26. Krapf D, Ruan YC, Wertheimer EV, Battistone MA, Pawlak JB, Sanjay A, et al. cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. Dev Biol. 2012;369(1):43-53. Epub 2012/07/04. doi: S0012-1606(12)00346-6 [pii] 10.1016/j.ydbio.2012.06.017.

27. Caballero JN, Frenette G, Belleannee C, Sullivan R. CD9-Positive Microvesicles Mediate the Transfer of Molecules to Bovine Spermatozoa during Epididymal Maturation. PLoS One. 2013;8(6):e65364. Epub 2013/06/21. doi: 10.1371/journal.pone.0065364 PONE-D-12-35273 [pii].

28. Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. Science. 2015. doi: 10.1126/science.aad6780.

29. Belleannée C, Légaré C, Calvo E, Thimon V, Sullivan R. microRNA signature is altered in both human epididymis and seminal microvesicles following vasectomy. Hum Reprod. 2013. Epub 2013/03/30. doi: det088 [pii] 10.1093/humrep/det088.

30. Belleannée C, Calvo E, Caballero J, Sullivan R. Epididymosomes Convey Different Repertoires of MicroRNAs Throughout the Bovine Epididymis. Biol Reprod. 2013. Epub 2013/06/28. doi: biolreprod.113.110486 [pii] 10.1095/biolreprod.113.110486.

31. Comazzetto S, Di Giacomo M, Rasmussen KD, Much C, Azzi C, Perlas E, et al. Oligoasthenoteratozoospermia and infertility in mice deficient for miR-34b/c and miR-449 loci. PLoS genetics. 2014;10(10):e1004597. doi: 10.1371/journal.pgen.1004597.

32. Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. PLoS One. 2008;3(3):e1738. doi: 10.1371/journal.pone.0001738.

33. Maatouk DM, Loveland KL, McManus MT, Moore K, Harfe BD. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. Biol Reprod. 2008;79(4):696-703. doi: 10.1095/biolreprod.108.067827.

34. Björkgren I, Gylling H, Turunen H, Huhtaniemi I, Strauss L, Poutanen M, et al. Imbalanced lipid homeostasis in the conditional Dicer1 knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2014. doi: 10.1096/fj.14-259382.

35. Araki Y, Suzuki K, Matusik RJ, Obinata M, Orgebin-Crist MC. Immortalized epididymal cell lines from transgenic mice overexpressing temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. J Androl. 2002;23(6):854-69.

36. Rousseau M, Belleannee C, Duchez AC, Cloutier N, Levesque T, Jacques F, et al. Detection and quantification of microparticles from different cellular lineages using flow cytometry. Evaluation of the impact of secreted phospholipase A2 on microparticle assessment. PLoS One. 2015;10(1):e0116812. doi: 10.1371/journal.pone.0116812.

37. Shelke GV, Lasser C, Gho YS, Lotvall J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. J Extracell Vesicles. 2014;3. doi: 10.3402/jev.v3.24783.

38. Osteikoetxea X, Sodar B, Nemeth A, Szabo-Taylor K, Paloczi K, Vukman KV, et al. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. Organic & biomolecular chemistry. 2015;13(38):9775-82. doi: 10.1039/c5ob01451d.

39. Cloutier N, Tan S, Boudreau LH, Cramb C, Subbaiah R, Lahey L, et al. The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. EMBO molecular medicine. 2013;5(2):235-49. doi: 10.1002/emmm.201201846.

40. Hubert A, Subra C, Jenabian MA, Tremblay Labrecque PF, Tremblay C, Laffont B, et al. Elevated Abundance, Size, and MicroRNA Content of Plasma Extracellular Vesicles in Viremic HIV-1+ Patients: Correlations With Known Markers of Disease Progression. Journal of acquired immune deficiency syndromes. 2015;70(3):219-27. doi: 10.1097/QAI.00000000000756.

41. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45.

42. Jerczynski O, Lacroix-Pépin N, Boilard E, Calvo É, Fortier M, Björkgren I, et al. Role of Dicerldependent microRNAs in the paracrine control of epididymal gene expression. PLoS One. 2016.

43. Varkonyi-Gasic E, Hellens RP. qRT-PCR of Small RNAs. Methods Mol Biol. 2010;631:109-22. Epub 2010/03/06. doi: 10.1007/978-1-60761-646-7 10.

44. Belleannée C, Da Silva N, Shum WW, Brown D, Breton S. Role of purinergic signaling pathways in V-ATPase recruitment to apical membrane of acidifying epididymal clear cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2010;298(4):C817-30. Epub 2010/01/15. doi: ajpcell.00460.2009 [pii] 10.1152/ajpcell.00460.2009.

45. D'Amours O, Frenette G, Bordeleau LJ, Allard N, Leclerc P, Blondin P, et al. Epididymosomes Transfer Epididymal Sperm Binding Protein 1 (ELSPBP1) to Dead Spermatozoa During Epididymal Transit in Bovine. Biol Reprod. 2012. Epub 2012/08/10. doi: biolreprod.112.100990 [pii] 10.1095/biolreprod.112.100990.

46. Hermo L, Jacks D. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. Mol Reprod Dev. 2002;63(3):394-410.

47. Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux JM, et al. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. Biol Reprod. 2006;74(6):1104-13.

48. Girouard J, Frenette G, Sullivan R. Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. Int J Androl. 2011;34(5 Pt 2):e475-86. Epub 2011/08/31. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01203.x.

49. Ruan YC, Shum WW, Belleannee C, Da Silva N, Breton S. ATP secretion in the male reproductive tract: essential role of CFTR. J Physiol. 2012;590(Pt 17):4209-22. Epub 2012/06/20. doi: jphysiol.2012.230581 [pii] 10.1113/jphysiol.2012.230581.

50. Belleannée C, Thimon V, Sullivan R. Region-specific gene expression in the epididymis. Cell Tissue Res. 2012. Epub 2012/03/20. doi: 10.1007/s00441-012-1381-0.

51. Shrimal S, Gilmore R. Glycosylation of closely spaced acceptor sites in human glycoproteins. J Cell Sci. 2013;126(Pt 23):5513-23. doi: 10.1242/jcs.139584.

52. Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(2):186-92. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300139.

53. Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13(5):328-35. Epub 2012/04/19. doi: nrm3335 [pii] 10.1038/nrm3335.

54. Nixon B, Stanger SJ, Mihalas BP, Reilly JN, Anderson AL, Tyagi S, et al. The microRNA signature of mouse spermatozoa is substantially modified during epididymal maturation. Biol Reprod. 2015;93(4):91. doi: 10.1095/biolreprod.115.132209.

55. Nixon B, Stanger SJ, Mihalas BP, Reilly JN, Anderson AL, Dun MD, et al. Next Generation Sequencing Analysis Reveals Segmental Patterns of microRNA Expression in Mouse Epididymal Epithelial Cells. PLoS One. 2015;10(8):e0135605. doi: 10.1371/journal.pone.0135605.

56. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. Nature. 2010;465(7298):584-9. doi: 10.1038/nature09092.

57. Liu X, Lv XB, Wang XP, Sang Y, Xu S, Hu K, et al. MiR-138 suppressed nasopharyngeal carcinoma growth and tumorigenesis by targeting the CCND1 oncogene. Cell Cycle. 2012;11(13):2495-506. doi: 10.4161/cc.20898.

58. Zimmermann C, Romero Y, Warnefors M, Bilican A, Borel C, Smith LB, et al. Germ cell-specific targeting of DICER or DGCR8 reveals a novel role for endo-siRNAs in the progression of mammalian spermatogenesis and male fertility. PLoS One. 2014;9(9):e107023. doi: 10.1371/journal.pone.0107023.

59. Juang BT, Gu C, Starnes L, Palladino F, Goga A, Kennedy S, et al. Endogenous nuclear RNAi mediates behavioral adaptation to odor. Cell. 2013;154(5):1010-22. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.006.

60. Yuan S, Schuster A, Tang C, Yu T, Ortogero N, Bao J, et al. Sperm-borne miRNAs and endosiRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. Development. 2016;143(4):635-47. doi: 10.1242/dev.131755.

61. Djupedal I, Ekwall K. Epigenetics: heterochromatin meets RNAi. Cell Res. 2009;19(3):282-95. doi: 10.1038/cr.2009.13.

62. Rybak-Wolf A, Jens M, Murakawa Y, Herzog M, Landthaler M, Rajewsky N. A variety of dicer substrates in human and C. elegans. Cell. 2014;159(5):1153-67. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.040.

63. Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. Current opinion in cell biology. 2014;29C:116-25. doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004.

64. Borisenko GG, Iverson SL, Ahlberg S, Kagan VE, Fadeel B. Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) binds to oxidized phosphatidylserine: implications for macrophage clearance of apoptotic cells. Cell death and differentiation. 2004;11(8):943-5. doi: 10.1038/sj.cdd.4401421.

65. Raymond AS, Elder B, Ensslin M, Shur BD. Loss of SED1/MFG-E8 results in altered luminal physiology in the epididymis. Mol Reprod Dev. 2010;77(6):550-63. doi: 10.1002/mrd.21189.

66. Raymond A, Ensslin MA, Shur BD. SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions. J Cell Biochem. 2009;106(6):957-66. doi: 10.1002/jcb.22076.

67. Shur BD, Ensslin MA, Rodeheffer C. SED1 function during mammalian sperm-egg adhesion. Current opinion in cell biology. 2004;16(5):477-85.

68. Kaur G, Dufour JM. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. Spermatogenesis. 2012;2(1):1-5. doi: 10.4161/spmg.19885.

69. Turunen HT, Sipila P, Pujianto DA, Damdimopoulos AE, Bjorkgren I, Huhtaniemi I, et al. Members of the murine Pate family are predominantly expressed in the epididymis in a segment-specific fashion and regulated by androgens and other testicular factors. Reprod Biol Endocrinol. 2011;9(1):128. doi: 10.1186/1477-7827-9-128.

70. Rajesh A, Yenugu S. Effect of immunization against prostate- and testis-expressed (PATE) proteins on sperm function and fecundity in the rat. J Reprod Immunol. 2015;110:117-29. doi: 10.1016/j.jri.2015.02.009.

71. Ding Z, Qu F, Guo W, Ying X, Wu M, Zhang Y. Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. Mol Reprod Dev. 2007;74(9):1124-31. doi: 10.1002/mrd.20624.

Rapport-grastuit.com

Chapitre 3. Détection de facteurs d'origine épididymaire dans le plasma séminal humain

# RÉSUMÉ

L'infertilité idiopathique masculine peut être considérée comme une maladie multifactorielle. Actuellement, il existe peu de modalités pour diagnostiquer les patients atteints et fournir des interventions appropriées. Dans cette optique, nous avons pensé investiguer de nouveaux biomarqueurs moléculaires extracellulaires du plasma séminal. Ainsi, en collaboration avec la clinique de fertilité CReATe grâce à l'organisme subventionnaire Mitacs, le but de mon projet a été de déterminer s'il est possible de détecter de manière non invasive des facteurs d'origine épididymaire dans le plasma séminal humain et de les corréler à un statut de fertilité. En nous basant sur les résultats de la littérature et sur nos résultats expérimentaux réalisés sur le modèle murin, nous avons sélectionné AZGP1, PATE4, miR-210, miR-672, miR-191 et miR-204 comme molécules d'intérêts. Tout d'abord, selon les critères de l'OMS, j'ai créé une biobanque contenant 43 échantillons biologiques (8 échantillons provenant d'homme asthenozoospermiques et 35 échantillons témoins). J'ai validé également de manière protéique grâce à deux marqueurs de surface, soit CD63 et Hsp70 (70 kilodalton heat shock proteins), une nouvelle méthode d'isolement d'exosome à partir de fluide séminal. La taille moyenne des particules isolées est de 147,4 nm (+/- 1,8 nm) et a été calculée grâce à l'analyse de suivi de nanoparticules (NTA). Avec des techniques de PCR en temps réel et d'immunobuvardage, j'ai démontré la présence de ces molécules au niveau du plasma séminal, dont Pate4 qui est associé également avec les spermatozoïdes. Finalement, j'ai mis en évidence qu'AZGP1, miR-672, miR-191 et miR-204 se retrouvent associés aux épididymosomes. En conclusion, à partir de ces résultats préliminaires, nous allons évaluer l'expression de ces facteurs épididymaires chez des patients ayant un spermogramme normal ou présentant une asthénozoospermie. Le but ultime de cette étude sera d'évaluer le rôle de ces molécules comme cibles cliniques.

## ABSTRACT

Idiopathic male infertility is a multifactorial disease. Currently, there are only few modalities to diagnose patients and provide appropriate interventions. In this context, we thought to investigate new extracellular molecular biomarkers of seminal plasma. Thus, in collaboration with the CReATe Fertility Clinic through the Mitacs Granting Agency, the goal of my project was to determine if it is possible to detect non-invasively epididymal factors in human seminal plasma and to correlate them to a fertility status. Based on the results of the literature and our experimental results on the murine model, we selected AZGP1, PATE4, miR-210, miR-672, miR-191 and miR-204 as molecules of interest. First, according to the WHO criteria, I created a biobank containing 43 biological samples (8 samples from asthenozoospermic man and 35 control samples). I also validated with two surface markers, CD63 and Hsp70 (70 kilodalton heat shock proteins), a new method of exosome isolation from seminal fluid. The average size of the isolated particles is 147.4 nm (+/- 1.8 nm) and was calculated using nanoparticle tracking analysis (NTA). With real-time PCR and immunoblotting techniques, I have demonstrated the presence of these molecules in seminal plasma, where Pate4 is also associated with spermatozoa. Finally, I found that AZGP1, miR-672, miR-191 and miR-204 are associated with epididymosomes. In conclusion, from these preliminary results, we will evaluate the expression of these epididymal factors in patients with normal spermogram or with asthenozoospermia. The ultimate goal of this study will be to evaluate the role of these molecules as clinical targets.

## 3.1 Introduction

Le processus de fécondation est une succession d'événements impliquant de nombreux composés nécessaires à la maturation adéquate des spermatozoïdes jusqu'à la survie de ceuxci dans l'appareil reproducteur féminin. Parmi les principaux acteurs, le plasma séminal joue un rôle important dans la régulation de la coagulation et de la liquéfaction du sperme, de la motilité des spermatozoïdes et de la fécondation (Drabovich et al., 2014). Ainsi, comme le plasma séminal contient un grand nombre de protéines sécrétées spécifiques des organes du système reproducteur masculin, la composition protéomique de celui-ci est devenue d'un intérêt croissant pour la découverte de nouveau biomarqueur de l'infertilité. Selon une étude réalisée en 2011 comparant le profil protéique entre des hommes sains et post-vasectomisés, il a été estimé qu'environ 2000 molécules dans le plasma séminal auraient un rôle potentiel dans le diagnostic les dysfonctions du système urogénital (Batruch et al., 2011). La protéine PSA (Antigène spécifique de la prostate) est un exemple d'un marqueur découvert au niveau du plasma séminal et qui a depuis révolutionné le diagnostic des maladies de la prostate (Rao et al., 2008). De manière similaire, plusieurs recherches ont tenté de découvrir les molécules impliquées dans les différents types d'infertilités masculines, dont l'asthénozoospermie (Rolland et al., 2013; Yamakawa et al., 2007). L'asthénozoospermie est l'une des caractéristiques les plus communes chez les hommes infertiles, mais son étiologie reste inconnue dans la plupart des cas (Martinez-Heredia et al., 2008). Afin de mieux comprendre cette dysfonction, plusieurs équipes ont fait des analyses sur un gel bidimensionnel d'électrophorèse des protéines spermatiques ou épididymaires pour les identifier par la suite par spectrométrie de masse (Martinez-Heredia et al., 2008; J. Wang et al., 2009; Zhao et al., 2007). Bien que les résultats varient d'une étude à l'autre, le constat général reste le même : l'expression protéique entre les normozoospermiques et les asthénozoopermiques est différente.

Dans cette optique, nous avons voulu tester le potentiel diagnostic de certaines molécules découvertes chez le modèle murin pour l'asthénozoospermie. Parmi nos protéines d'intérêts, notons PATE4 et AZGP1. Selon la littérature, ces deux protéines seraient tout d'abord impliquées dans le pouvoir fécondant masculin, plus particulièrement au niveau de la motilité

spermatique. En effet, AZGP1 a été découverte chez l'homme, mais tout d'abord chez le bovin où lorsque cette protéine est mise en contact avec des spermatozoïdes immatures provenant de la partie proximale de l'épididyme, les cellules acquéraient une motilité (Ding et al., 2007). De plus, AZGP1 prendrait part dans la réaction acrosomique et de pénétration à l'ovocyte puisqu'un immunomarquage de spermatozoïde humain avant et après la réaction acrosomique a démontré la perte de cette protéine au niveau pré-équatorial (Y. Liu et al., 2012). Également, l'incubation de spermatozoïdes avec des anticorps contre AZGP1 diminuerait le taux de pénétration de ceux-ci dans des ovocytes (Y. Liu et al., 2012). Selon l'étude réalisée en 2014 par Milardi et al., AZGP1 pourrait aussi être utilisé comme biomarqueur afin de différencier les hommes avant une déficience en androgène. En effet, en comparant par spectrométrie de masse des échantillons de plasma séminal provenant de patients souffrant d'hypogonadisme à un groupe témoin, ils ont découvert qu'AZGP1 n'était pas présent chez les hommes ayant un problème hormonal (Milardi et al., 2014). Une autre étude à d'ailleurs soulignée l'implication d'AZGP1 dans les anomalies spermatiques telles que l'azoospermie. En utilisant un gel de polyacrylamide deux dimensions, Starita-Geribaldi et al. ont effectivement démontré que cette protéine était indétectable au niveau du plasma séminal des patients azoospermiques (Starita-Geribaldi et al., 2003). En ce qui concerne PATE4, de par sa présence au niveau des cellules germinales, elle ferait partie d'une famille de protéine impliquée dans la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte (Margalit et al., 2012). De plus, selon une étude comparative réalisée en 2015, PATE4 serait exprimée uniquement au niveau des spermatozoïdes des hommes fertiles sains et absents chez les patients atteints de varicocèle (Agarwal et al., 2015). L'absence de PATE4 chez les patients ayant cette dilatation des veines du cordon spermatique souligne ainsi le rôle potentiel de cellec-ci dans la motilité des spermatozoïdes. Enfin, une analyse protéomique comparant l'expression de certaines protéines spermatiques entre une cohorte jeune et âgée a démontré que la protéine PATE1, soit l'une des protéines encodées par le locus pate4, est plus exprimée chez les jeunes hommes (F. J. Liu et al., 2015). Il y aurait donc une corrélation potentielle entre la présence de PATE1 sur les spermatozoïdes éjaculés et la motilité progressive de ces cellules germinales.

En ce qui concerne les miARNs cibles pour ce projet, ceux-ci correspondent à ceux qui ont été découverts comme étant sous-exprimés dans le modèle de souris invalidé génétiquement pour l'enzyme Dicer1 et qui ont été détectés comme étant associés avec des vésicules extracellulaires (Figure 2.1 et 2.2). Ces miARNs sont : miR-210, miR-672, miR-191 et miR-204. Même si peu d'informations sont connues sur l'implication de ces miARNs dans la fertilité masculine, il a été démontré que l'expression de miR-191 au niveau testiculaire est réduite chez les hommes stériles souffrant d'une aplasie des cellules germinales, soit une azoospermie malgré la présence des cellules de Leydig et de Sertoli (Dabaja et al., 2015). En ce qui concerne miR-210, l'expression de celui-ci semble augmenter dans l'épididyme des hommes ayant une varicocèle et diminuerait après ligature de la veine spermatique (Chen et *al.*, 2016). D'autre part, l'expression de ce miARN au niveau du testicule est plus élevé chez les hommes ayant une azoospermie non obstructive comparée aux hommes souffrant d'azoospermie obstructive, menant alors l'hypothèse que miR-210 est impliqué dans la spermatogenèse. Finalement, miR-210 est aussi fortement exprimé dans les testicules des hommes souffrant de cryptorchidie, ce qui est en accord avec l'azoospermie non obstructive (Duan *et al.*, 2016).

## 3.2 Matériels et méthodes

#### 3.2.1 Collection d'échantillons et création de la bio banque

Des patients ont été recrutés pour participer à l'étude des facteurs moléculaires contrôlant l'infertilité masculine en faisant don de leur échantillon biologique après traitement de celuici par la clinique d'andrologie du CHUL. Chaque patient a signé un formulaire de consentement qui a été accepté par le CER du CHU de Québec et de l'Université Laval. Ces échantillons ont été utilisés afin d'optimiser nos protocoles exclusivement.

En bref, après liquéfaction de l'éjaculat, l'échantillon a été centrifugé à 800 x g pendant 10 minutes à 22°C afin de séparer le plasma séminal des spermatozoïdes. Le culot de spermatozoïdes a été resuspendu dans 3 ml de Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) et soumis à une centrifugation de 800 x g pendant 10 minutes à 22°C. Cette étape a été répétée deux fois. Après la dernière centrifugation, le culot de spermatozoïdes est repris dans

1 ml de D-PBS. Le décompte spermatique s'est fait avec un aliquot de 10  $\mu$ l à l'hémacytomètre. La suspension de spermatozoïdes est ensuite centrifugée à 12000 x g pendant 5 minutes à 22°C et le surnageant est éliminé. Le plasma séminal et le culot de spermatozoïdes sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

En ce qui concerne les échantillons biologiques récoltés pour la formation notre bio banque, seuls les échantillons provenant de la bio banque d'échantillons dédiée à la recherche (ALS Database) de la clinique de fertilité CReATe ont été utilités. En effet, les échantillons provenant du CHUL n'ont pas pu être inclus dans la bio banque, car nous n'avons pas accès à toutes les informations de la semence (comme par exemple la viabilité spermatique) ainsi que certaines informations sur les patients. De plus, les échantillons biologiques du CHUL ne sont pas traités de manière similaire à ceux de CReATe, ce qui peut induire un biais supplémentaire. En fonction des informations suivantes, soit : le volume et le pH de l'éjaculat, le pourcentage de motilité ainsi que le compte et la morphologie spermatique, la sélection des échantillons provenant de patients normozoospermiques et asthenozoospermiques a été faite en fonction des critères de semence de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Lu et al., 2010). Ainsi, chaque échantillon devait avoir des valeurs supérieures ou égales aux limites de références inférieures (Tableau 1.1) pour être pris en compte. Seuls les échantillons appartenant à la catégorie des asthenozoospermiques devaient avoir un pourcentage de motilité inférieur au critère de référence, soit de 40%. Tous ces échantillons ont été au préalable traités par l'équipe d'andrologie et séparés en deux fraction (fraction spermatique et plasma séminal) avant congélation et entreposage à -80°C.

#### 3.2.2 Isolement et concentration d'exosomes

L'isolement d'exosome à partir de plasma séminal humain a été réalisée par exclusion de taille grâce à la colonne de chromatographie qEVoriginal (Izon Science). Brièvement, un aliquot de 500  $\mu$ l de plasma séminal est décongelé et centrifugé à 12000 *x g* pendant 30 min afin d'enlever tous débris. Après avoir équilibré la colonne avec 10 ml de D-PBS contenant 0,03% de Tween 20, l'échantillon est déposé sur le dessus de la colonne de silice et les différentes fractions de l'éluat sont récoltées selon les directives du manuel d'instruction. Les

trois fractions contenant les exosomes sont par la suite groupées ensemble et déposées sur un filtre Amicon d'une capacité limite d'exclusion de masse de 100 kDa (Millipore). Le tout est ensuite centrifugé à une vitesse de 4500 x g durant 15 min afin de concentrer les exosomes. Seule la partie se retrouvant sur le dessus du filtre est récoltée pour les expériences subséquentes, soit entre 100 et 200  $\mu$ l.

#### 3.2.3 L'analyse de suivi de nanoparticules

Cent µl d'un échantillon de concentré d'exosome a été dilué 9X afin d'avoir un volume de départ adéquat et permettre une lecture optimale de réfraction des particules. La technique a été réalisée à l'aide d'un microscope NanoSight LM10-HS (NanoSight Ltd., Amesbury, Royaume-Uni). La caméra a été utilisée pour la détection de nanoparticules selon les recommandations du fabricant. Le seuil de détection a été réglé à 4, la durée d'enregistrement a été de 30 secondes et l'acquisition du même échantillon a été faite en triplicata. Les vidéos ont été analysées avec le logiciel NTA version 2.3.

#### 3.2.4 Immunobuvardage contre deux antigènes de surface des exosomes

Suivant ou non une étape d'extraction au tampon Laemmli 5X, la quantification protéique a été réalisée en utilisant un kit le dosage colorimétrique de protéines Pierce microplate BCA (ThermoFisher). Par la suite, 12 µg d'exosome et 9 µg de protéines d'exosome ont été déposés sur un gel pré coulé Bolt Bis-Tris Plus ayant un gradient d'acrylamide allant de 4 à 12% (ThermoFisher). Le tampon de migration et de transfert qui ont été utilisés afin de réaliser la technique d'immunobuvardage sont tous deux des tampons Bolt® afin d'optimiser l'efficacité de l'expérience (ThermoFisher). Une membrane de nitrocellulose de 0,2 µm a été utilisée comme support de transfert grâce au système de transfert Bolt® (ThermoFisher). La membrane a été bloquée avec la solution de blocage d'Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NB, USA) dilué de moitié avec du TBST (Tris 50 mM, chlorure de sodium de 150 mM, Tween 20 à 0,05%) puis incubée toute la nuit à 4°C avec un anticorps contre le marqueur protéique Hsp70 (1: 500) (Proteintech) et le marqueur CD63 (1 :1000) (BD Biosciences). La membrane a ensuite été lavée 3 fois avec du TBST et incubée avec du Rouge ponceau à

température pièce pendant 15 minutes, rincée 30 minutes avec de l'eau et ensuite avec du TBST. Les anticorps secondaires qui ont été utilisés sont conjugués à un fluorophore IRDye (LI-COR Biosciences) et incubés avec la membrane pendant 1 heure à température pièce ; IgG anti-souris (926-32212, 1: 15 000) et IgG anti-lapin (926-32214, 1 : 10 000). La membrane a été finalement visualisée sur le système d'imagerie IR Odyssey (LI-COR Biosciences).

#### 3.2.5 Extraction et purification d'ARN d'exosomes

Cent µl provenant d'un mélange hétérogène d'exosomes de 4 donneurs différents a été extrait dans le tampon RLT et purifié avec le RNeasy Mini Kit (Quiagen). L'étape de DNAse n'a pas été réalisée. Se référer aux sections 2.4.3 pour plus de détails sur les techniques employées.

### 3.2.6 RT-qPCR contre des petits ARNs

En se basant sur ce qui a été fait à la section 2.4.15, 20 ng d'ARN purifié d'exosomes a été rétro transcrit grâce à une amorce spécifique ciblant quatre miARNs : miR210, miR191, miR-204 et miR-672. La PCR quantitative a été réalisée avec un maximum de 8  $\mu$ l d'ADN complémentaire et 10  $\mu$ l de SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio Rad) pour un volume total de 20  $\mu$ l par réaction. Après 40 cycles d'amplification, les échantillons ont été déposés sur gel d'agarose 3.5%.

3.2.7 Immunobuvardage contre les protéines PATE4 et AZGP1 sur un extrait d'exosomes

Un échantillon hétérogène de 50 µl d'exosomes provenant de deux patients différents ainsi que 50 µl de fluide séminal provenant de 4 patients ont été extraits dans 25 µl de Ripa buffer 1X. Une étape subséquente de 15 secondes de sonication par pulsion a été réalisée afin de maximiser le bris des membranes vésiculaires et des liens peptidiques. Un échantillon de prostate, de spermatozoïdes et d'épididyme humain ont été extrait seulement dans du Ripa 1X à un ration 1:1. 26.6 µg de protéine d'exosomes, de fluide séminal et d'épididyme ainsi

que 20 µg de prostate ont été déposés sur un gel d'acrylamide de 15%. Les membranes ont ensuite été incubées toute la nuit avec les anticorps primaires suivants : anti Azgp1 dilué 1:500 (Antibodies-online Inc., ABIN2707262), anti Pate4 dilué 1:500 (Sigma, HPA045632), anti-Hsp70 dilué 1:1000 (BD Bioscience, 610607) et anti PAP (Phosphatase acide prostatique) dilué 5:25 000 (lapin immunisé, laboratoire de Sullivan). Un anticorps secondaire chèvre anti lapin et anti souris couplés à la peroxydase ont été utilisés à une dilution de 2:25 000 pour les anticorps anti AZGP1, PATE4 et PAP ainsi qu' anti Hsp70 respectivement. Pour avoir tous les détails sur ce protocole, voir la section 2.4.16.

### 3.3 Résultats

Biobanque d'échantillons biologiques

Sur 314 candidatures évaluées, 43 dossiers de patients ont été retenus; 35 caractérisés comme étant des normozoospermiques et 8 étant des asthenozoospermiques. Les hommes associés aux 43 échantillons biologiques sélectionnés sont tous de la même tranche d'âge, soit comprise entre 30 et 49 ans. L'ethnicité n'a pas été prise en compte. La motilité spermatique totale moyenne (%) des groupes témoin et asthénozoospermique était respectivement de 54,0  $\pm$  9,8 et 21  $\pm$  7,1 et la morphologie moyenne (%) était de 10  $\pm$  4,5 et 6  $\pm$  4,0 6  $\pm$  4,0 (Tableau 3.2).

#### 3.3.1 Validation de la taille des exosomes

L'NTA a été effectuée afin de valider l'isolement de vésicules extracellulaires de bonne taille grâce à la colonne de chromatographie qEV original. Les résultats ont démontré que le diamètre moyen des particules isolées est de 147,4 nm (+/- 1,8 nm), où la valeur la plus représentée est de 134,5 nm (+/- 2,8 nm) (S8 Fig.). Quant à l'écart type calculé, soit la quantité de variation des données autour de la valeur moyenne, est de 44.5 nm (+/- 3,5 nm). Même si cela peut paraître un peu élevé pour des exosomes qui ont normalement un diamètre compris entre 30 et 150 nm, il est intéressant de mentionner que le D50, soit la valeur représentant 50% de mes particules est de 137.5 nm (+/- 2,2 nm). Ainsi, 50% des particules



de l'échantillon ont un diamètre inférieur ou égal à 137.5 nm (S8 Fig.). La dispersion du diamètre des particules isolées du plasma séminal en fonction de leur concentration est représentée à la Figure 3.1A.

Paramètres	Normozoospermiques	Asthenozoospermiques
	n=35	<i>n</i> =8
Volume de l'éjaculat (mL)	$3,0 \pm 1,1$	$3,2 \pm 1,7$
Min	1,7	1,8
Max	5,0	7,0
Concentration spermatique	$70 \pm 45,7$	$42,5 \pm 69,9$
$(10^{6}/mL)$		
Min	17,0	15,0
Max	194,0	200,00
Motilité totale (%)	$54,0 \pm 9,8$	<b>21 ± 7,1</b>
Min	40,0	17,0
Max	79,0	38,0
Morphologie spermatique (%	$10 \pm 4,5$	$6 \pm 4,0$
normaux)		
Min	7,0	4,0
Max	24,0	16,0
pН	8,2 ± 0,3	8,2 ± 0,2
Min	7,5	8,0
Max	8,8	8,5

Tableau 3.1 Valeurs médianes et écart type des critères de semence des deux cohortes de patients

De manière similaire, la technique d'immunobuvardage contre deux protéines de surface des exosmoses, soit CD63 et Hsp70, a été réalisée sur des extraits d'exosomes concentrés à partir de plasma séminal humain dans le but de s'assurer de la justesse du protocole d'isolation. Comme il est possible de le voir à la figure 3.1 B et C, mes échantillons sont positifs pour les deux protéines testées, ce qui confirme la nature des particules isolées. De plus, j'ai testé deux conditions pour chaque marqueur de surface, soit sans ou avec une étape préalable d'extraction protéique afin de déterminer la méthode adéquate pour ce type d'échantillon. Pour les deux membranes, le signal fluorescent de l'échantillon extrait semble légèrement plus fort que l'autre, confirmant que l'extraction protéique permet d'obtenir de meilleur résultat malgré une plus petite quantité de matériel de départ.



Figure 3.1 Isolement d'exosomes à partir de plasma séminal humain (A)Diamètre des particules isolées en fonction de la concentration de celles-ci. Le test a été réalisé en triplicata avec le même échantillon biologique. Immunobuvartage sur un extrait de 1.  $12 \mu g$  d'exosome et 2.  $9 \mu g$  d'extrait protéique d'exosome contre deux marqueurs de surface des exosomes (B) la protéine CD63 et (C) Hsp70.

#### 3.3.2 Présence de petits ARNs dans les exosomes du plasma séminal humain

Parmi les quatre miARNs testés, il s'est avéré que trois d'entre eux se retrouvent dans la fraction exosomale du fluide séminal humain (Exo) (Figure 3.2A). miR-204, miR-672 et miR-191 démontrent une intensité d'expression similaire à celle détectée au niveau de l'extrait de fluide séminale complet (SF) suite au dépôt des produits PCR sur gel d'agarose. miR-210 n'est pas illustré sur cette figure, car le contrôle négatif durant la transcription inverse a démontré un résultat positif en qPCR. Il va donc falloir refaire l'expérience pour ce miARN ou concevoir un autre couple d'amorces. Le contrôle positif qui a été utilisé pour cette expérience est un extrait d'épididyme proximal de souris (Épi), car ces petits ARNs ont tout d'abord démontrés leur expression dans cet espèce (Figure 2.1). miR-191 semblerait être le miRNA le plus abondant dans les exosomes, car son signal est presque aussi intense que le contrôle positif.



Figure 3.2 Présence de miR-204, 672 et 191 ainsi que d'AZGP1 dans les exosomes du fluide séminal humain (A)Dépôt des produits PCR contre les miARNs miR-204, 672 et 191 sur un gel d'agarose 3,5%. SF = Fluide séminal, Exo = Exosmes, Épi = Épididyme, RT- et qPCR- = Contrôles négatifs (B) Immunobuvardage sur un gel de 15% d'acrylamide contre les protéines Hsp70, AZGP1, PATE4 et PAP sur: 26.6  $\mu$ g de protéine de fluide séminal (SF), 26.6  $\mu$ g de protéine d'exosome, 26,6  $\mu$ g de protéine d'épididyme et 20  $\mu$ g de protéine de prostate (C) Immunobuvardage sur un gel de 15% d'acrylamide contre la protéine AZGP1 sur des protéiques de spermatozoïdes humains : 5,10 et 20  $\mu$ g.

#### 3.3.3 AZGP1 est une protéine associée aux exosomes du fluide séminal humain

Comme illustré à la figure 3.2B, le marquage positif des exosomes contre le marqueur Hsp70 valide la nature vésiculaire du matériel avec lesquel l'expérience a été réalisée. Il est intéressant de remarquer que le fluide séminal non traité démontre également la présence de cette protéine de surface, laissant alors croire qu'il y aurait beaucoup d'exosomes au niveau extracellulaire dans le tractus reproducteur mâle. Dans cette même optique, PAP a aussi été utilisée comme contrôle positif. En effet, puisque cette phosphatase est une protéine sécrétée par la prostate, elle devait se retrouver en condition normale et non obstructive dans le milieu extracellulaire de l'épididyme. Même si PATE4 et AZGP1 sont toutes deux des protéines sécrétées et fortement exprimées au niveau du fluide séminal, seule AZGP1 démontre une présence dans l'extrait protéique d'exosomes (Figure 3.2B). AZGP1 est également présent au niveau de l'épididyme humain, un résultat qui va de pair avec le résultat d'immunohistochimie de la Figure 2.4. En ce qui concerne l'expression de PATE4, cette protéine est contrairement à AZGP1, non perceptible au niveau de cet organe. Toutefois, il a été possible de détecter Pate4 comme étant associé au fluide séminal et aux spermatozoïdes (Figure 3.2C).

## 3.4 Discussion

Il existe plusieurs méthodes afin d'isoler des exosomes (Li *et al.*, 2017). Parmi celles-ci, l'isolation par exclusion de taille par colonne de chromatographie semble être une technique de choix. En effet, en comparaison à la méthode d'isolation par centrifugation ou par agent précipitant, la technique de chromatographie permet d'éliminer le plus de protéines solubles interférentes et permet également de mieux conserver l'intégrité des vésicules (Gamez-Valero *et al.*, 2016). C'est pourquoi j'ai sélectionné cette méthode pour mettre au point un protocole d'isolement d'exosomes du plasma séminal humain. Ainsi, les particules isolées présentaient bien à leur surface deux antigènes spécifiques aux exosomes, soit CD63 et Hsp70 et avaient une taille moyenne de 147,4 nm (+/- 1,8 nm) de diamètre. CD63 est une glycoprotéine transmembranaire capable d'interagir avec les intégrines et d'autres tétraspanines tandis qu'Hsp70 est une protéine chaperonne jouant un rôle dans la signalisation une fois dans le milieu extracellulaire (De Maio & Vazquez, 2013; Pols & Klumperman, 2009). Comme le projet a un côté clinique, la rapidité des protocoles et manipulations est un point important. Afin de maximiser cette caractéristique, l'emploi de la qEVsingle (Izon Science) serait à essayer. Étant tout d'abord d'une seule utilisation, il n'y a pas besoin de faire des étapes de régénération de la colonne comme c'est le cas pour la qEVoriginal qui a été utilisée. De plus, l'utilisation de ce deuxième type de colonne permet de travailler avec moins de matériel biologique, ce qui est un autre avantage. En effet, 500 µl de fluide est nécessaire pour la colonne de chromatographie qEVoriginal contrairement à 150 µl pour la qEVsingle. Donc même si l'homme ne produit pas un gros volume d'éjaculat, il serait tout de même possible d'utiliser cette technique de caractérisation conjointement aux autres méthodes qualitatives faites en clinique d'andrologie. Néanmoins, il faudrait tout d'abord tester cette deuxième version de la colonne afin de valider si la détection des molécules d'intérêts n'est pas affectée par la diminution de volume du matériel de départ. On pourrait même imaginer utiliser ces vésicules membranaires dans le futur afin de renverser par exemple un phénotype d'infertilité en injectant localement les vésicules transportant les bonnes molécules à un homme souffrant d'un certain type d'infertilité. Cela permettrait entre autres de corriger une condition médicale au lieu de la contourner et ainsi limiter les interventions faites chez la femme si l'homme est la cause de l'infertilité dans le couple.

Deuxièmement, la présence d'AZGP1 et de PATE4 au niveau du fluide séminal humain n'a pas été une surprise, car elles sont toutes deux des protéines sécrétées souvent retrouvées dans le milieu extracellulaire. Toutefois, le fait qu'AZGP1 soit internalisée dans des exosomes est une découverte plutôt récente, en accord d'ailleurs avec une étude réalisée en 2017 sur le sécrétome de patientes atteintes du cancer du sein (Philley *et al.*, 2017). Également, le fait de retrouver la protéine PATE4 associée à un extrait protéique de spermatozoïdes est un résultat soutenu par la littérature (Agarwal *et al.*, 2015; F. J. Liu *et al.*, 2015; Margalit *et al.*, 2012), validant ainsi l'anticorps utilisé pour la technique d'immunobuvardage. En ce qui concerne les miARNs extracellulaires, et bien il a déjà été démontré chez deux lignées cellulaires de carcinome colorectal que miR-672 se retrouve principalement exprimé dans les exosomes produits par ces cellules (Ragusa *et al.*, 2017). Au niveau des exosomes sanguins humain, miR-191 s'est révélé comme étant l'un des 10

miARNs les plus abondants dans ces vésicules (Cheng *et al.*, 2014). Toutefois, chez ce même type d'exosome, lorsque le sang est irradié aux rayons gamma, l'expression de miR-204 semble augmenter de manière significative en comparaison aux échantillons non irradiés (Yentrapalli *et al.*, 2017). Ceci souligne alors peut-être que le miR-204 est un miARN sécrété préférentiellement en moment de stress. Bien que peu d'information soit disponible sur ces miARNs exosomaux plus spécifiquement au niveau du système reproducteur mâle, la littérature scientifique nous permet tout de même de conclure que ces trois miARNs sont internalisés par des exosomes de nature diverse.

Si AZGP1, PATE4, miR-204, miR-672, miR-191 s'avèrent être de bons candidats comme biomarqueurs moléculaires, je crois qu'un test Elisa et qPCR seraient les meilleures méthodes à employer en clinique pour pouvoir détecter ces protéines et miARNs respectivement dans un échantillon de fluide séminal. Encore une fois, ces techniques sont efficaces et brèves en termes de temps. Il faudrait également penser à inclure la détection d'un miARN contrôle pour les expériences de PCR quantitative. Je crois que des miARNs testiculaires comme hsamiR-34b, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-429 et hsa-miR-122 seraient des bons choix, car comme ils sont tous retrouvés normalement dans le plasma séminal, ils auraient le potentiel de valider les résultats (Abu-Halima et al., 2014). Si l'on s'intéresse aux résultats de PATE4 en immunobuvardage de la figure 3.2, le fait que cette protéine ne soit pas détectée au niveau de l'épididyme va à l'encontre de notre hypothèse et de nos précédents résultats chez la souris (Figure 2.3). Toutefois, puisque PATE4 est exprimée au niveau de la prostate (de par son nom : Prostate And Testis Express 4), il se pourrait que son expression soit plus notable dans cet organe en comparaison à l'épididyme et c'est pour cette raison qu'aucun signal n'est détecté dans l'extrait protéique épididymaire humain. Il est intéressant de remarquer également qu'il n'y a pas de différence détectable sur la membrane du signal de PATE4 entre un extrait protéique de 10 ou de 20 µg de spermatozoïdes. Ceci est peut-être dû au fait que lors de l'expérience, nous avons atteint la limite de détection de l'anticorps utilisé, saturant ainsi le signal. Il aurait ainsi fallu faire au préalable une courbe standard afin de déterminer les concentrations optimales d'utilisation de cet anticorps.

En ce qui concerne les perspectives pour ce deuxième projet, même si j'ai démontré la présence des molécules d'intérêts dans le fluide séminal et que certaines de celles-ci sont associées à la fraction exosomale, il rester à tester notre hypothèse de départ. Vérifier si ces facteurs épididymaires démontrent chez les hommes fertiles vs asthenozoospeermiques un profil d'expression différent, quantifiable et statistiquement valable. Tout d'abord, l'un des défis de ce projet est qu'en travaillant chez l'humain, on doit prendre en considération qu'il y a énormément de variation interindividuelle (Casanova, 2015; Erskine et al., 2010). Ainsi, le nombre d'échantillons inclus dans l'étude doit être assez grand afin que les résultats obtenus représentent l'ensemble des individus. Toutefois, avec la bio banque de 43 échantillons, je pourrais réaliser une expérience comparative avec seulement un n=16. En effet, la taille de ma population est restreinte et normalisée sur la quantité d'échantillons disponible pour la cohorte de patients avec un nombre limitant (n=8). Néanmoins, même s'il sera difficile de tirer des conclusions à la fin de ce projet, les tendances des résultats seront un bon point de départ pour un projet à plus grande échelle. Deuxièmement, comme le but ultime est de valider le potentiel diagnostic des dysfonctions post testiculaire de ces facteurs extracellulaires, il est important de mentionner que l'idée de départ était de regrouper dans cette étude d'autres sous populations d'homme infertile, comme des hommes ayant une infertilité inexpliquée et souffrant d'azoospermie non obstructive. Malheureusement, comme la collecte d'échantillon s'est avérée plus difficile que prévu, seuls deux groupes pourront être comparés entre eux pour ce projet. Malgré tout, nous croyons que caractériser l'implication de ces molécules dans un phénotype connu d'infertilité tel l'asthénozoospermie nous permettra de mieux expliquer et comprendre par la suite ce qui se passe chez les autres cas d'infertilité de dysfonction épididymaire. Également, il est important de mentionner que les échantillons témoins considérés comme normozoospermiques de cette étude ont été catégorisés seulement en se basant aux critères de la semence, sans connaissances de s'il y a eu une grossesse associée ou si c'était plutôt la femme qui avait des problèmes d'infertilités. Nous ne pouvons donc pas affirmer avec certitude que les échantillons collectés proviennent d'hommes fertiles. Il aurait été donc bien d'avoir accès à ce genre d'information afin de raffiner nos groupes d'études. Finalement, je crois qu'il serait intéressant de réaliser la technique d'imagerie par microscopie électronique sur les extraits concentrés d'exosomes. Cela nous permettrait de visualiser directement la présence des vésicules dans nos

échantillons et d'avoir un aperçu des différentes formes possibles de celles-ci. Cette technique fait entre autres parties de celles recommandées par l'International Society for Extracellular Vesicles, avec le NTA et l'immunobuvardage pour une caractérisation adéquate des vésicules extracellulaires(Witwer *et al.*, 2013).

Chapitre 4. Conclusion

La façon traditionnelle de mesurer la capacité reproductrice mâle est de mesurer la proportion de spermatozoïdes motiles et morphologiquement normaux d'un éjaculat. Bien que ces caractéristiques soient importantes à la fonctionnalité des spermatozoïdes, la compréhension de la régulation de ces phénomènes est indispensable au résonnement du diagnostic et du traitement à sélectionner pour un patient souffrant d'infertilité. Car ce qui garantit une fécondation réussie est bien plus complexe que ces deux points qualitatifs. Dans ce sens, les dysfonctions épididymaires sont encore aujourd'hui mal comprises et diagnostiquées. C'est donc pourquoi certains hommes infertiles sont considérés idiopathiques. Ainsi, le but ultime serait d'amener une attention particulière à ces cas ambigus d'infertilités idiopathiques en essayant de trouver une méthode moléculaire permettant de catégoriser également ces hommes.

Les points forts de ce projet est que tout d'abord, notre approche scientifique peut être transposée chez d'autre organe organisé en circuit fermé comme l'épididyme, par exemple le rein. Effectivement, même si son rôle est différent de l'épididyme, soit de filtrer le sang et de former l'urine, l'organisation épithéliale du glomérule du rein empêche également les éléments cellulaires sanguins (leucocytes, érythrocytes, etc.) de passer à travers la barrière de filtration. Ainsi, les unités structurales et fonctionnelles du rein, appelées néphrons, sont des systèmes fermés similaires à l'épididyme. Notre recherche va donc de pair avec les récentes études s'intéressants aux fonctions des miARNs dans le rein (Marrone et al., 2014; Nagalakshmi et al., 2011). Deuxièmement, nous avons mis de l'avant dans ce projet des candidats moléculaires afin de mieux comprendre l'infertilité masculine. Bien qu'AZGP1 et PATE4 soient déjà connus comme des protéines participant aux différents mécanismes d'acquisition du pouvoir fécondant, comme AZGP1 dans la motilité spermatique (Ding et al., 2007; Qu et al., 2007) et PATE4 dans la reconnaissance de l'ovocyte fait par les spermatozoïdes et la réaction acrosomique (Margalit et al., 2012; Rajesh & Yenugu, 2015, 2017), ce projet amène un volet supplémentaire, car nous soulignons le fait que ceux-ci pourraient être régulé dans l'épididyme par des miARNs vésiculaires. En effet, nous avons non seulement mis en évidence que miR-210, miR-672 et miR-191 pourraient être impliqués dans la maturation post testiculaire, mais également sur la communication intercellulaire au sein de l'épididyme. Comme il a déjà été démontré, les exosomes ont la capacité de

Rapport-gratuit.com Le numero 1 mondial du mémoires

transmettre des molécules au spermatozoïde (Reilly et al., 2016) (Sullivan et al., 2005). Mais le fait que ces vésicules servent également à autoréguler l'expression des gènes de l'organe qui les produit met l'emphase sur l'importance que joue l'épididyme dans la fertilité (Belleannee, 2015). De plus, comme ce système de communication vésiculaire prend place dans le fluide séminal et que celui-ci est transféré en même temps que les spermatozoïdes dans le tractus reproducteur femelle, on pourrait se demander si ces molécules jouent également un rôle important dans la régulation des gènes chez la femme (Vojtech et al., 2014). En effet, est-ce que ce même type de communication moléculaire existe chez les femmes lesbiennes se faisant inséminer ? Finalement, mis ensemble ces deux projets nous ont permis de valider, conjointement à la littérature, la présence des facteurs extracellulaires épididymaires étudiés tout d'abord sur le modèle murin chez l'homme. Cette constatation nous permet donc de conclure que la souris reste un bon modèle pour les recherches dans le domaine de la reproduction malgré les différences existant entre l'épididyme humain de celui des rongeurs. En effet, la rapidité du transit des spermatozoïdes, soit de 2 à 4 jours versus 10 à 12 pour les animaux de laboratoire, ainsi que le petit diamètre du tube épididymaire humain peut effectivement donner l'impression que cet organe a des fonctions différentes chez l'homme en comparaison aux autres espèces (Sullivan & Mieusset, 2016).

En ce qui concerne maintenant les limitations de ce projet, comme ce projet de recherche se base principalement sur la comparaison de donnée de micropuce fait au Chapitre 2, il est important de mentionner que cette technique est restrictive pour l'étude du rôle régulateur des miARNs. Effectivement, elle ne peut pas déceler toutes les nuances d'action faite par ceux-ci, car seules les modifications d'expression engendrant une dégradation de l'ARNm cible ont été prises en compte par la micropuce. Comme les modifications produites au niveau de la traduction n'affectent pas le nombre de transcrit, ils ne sont pas détectés par cette méthode. Ainsi, l'implication de certains gènes a probablement été sous-estimée. De plus, seuls les résultats étant significativement variants ont été considérés. Toutefois, rien ne prouve que les gènes ayant une moins grande différence d'expression sont moins importants... Néanmoins, l'un des avantages d'avoir utilisé la technologie des micropuces est qu'elles engendrent une abondance de donnée. C'est entre autres grâce à cela si un nouveau projet est né dans le laboratoire. En effet, lors de l'analyse des résultats, nous nous

sommes rendu compte qu'un bon nombre de gènes modifiés chez le modèle murin cKO étaient impliqués dans la structure et les voies de signalisation associées aux cils primaires. Deuxièmement, en ce qui concerne les analyses in silico faites au Chapitre 2, et bien il aurait été intéressant de confirmer de manière expérimentale la régulation des gènes d'intérêts par un miRNA cible à l'aide d'un test à la luciférase. En bref, si la limitation n'avait pas été matérielle et technique, nous aurions pu procéder à la culture d'une lignée cellulaire épididymaire immortalisée et cotransfecté celle-ci avec des pre-mirARNs mimiques et des plasmides contenant le 3'UTR des gènes d'intérêts en aval du gène de la luciférase. Ainsi, s'il y a bel et bien association entre un miARN et un 3'UTR d'un gène cible, le résultat aurait été clair : la cellule hôte contenant le plasmide n'émettrait plus de fluorescence. Troisièmement, tous les types de vésicules extracellulaires n'ont pas été pris en considération pour ce projet, car seuls les exosomes ont été étudiés. Le choix de les cibler exclusivement s'explique par le fait que les marqueurs de surface des exosomes sont connus et que leurs caractéristiques sont bien documentées. Dans cette même optique, nous avons restreint notre étude au niveau de la sélection du transport des miARNs, car ceux-ci peuvent également être retrouvés dans le milieu extracellulaire sous d'autre forme qu'encapsulés dans une vésicule, comme associée à des lipoprotéines, des ribonucléoprotéines ou attachés à la protéine Ago2 (Arroyo et al., 2011; Turchinovich et al., 2011; K. Wang et al., 2010). Pareillement, les miARNs ne sont pas les seuls petits ARNs à avoir la capacité de réguler l'expression des gènes. Ainsi, une seule partie de la population des ARNs extracellulaires a été comptabilisée comme participant à un mécanisme de communication intercellulaire dans notre étude.

En conclusion, l'épididyme est un organe du système reproducteur masculin qui a la capacité de produire des exosomes. Comme ces vésicules contiendraient entres autre la protéine AZGP1 et les miARNs miR-210, miR-672 et miR-191, l'implication d'une communication intercellulaire lors de la maturation post testiculaire est soulevée. Ces facteurs épididymaires auraient ainsi le potentiel de devenir des bons biomarqueurs pour certains types d'infertilité.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Backes, C., Fischer, U., Leidinger, P., Lubbad, A. M., ... Meese, E. (2014). Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril*, 102(4), 989-997 e981. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.07.001
- Agarwal, A., Sharma, R., Durairajanayagam, D., Ayaz, A., Cui, Z., Willard, B., . . . Sabanegh,
   E. (2015). Major protein alterations in spermatozoa from infertile men with unilateral varicocele. *Reprod Biol Endocrinol, 13*, 8. doi:10.1186/s12958-015-0007-2
- Akintayo, A., Legare, C., & Sullivan, R. (2015). Dicarbonyl L-xylulose reductase (DCXR), a "moonlighting protein" in the bovine epididymis. *PLoS One*, *10*(3), e0120869. doi:10.1371/journal.pone.0120869
- Alukal, J. P., & Lamb, D. J. (2008). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)--what are the risks? Urol Clin North Am, 35(2), 277-288, ix-x. doi:10.1016/j.ucl.2008.01.004
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., . . . Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, *9*(3), 277-279.
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., ... Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(12), 5003-5008. doi:10.1073/pnas.1019055108
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, *136*(2), 215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Batruch, I., Lecker, I., Kagedan, D., Smith, C. R., Mullen, B. J., Grober, E., ... Jarvi, K. A. (2011). Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and postvasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *J Proteome Res*, 10(3), 941-953. doi:10.1021/pr100745u
- Batruch, I., Smith, C. R., Mullen, B. J., Grober, E., Lo, K. C., Diamandis, E. P., & Jarvi, K. A. (2012). Analysis of seminal plasma from patients with non-obstructive azoospermia and identification of candidate biomarkers of male infertility. J Proteome Res, 11(3), 1503-1511. doi:10.1021/pr200812p
- Belleannee, C. (2015). Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. *Asian J Androl, 17*(5), 730-736. doi:10.4103/1008-682X.155532
- Belleannee, C., Calvo, E., Caballero, J., & Sullivan, R. (2013). Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. *Biol Reprod*, 89(2), 30. doi:10.1095/biolreprod.113.110486

- Belleannee, C., Thimon, V., & Sullivan, R. (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Res*, 349(3), 717-731. doi:10.1007/s00441-012-1381-0
- Berezikov, E., Chung, W. J., Willis, J., Cuppen, E., & Lai, E. C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*, 28(2), 328-336. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.028
- Beyer, C., & Pisetsky, D. S. (2010). The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 6(1), 21-29. doi:10.1038/nrrheum.2009.229
- Bieniek, J. M., Drabovich, A. P., & Lo, K. C. (2016). Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian J Androl, 18*(3), 426-433. doi:10.4103/1008-682X.175781
- Bjorkgren, I., Gylling, H., Turunen, H., Huhtaniemi, I., Strauss, L., Poutanen, M., & Sipila, P. (2015). Imbalanced lipid homeostasis in the conditional Dicer1 knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. *FASEB J*, 29(2), 433-442. doi:10.1096/fj.14-259382
- Bjorkgren, I., Saastamoinen, L., Krutskikh, A., Huhtaniemi, I., Poutanen, M., & Sipila, P. (2012). Dicer1 ablation in the mouse epididymis causes dedifferentiation of the epithelium and imbalance in sex steroid signaling. *PLoS One*, 7(6), e38457. doi:10.1371/journal.pone.0038457
- Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. J Cell Biol, 67(3), 835-851.
- Breton, S., Ruan, Y. C., Park, Y. J., & Kim, B. (2016). Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian J Androl, 18*(1), 3-9. doi:10.4103/1008-682X.165946
- Brown, D., & Breton, S. (2000). H(+)V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epididymis/vas deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways. *J Exp Biol, 203*(Pt 1), 137-145.
- Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), 1957-1966. doi:10.1261/rna.7135204
- Carpenter, D. O., & Sly, P. D. (2016). Environmental chemicals as endocrine disruptors. *Rev Environ Health*, *31*(4), 399. doi:10.1515/reveh-2016-0064
- Casanova, J. L. (2015). Human genetic basis of interindividual variability in the course of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A, 112*(51), E7118-7127. doi:10.1073/pnas.1521644112
- Chen, Y. G., Chen, S. F., Yang, Y. J., Long, A. A., & Liu, X. Q. (2016). [Expression and significance of miR-210 in the epididymis in rats with varicocele and following

varicocelectomy]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 96(36), 2885-2888. doi:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2016.36.008

- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), 740-744. doi:10.1038/nature03868
- Cheng, L., Sharples, R. A., Scicluna, B. J., & Hill, A. F. (2014). Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles*, *3*. doi:10.3402/jev.v3.23743
- Cohlen, B. J., Vandekerckhove, P., te Velde, E. R., & Habbema, J. D. (2000). Timed intercourse versus intra-uterine insemination with or without ovarian hyperstimulation for subfertility in men. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD000360. doi:10.1002/14651858.CD000360
- Cooper, T. G. (1993). The human epididymis--is it necessary? Int J Androl, 16(4), 245-300.
  Cornwall, G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. Hum Reprod Update, 15(2), 213-227. doi:10.1093/humupd/dmn055
- Dabaja, A. A., Mielnik, A., Robinson, B. D., Wosnitzer, M. S., Schlegel, P. N., & Paduch, D. A. (2015). Possible germ cell-Sertoli cell interactions are critical for establishing appropriate expression levels for the Sertoli cell-specific MicroRNA, miR-202-5p, in human testis. *Basic Clin Androl*, 25, 2. doi:10.1186/s12610-015-0018-z
- De Maio, A., & Vazquez, D. (2013). Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock*, 40(4), 239-246. doi:10.1097/SHK.0b013e3182a185ab
- Devroey, P., & Van Steirteghem, A. (2004). A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update, 10*(1), 19-28.
- Ding, Z., Qu, F., Guo, W., Ying, X., Wu, M., & Zhang, Y. (2007). Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. *Mol Reprod Dev*, 74(9), 1124-1131. doi:10.1002/mrd.20624
- Domeniconi, R. F., Souza, A. C., Xu, B., Washington, A. M., & Hinton, B. T. (2016). Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side? *Biol Reprod*, 95(1), 10. doi:10.1095/biolreprod.116.138768
- Drabovich, A. P., Dimitromanolakis, A., Saraon, P., Soosaipillai, A., Batruch, I., Mullen, B., ... Diamandis, E. P. (2013). Differential diagnosis of azoospermia with proteomic biomarkers ECM1 and TEX101 quantified in seminal plasma. *Sci Transl Med*, 5(212), 212ra160. doi:10.1126/scitranslmed.3006260

- Drabovich, A. P., Saraon, P., Jarvi, K., & Diamandis, E. P. (2014). Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat Rev Urol*, *11*(5), 278-288. doi:10.1038/nrurol.2014.74
- Duan, Z., Huang, H., & Sun, F. (2016). The functional and predictive roles of miR-210 in cryptorchidism. *Sci Rep, 6*, 32265. doi:10.1038/srep32265
- Duman, J. G., & Forte, J. G. (2003). What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(2), C237-249. doi:10.1152/ajpcell.00091.2003
- Dym, M., & Romrell, L. J. (1975). Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *J Reprod Fertil*, 42(1), 1-7.
- Eisenbach, M. (2003). Why are sperm cells phagocytosed by leukocytes in the female genital tract? *Med Hypotheses*, *60*(4), 590-592.
- Elisabeth Carlsen, A. G., Niels Keiding, Niels E Skakkeblek. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal,*, 305, 610. doi:305:609-13
- Erskine, R. M., Jones, D. A., Williams, A. G., Stewart, C. E., & Degens, H. (2010). Interindividual variability in the adaptation of human muscle specific tension to progressive resistance training. *Eur J Appl Physiol*, 110(6), 1117-1125. doi:10.1007/s00421-010-1601-9
- Evgeni, E., Charalabopoulos, K., & Asimakopoulos, B. (2014). Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil*, 15(1), 2-14.
- Fathi Najafi, T., Latifnejad Roudsari, R., Namvar, F., Ghavami Ghanbarabadi, V., Hadizadeh Talasaz, Z., & Esmaeli, M. (2015). Air pollution and quality of sperm: a metaanalysis. *Iran Red Crescent Med J*, 17(4), e26930. doi:10.5812/ircmj.17(4)2015.26930
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*, 391(6669), 806-811. doi:10.1038/35888
- Frank, F., Sonenberg, N., & Nagar, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, 465(7299), 818-822. doi:10.1038/nature09039
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19(1), 92-105. doi:10.1101/gr.082701.108

- Gamez-Valero, A., Monguio-Tortajada, M., Carreras-Planella, L., Franquesa, M., Beyer, K.,
   & Borras, F. E. (2016). Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Sci Rep*, *6*, 33641. doi:10.1038/srep33641
- Ghuman, N. K., Mair, E., Pearce, K., & Choudhary, M. (2016). Does age of the sperm donor influence live birth outcome in assisted reproduction? *Hum Reprod*, 31(3), 582-590. doi:10.1093/humrep/dev331
- Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., Tigges, J., & Freundl, G. (2005). Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod*, *20*(5), 1144-1147. doi:10.1093/humrep/deh870
- Greenhall, E., & Vessey, M. (1990). The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil Steril*, *54*(6), 978-983.
- Gregory, M., & Cyr, D. G. (2014). The blood-epididymis barrier and inflammation. Spermatogenesis, 4(2), e979619. doi:10.4161/21565562.2014.979619
- Grosshans, H., & Filipowicz, W. (2008). Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature*, 451(7177), 414-416. doi:10.1038/451414a
- Gurtan, A. M., Lu, V., Bhutkar, A., & Sharp, P. A. (2012). In vivo structure-function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs. *RNA*, *18*(6), 1116-1122. doi:10.1261/rna.032680.112
- Gyorgy, B., Szabo, T. G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., . . . Buzas, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci, 68*(16), 2667-2688. doi:10.1007/s00018-011-0689-3
- Hermo, L., Dworkin, J., & Oko, R. (1988). Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am J Anat, 183*(2), 107-124. doi:10.1002/aja.1001830202
- Hinton, B. T., Galdamez, M. M., Sutherland, A., Bomgardner, D., Xu, B., Abdel-Fattah, R., & Yang, L. (2011). How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum? J Androl, 32(6), 558-564. doi:10.2164/jandrol.111.013029
- Hristov, M., Erl, W., Linder, S., & Weber, P. C. (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, *104*(9), 2761-2766. doi:10.1182/blood-2003-10-3614
- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev, 91*(1), 119-149. doi:10.1152/physrev.00059.2009
- Jelinsky, S. A., Turner, T. T., Bang, H. J., Finger, J. N., Solarz, M. K., Wilson, E., . . . Johnston, D. S. (2007). The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental

gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biol Reprod*, *76*(4), 561-570. doi:10.1095/biolreprod.106.057323

- Jodar, M., Sendler, E., Moskovtsev, S. I., Librach, C. L., Goodrich, R., Swanson, S., ... Krawetz, S. A. (2015). Absence of sperm RNA elements correlates with idiopathic male infertility. *Sci Transl Med*, 7(295), 295re296. doi:10.1126/scitranslmed.aab1287
- Jones, J., Horne, G., & Fitzgerald, C. (2012). Who needs ICSI? A nationwide UK survey on ICSI use. *Hum Fertil (Camb)*, *15*(3), 144-149. doi:10.3109/14647273.2012.720051
- Jorgensen, N., Andersen, A. G., Eustache, F., Irvine, D. S., Suominen, J., Petersen, J. H., ... Skakkebaek, N. E. (2001). Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod*, 16(5), 1012-1019.
- Joseph, A., Shur, B. D., & Hess, R. A. (2011). Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biol Reprod*, 84(2), 207-217. doi:10.1095/biolreprod.110.087353
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., . . . European Association of Urology Working Group on Male, I. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol, 62*(2), 324-332. doi:10.1016/j.eururo.2012.04.048
- Kim, B., & Breton, S. (2016). The MAPK/ERK-Signaling Pathway Regulates the Expression and Distribution of Tight Junction Proteins in the Mouse Proximal Epididymis. *Biol Reprod*, 94(1), 22. doi:10.1095/biolreprod.115.134965
- Kim, Y. K., & Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*, 26(3), 775-783. doi:10.1038/sj.emboj.7601512
- Korbakis, D., Schiza, C., Brinc, D., Soosaipillai, A., Karakosta, T. D., Legare, C., . . . Drabovich, A. P. (2017). Preclinical evaluation of a TEX101 protein ELISA test for the differential diagnosis of male infertility. *BMC Med*, 15(1), 60. doi:10.1186/s12916-017-0817-5
- Lacamara, C., Ortega, C., Villa, S., Pommer, R., & Schwarze, J. E. (2017). Are children born from singleton pregnancies conceived by ICSI at increased risk for congenital malformations when compared to children conceived naturally? A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assist Reprod*, 21(3), 251-259. doi:10.5935/1518-0557.20170047
- Landthaler, M., Yalcin, A., & Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol, 14*(23), 2162-2167. doi:10.1016/j.cub.2004.11.001

- Lasser, C., Alikhani, V. S., Ekstrom, K., Eldh, M., Paredes, P. T., Bossios, A., . . . Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med*, 9, 9. doi:10.1186/1479-5876-9-9
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., . . . Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419. doi:10.1038/nature01957
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23(20), 4051-4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
- Legare, C., Berube, B., Boue, F., Lefievre, L., Morales, C. R., El-Alfy, M., & Sullivan, R. (1999). Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol Reprod Dev*, 52(2), 225-233. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199902)52:2<225::AID-MRD14>3.0.CO;2-M
- Levine, H., Jorgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., . . . Swan, S. H. (2017). Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*, 1-14. doi:10.1093/humupd/dmx022
- Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7), 787-798.
- Lewis, S. E. (2007). Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*, 134(1), 31-40. doi:10.1530/REP-07-0152
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 7(3), 789-804. doi:10.7150/thno.18133
- Liu, F. J., Liu, X., Han, J. L., Wang, Y. W., Jin, S. H., Liu, X. X., . . . Wang, W. J. (2015). Aged men share the sperm protein PATE1 defect with young asthenozoospermia patients. *Hum Reprod*, 30(4), 861-869. doi:10.1093/humrep/dev003
- Liu, Y., Qu, F., Cao, X., Chen, G., Guo, Q., Ying, X., . . . Ding, Z. (2012). Con A-binding protein Zn-alpha2-glycoprotein on human sperm membrane is related to acrosome reaction and sperm fertility. *Int J Androl, 35*(2), 145-157. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01195.x
- Lu, J. C., Huang, Y. F., & Lu, N. Q. (2010). [WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: its applicability to andrology laboratories in China]. *Zhonghua Nan Ke Xue, 16*(10), 867-871.
- M.Sergerie, G. L., L.Bujan, F.Bissonnette and G.Bleau. (2005). Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reproduction*, 20, 3446–3451. doi:10.1093
- Manders, M., McLindon, L., Schulze, B., Beckmann, M. M., Kremer, J. A., & Farquhar, C. (2015). Timed intercourse for couples trying to conceive. *Cochrane Database Syst Rev*(3), CD011345. doi:10.1002/14651858.CD011345.pub2
- Margalit, M., Yogev, L., Yavetz, H., Lehavi, O., Hauser, R., Botchan, A., ... Kleiman, S. E. (2012). Involvement of the prostate and testis expression (PATE)-like proteins in sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod*, 27(5), 1238-1248. doi:10.1093/humrep/des064
- Marrone, A. K., Stolz, D. B., Bastacky, S. I., Kostka, D., Bodnar, A. J., & Ho, J. (2014). MicroRNA-17~92 is required for nephrogenesis and renal function. J Am Soc Nephrol, 25(7), 1440-1452. doi:10.1681/ASN.2013040390
- Martinez-Heredia, J., de Mateo, S., Vidal-Taboada, J. M., Ballesca, J. L., & Oliva, R. (2008). Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod*, 23(4), 783-791. doi:10.1093/humrep/den024
- Mathieu, C., Guerin, J. F., Cognat, M., Lejeune, H., Pinatel, M. C., & Lornage, J. (1992). Motility and fertilizing capacity of epididymal human spermatozoa in normal and pathological cases. *Fertil Steril*, *57*(4), 871-876.
- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*, 73(10), 1907-1920. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006
- Maxson, M. E., & Grinstein, S. (2014). The vacuolar-type H(+)-ATPase at a glance more than a proton pump. *J Cell Sci, 127*(Pt 23), 4987-4993. doi:10.1242/jcs.158550
- Mbizvo, M. T., d'Arcangues, C., Van Look, P. F., & Benagiano, G. (2012). 40 years of innovation in sexual and reproductive health. *Lancet*, *380*(9843), 705-706. doi:10.1016/S0140-6736(12)61025-3
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15(2), 185-197. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007
- Mendiola, J., Torres-Cantero, A. M., Moreno-Grau, J. M., Ten, J., Roca, M., Moreno-Grau, S., & Bernabeu, R. (2009). Food intake and its relationship with semen quality: a case-control study. *Fertil Steril*, 91(3), 812-818. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.01.020
- Milardi, D., Grande, G., Vincenzoni, F., Giampietro, A., Messana, I., Castagnola, M., . . . Pontecorvi, A. (2014). Novel biomarkers of androgen deficiency from seminal plasma profiling using high-resolution mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(8), 2813-2820. doi:10.1210/jc.2013-4148

Rapport-grastuit.com LE NUMERO I MONDIAL DU MÉMOIRES

- Milardi, D., Grande, G., Vincenzoni, F., Messana, I., Pontecorvi, A., De Marinis, L., ... Marana, R. (2012). Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril*, 97(1), 67-73 e61. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.10.013
- Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L., Karlsson, J. M., . . . Morelli, A. E. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3), 756-766. doi:10.1182/blood-2011-02-338004
- Moskovtsev, S. I., Jarvi, K., Legare, C., Sullivan, R., & Mullen, J. B. (2007). Epididymal P34H protein deficiency in men evaluated for infertility. *Fertil Steril*, *88*(5), 1455-1457. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.12.053
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*, *3*. doi:10.3402/jev.v3.24641
- Nagalakshmi, V. K., Ren, Q., Pugh, M. M., Valerius, M. T., McMahon, A. P., & Yu, J. (2011). Dicer regulates the development of nephrogenic and ureteric compartments in the mammalian kidney. *Kidney Int*, 79(3), 317-330. doi:10.1038/ki.2010.385
- Nana., P. N., Wandji., J. C., Fomulu., J. N., Mbu., R. E., Leke., R. J. I., & Woubinwou., M. J. (2011). Aspects Psycho-Sociaux chez Patients Infertiles à la Maternite Principale de l'Hopital Central de Yaoundé, Cameroun. *Clinics in Mother and Child Health*, 8, 1-5. doi:10.4303/cmch/C100601
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, 2(4), 279-289. doi:10.1105/tpc.2.4.279
- Nygren, K. G., Sullivan, E., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Adamson, G. D., & de Mouzon, J. (2011). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2003. *Fertil Steril*, 95(7), 2209-2222, 2222 e2201-2217. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.03.058
- Oliva, A., Spira, A., & Multigner, L. (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod*, *16*(8), 1768-1776.
- Ozsolak, F., Poling, L. L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X. S., Roeder, R. G., . . . Fisher, D. E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*, 22(22), 3172-3183. doi:10.1101/gad.1706508
- Pan, M. M., Hockenberry, M. S., Kirby, E. W., & Lipshultz, L. I. (2018). Male Infertility Diagnosis and Treatment in the Era of In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Med Clin North Am, 102*(2), 337-347. doi:10.1016/j.mcna.2017.10.008

- Papaioannou, M. D., Pitetti, J. L., Ro, S., Park, C., Aubry, F., Schaad, O., . . . Nef, S. (2009). Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, 326(1), 250-259. doi:10.1016/j.ydbio.2008.11.011
- Paulick, M. G., & Bertozzi, C. R. (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry*, 47(27), 6991-7000. doi:10.1021/bi8006324
- Philley, J. V., Kannan, A., Griffith, D. E., Devine, M. S., Benwill, J. L., Wallace, R. J., Jr., ... Dasgupta, S. (2017). Exosome secretome and mediated signaling in breast cancer patients with nontuberculous mycobacterial disease. *Oncotarget*, 8(11), 18070-18081. doi:10.18632/oncotarget.14964
- Pols, M. S., & Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*, 315(9), 1584-1592. doi:10.1016/j.yexcr.2008.09.020
- Qu, F., Ying, X., Guo, W., Guo, Q., Chen, G., Liu, Y., & Ding, Z. (2007). The role of Znalpha2 glycoprotein in sperm motility is mediated by changes in cyclic AMP. *Reproduction*, 134(4), 569-576. doi:10.1530/REP-07-0145
- Ragusa, M., Barbagallo, C., Cirnigliaro, M., Battaglia, R., Brex, D., Caponnetto, A., . . . Purrello, M. (2017). Asymmetric RNA Distribution among Cells and Their Secreted Exosomes: Biomedical Meaning and Considerations on Diagnostic Applications. *Front Mol Biosci, 4*, 66. doi:10.3389/fmolb.2017.00066
- Rajesh, A., & Yenugu, S. (2015). Effect of immunization against prostate- and testisexpressed (PATE) proteins on sperm function and fecundity in the rat. *J Reprod Immunol*, 110, 117-129. doi:10.1016/j.jri.2015.02.009
- Rajesh, A., & Yenugu, S. (2017). shRNA mediated ablation of prostate and testis expressed (Pate) messenger RNA results in impaired sperm function and fertility. *Andrology*, 5(3), 541-547. doi:10.1111/andr.12321
- Rao, A. R., Motiwala, H. G., & Karim, O. M. (2008). The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int, 101*(1), 5-10. doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07138.x
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200(4), 373-383. doi:10.1083/jcb.201211138
- Reilly, J. N., McLaughlin, E. A., Stanger, S. J., Anderson, A. L., Hutcheon, K., Church, K., . . . Nixon, B. (2016). Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. *Sci Rep*, *6*, 31794. doi:10.1038/srep31794
- Ribeiro, C. M., Ferreira, L. G., Thimoteo, D. S., Smith, L. B., Hinton, B. T., & Avellar, M. C. (2016). Novel androgen-induced activity of an antimicrobial beta-defensin:

Regulation of Wolffian duct morphogenesis. *Mol Cell Endocrinol, 442*, 142-152. doi:10.1016/j.mce.2016.12.016

- Riedel, H. H., Hubner, F., Ensslen, S. C., Bieniek, K. W., & Grillo, M. (1989). Minimal andrological requirements for in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 4(8 Suppl), 73-77.
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K. M., & Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 35(17), 5944-5953. doi:10.1093/nar/gkm641
- Robaire, B., & Hinton, B. (2002). *The Epididymis From Molecules to Clinical Practice*: Kluwer Academic / Plenium Publishers.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 14(10A), 1902-1910. doi:10.1101/gr.2722704
- Rodriguez, C. M., Kirby, J. L., & Hinton, B. T. (2001). Regulation of gene transcription in the epididymis. *Reproduction*, *122*(1), 41-48.
- Rojas, F. J., La, A. T., Ord, T., Patrizio, P., Balmaceda, J. P., Silber, S. J., & Asch, R. H. (1992). Penetration of zona-free hamster oocytes using human sperm aspirated from the epididymis of men with congenital absence of the vas deferens: comparison with human in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 58(5), 1000-1005.
- Rolland, A. D., Lavigne, R., Dauly, C., Calvel, P., Kervarrec, C., Freour, T., ... Pineau, C. (2013). Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Hum Reprod*, 28(1), 199-209. doi:10.1093/humrep/des360
- RZ., M. J. a. G. (1951). The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertility and Sterility*, 187-204.
- Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., & Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 82(3), 323-330.
- Shum, W. W., Da Silva, N., McKee, M., Smith, P. J., Brown, D., & Breton, S. (2008). Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*, 135(6), 1108-1117. doi:10.1016/j.cell.2008.10.020
- Sinclair, S. (2000). Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Altern Med Rev, 5*(1), 28-38.
- Smith, J. D., & Hearn, G. W. (1979). Ultrastructure of the apocrine-sebaceous anal scent gland of the woodchuck, Marmota monax: evidence for apocrine and mecocrine secretion by a single cell type. *Anat Rec, 193*(2), 269-291. doi:10.1002/ar.1091930208

- Smith, S., Pfeifer, S. M., & Collins, J. A. (2003). Diagnosis and management of female infertility. *JAMA*, 290(13), 1767-1770. doi:10.1001/jama.290.13.1767
- Stammler, A., Hau, T., Bhushan, S., Meinhardt, A., Jonigk, D., Lippmann, T., . . . Middendorff, R. (2015). Epididymitis: ascending infection restricted by segmental boundaries. *Hum Reprod*, 30(7), 1557-1565. doi:10.1093/humrep/dev112
- Starita-Geribaldi, M., Roux, F., Garin, J., Chevallier, D., Fenichel, P., & Pointis, G. (2003). Development of narrow immobilized pH gradients covering one pH unit for human seminal plasma proteomic analysis. *Proteomics*, 3(8), 1611-1619. doi:10.1002/pmic.200300493
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6), 463-466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177
- Sullivan, R. (2004). Male fertility markers, myth or reality. *Anim Reprod Sci, 82-83*, 341-347. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.05.007
- Sullivan, R. (2015). Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian J Androl, 17*(5), 726-729. doi:10.4103/1008-682X.155255
- Sullivan, R., & Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update*, 22(5), 574-587. doi:10.1093/humupd/dmw015
- Sullivan, R., & Saez, F. (2013). Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*, 146(1), R21-35. doi:10.1530/REP-13-0058
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., & Frenette, G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis*, 35(1), 1-10. doi:10.1016/j.bcmd.2005.03.005
- Talluri, T. R., Mal, G., & Ravi, S. K. (2017). Biochemical components of seminal plasma and their correlation to the fresh seminal characteristics in Marwari stallions and Poitou jacks. *Vet World*, *10*(2), 214-220. doi:10.14202/vetworld.2017.214-220
- Thery, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, *9*(8), 581-593. doi:10.1038/nri2567
- Thery, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2(8), 569-579. doi:10.1038/nri855
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 39(16), 7223-7233. doi:10.1093/nar/gkr254

- Turner, T. T. (2008). De Graaf's thread: the human epididymis. *J Androl, 29*(3), 237-250. doi:10.2164/jandrol.107.004119
- Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N., . . . Sanchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*, 4, 2980. doi:10.1038/ncomms3980
- Vloeberghs, V., Verheyen, G., Haentjens, P., Goossens, A., Polyzos, N. P., & Tournaye, H. (2015). How successful is TESE-ICSI in couples with non-obstructive azoospermia? *Hum Reprod*, 30(8), 1790-1796. doi:10.1093/humrep/dev139
- Vojtech, L., Woo, S., Hughes, S., Levy, C., Ballweber, L., Sauteraud, R. P., . . . Hladik, F. (2014). Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*, 42(11), 7290-7304. doi:10.1093/nar/gku347
- Wang, J., Wang, J., Zhang, H. R., Shi, H. J., Ma, D., Zhao, H. X., . . . Li, R. S. (2009). Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl*, 11(4), 484-491. doi:10.1038/aja.2009.26
- Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., & Galas, D. J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 38(20), 7248-7259. doi:10.1093/nar/gkq601
- Welliver, C., Benson, A. D., Frederick, L., Leader, B., Tirado, E., Feustel, P., ... Kohler, T. S. (2016). Analysis of semen parameters during 2 weeks of daily ejaculation: a first in humans study. *Transl Androl Urol*, 5(5), 749-755. doi:10.21037/tau.2016.08.20
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 11(3), 228-234. doi:10.1038/ncb0309-228
- Witwer, K. W., Buzas, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lasser, C., Lotvall, J., . . . Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*, 2. doi:10.3402/jev.v2i0.20360
- Wolf-Bernhard Schill, R. M., Frank H. Comhaire, Timothy B. Hargreave. (2008). *Traité d'andrologie à l'usage des cliniciens* (Springer Ed.).
- World Health Organization. (1993). WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge, UK: Cambridge, University Press.
- World Health Organization. (2018a). Sexual and reproductive health. Retrieved from <u>http://www.who.int/reproductivehealth/about\_us/en/</u>

- World Health Organization. (2018b). Who we are, what we do. Retrieved from <u>http://www.who.int/about/en/</u>
- Wu, J., Bao, J., Kim, M., Yuan, S., Tang, C., Zheng, H., . . . Yan, W. (2014). Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(28), E2851-2857. doi:10.1073/pnas.1407777111
- Yamakawa, K., Yoshida, K., Nishikawa, H., Kato, T., & Iwamoto, T. (2007). Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patients. *J Androl*, 28(6), 858-865. doi:10.2164/jandrol.107.002824
- Yanagimachi, R., Kamiguchi, Y., Mikamo, K., Suzuki, F., & Yanagimachi, H. (1985). Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *Am J Anat, 172*(4), 317-330. doi:10.1002/aja.1001720406
- Yentrapalli, R., Merl-Pham, J., Azimzadeh, O., Mutschelknaus, L., Peters, C., Hauck, S. M., . . . Moertl, S. (2017). Quantitative changes in the protein and miRNA cargo of plasma exosome-like vesicles after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 93(6), 569-580. doi:10.1080/09553002.2017.1294772
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17(24), 3011-3016. doi:10.1101/gad.1158803
- Yu, Y., Zhao, C., Lv, Z., Chen, W., Tong, M., Guo, X., . . . Sha, J. (2011). Microinjection manipulation resulted in the increased apoptosis of spermatocytes in testes from intracytoplasmic sperm injection (ICSI) derived mice. *PLoS One*, 6(7), e22172. doi:10.1371/journal.pone.0022172
- Zhang, J., Liu, Q., Zhang, W., Li, J., Li, Z., Tang, Z., . . . Zhang, Y. (2010). Comparative profiling of genes and miRNAs expressed in the newborn, young adult, and aged human epididymides. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42(2), 145-153.
- Zhao, C., Huo, R., Wang, F. Q., Lin, M., Zhou, Z. M., & Sha, J. H. (2007). Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertil Steril*, 87(2), 436-438. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.06.057
- Zhou, C. X., Zhang, Y. L., Xiao, L., Zheng, M., Leung, K. M., Chan, M. Y., ... Chan, H. C. (2004). An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat Cell Biol*, 6(5), 458-464. doi:10.1038/ncb1127

## ANNEXE



**S1 Fig. RNA integrity assessment.** RNA integrity numbers were obtained with the Agilent 2100 Bioanalyzer for all samples used in the present microarray study from control (Ctrl) and Dicer1 cKO (cKO) mice.

# Supplementary Table 1 : Sequences and properties of primers used for qRT-PCR on target transcripts

Transcripts	Sequences (5'-3')	Optimal annealing Temperature (C°)	Efficiency
Azan1	Forward primer : GGGTCTCACACCTTTCAGGG	64.7	2.1
Azgpi	Reverse primer : TCGCTGCACGTAGACCTTTT	04.7	
Poto4	Forward primer : TCCATGATGGCCTGAGATCC	60.4	2.0
rale4	Reverse primer : AGACATTGCAAACTGGAAAAGCA	00.4	
Ovet2h	Forward primer : GGCGGTGTTTGAAGTGAACC	64.7	2.1
Oxcizb	Reverse primer : GGGCTCCTCAAGCATCAAGT	04.7	
Ddal2	Forward primer : TGAAGAGATGGTGTTGCGCT	57.0	1.8
Paciz	Reverse primer : GCTTTCCATTCCTGTAACCGC	57.2	
Condh	Forward primer : GAGAGTGTTTCCTCGTCCCG	54.0	2.0
Gapan	Reverse primer :ACTGTGCCGTTGAATTTGCC	54.0	



S2 Fig. Microarray quality control plots for miRNAs (A) and whole transcript (B).

Supplementary Table 2 : Sequences and properties of primers used for qRT-PCR on target microRNAs.

miRNAs sequences (www.MiRBase.org)	Sequence (5'-3')				
Mmu-miR-191-5p :	Stem-loop RT primer : GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCAGCTG				
CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG	Forward primer : GCGGCGGCAACGGAATCCCAAAAG				
Mmu-miR-138-1-5p :	Stem-loop RT primer : GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCGGCCT				
AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	Forward primer : GCGGCGGAGCTGGTGTTGTGAATC				
Mmu-miR-204-3p :	Stem-loop RT primer : GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACACGTCC				
GCUGGGAAGGCAAAGGGACGU	Forward primer : GCGGCGGGCTGGGAAGGCAAAG				
Mmu-miR-375-3p :	Stem-loop RT primer : GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACTCACGC				
UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	Forward primer : GCGGCGGTTTGTTCGTTCGGCTC				
Mmu-miR-187-3p :	Stem-loop RT primer :GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCCGGCT				
UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG	Forward primer : GCGGCGGTCGTGTCTTGTGTTGC				
Mmu-miR-210-3p :	Stem-loop RT primer :GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACTCAGCC				
CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	Forward primer : GCGGCGGCTGTGCGTGTGACAGC				
Mmu-miR-672-5p : ACACACAGUCACUAUCUUCGA	Stem-loop RT primer :GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACTCACAC Forward primer : GCGGCGGTGAGGTTGGTGTACTGT				
Mmu-miR-204-5p :	Stem-loop RT primer :GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAGGCAT				
UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	Forward primer : GCGGCGGTTCCCTTTGTCATCCT				
Mmu-miR-196b-5p	Stem-loop RT primer :GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCCCTTC				
UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG	Forward primer : GCGGCGGTAGGTAGTTTCCTGTT				
Mmu-miR-205-5p	Stem-loop RT primer :GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCAGACT				
Mmu-miR-133a-3n					
UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG					
Mmu-let-7b-5p :	Stem-loop RT primer : GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAACCAC				
UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	Forward primer : GCGGCGGTGAGGTAGTAGGTTGT				
Universal reverse primer	GTGCAGGGTCCGAGGT				



**S3 Fig. Quantitative dynamic range assessment of AZGP1 by western-blot.** (A) Different protein concentrations from mouse epididymal extracts were loaded and blotted for AZGP1 and Beta-actin. (B) Protein band volumes were measured and plotted to assess protein dynamic ranges.

Rapport-grastuit.com LE NUMERO I MONDIAL DU MÉMOIRES



S4 Fig. Segment-specific expression of transcripts and miRNAs in control and Dicer1cKO mice. (A) According to microarray data, the defensin family in Control (Ctrl) and Dicer1 cKO mice follows the same segmented gene expression pattern as described in wild type mice (John- ston *et al*, 2005). For instance, Defb1,2,9,10 and 11 display a higher expression level in the cauda epididymis (Cau) of Ctrl and Dicer1 cKO mice compared to Defb13, 15, 19, 35 and rs1 that are more expressed in the corpus (Cor) epididymis. (B) Validation of Dicer1 expression in control and Dicer1 cKO mice epididymis by real-time PCR. Unpaired T-test;  $^{K-K-K-K-}$ : P<10<sup>-4</sup>; ns: not significant. (C) Expression level of miR-204-5p and miR-196 in Ctrl mice follows the same pattern as in wild-type mice described in Nixon *et al*, 2015.

ID	Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
1	Casp12, CD300LD, Clec2d (includes others), DDX58, DHX58, HES5, IFI16, IFI44, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT1B, IFN alpha/beta, IFN type 1, Ifnar, Iglv1, Integrin alpha 3 beta 1, Interferon-α Induced, IRF, Irgm1, ISGF3, MLKL, Mx1/Mx2, NFkB (complex), OAS2, OASL, PLK3, RAB3C, SOCS, Sp100, STAT2, STAT-1/2, Stat1-Stat2, Stat3-Stat3, ZBP1	37	23	Antimicrobial Response, Inflammatory Response, Infectious Diseases
2	2' 5' oas, ADAMTS4, ADAMTS5, Alpha catenin, BGN, CNN2, CTNNA2, ERK, FBN1, IFITM3, Ifn, IFN Beta, Ifn gamma, IGFBP4, IRF1, ISG15, JAK, LOXL1, MMR, MTORC2, MYOF, NfkB1-RelA, Oas, OAS3, Oas1b, RHOC, SECTM1, SOCS3, STAT1/3/5 dimer, TCF, TMEM173, TMSB4, TNC, USP18, XAF1	34	21	Antimicrobial Response, Inflammatory Response, Infectious Diseases
3	Cytokeratin, Fc gamma receptor, HLA-E, HLA-G, IER3, IgG2a, IgG2b, Ikb, Ikk (family), IL-2R, IL12 (complex), IL2RA, immune complex, JAK3, KLF6, KRT4, KRT19, LEFTY2, Ly6a (includes others), MAP3K14, MCAM, MHC Class I (complex), MHC CLASS I (family), MRC1, NFkB (family), PI3K (complex), PI3K p85, PPP1R18, RAB3B, Tap, TAP1, Tnf receptor, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFSF10	30	19	Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function
4	Aldh1a7, APC (complex), Caspase 3/7, Cdc2, CDC6, CDC20, CDT1, CKAP2, Cyclin A, Cyclin E, E2f, E2F8, histone deacetylase, Histone h4, IL18R1, Jnk, Mcm, MCM3, MCM5, MCM6, MELK, N-cor, Nuclear factor 1, PLK1, PRMT8, PXR ligand-PXR-Retinoic acid-RXRα, Rb, Rxr, SEPT9, SLCO1B3, SP110, SULT2A1, SWI-SNF, thymidine kinase, TK1	28	18	Cell Cycle, Cellular Movement, Cellular Assembly and Organization
5	14-3-3, Actin, ACTN1, c-Src, CACNA2D2, calpain, CaMKII, CD14, CLDN4, Ear2 (includes others), EXO1, F Actin, Fgf, Fibrinogen, FOSL2, GNMT, Hsp27, Integrin, Integrin alpha 5 beta 1, Integrinî±, ITGA5, Ldh (complex), Pdgf (complex), Pkc(s), Rac, RACGAP1, Raf, SLC14A2, SLC1A1, SRR, TH, THBS1, TLR2, TPSAB1/TPSB2, VASP	28	18	Carbohydrate Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Cell-To-Cell Signaling and Interaction
6	AGPAT2, Ap1, BCL3, Cbp/p300, CCND1, CSNK1E, estrogen receptor, EZH2, Gsk3, HISTONE, IgG, IgG1, IL12 (family), Immunoglobulin, Insulin, Interferon alpha, LOXL2, NCAPH, Nr1h, NUDT5, P38 MAPK, p70 S6k, PHF11, phosphatase, PLPP6, PTPRU, RARA, RTP4, SBNO2, Slfn2, SLFN13, Smad2/3, Tgf beta, TRIL, UHRF1	27	18	Cancer, Hematological Disease, Immunological Disease
7	BMP1, COL1A1, COL4A2, COL5A1, COL5A2, collagen, Collagen type I, Collagen type II, Collagen type II, Collagen type IV, Collagen type V, Collagen type VI, Collagen type VI, Collagen(s), ENG, ERK1/2, ETS, Fibrin, gelatinase, GPIIB-IIIA, ITGA2, Laminin, Laminin1, LOX, LRG1, NID1, Pdgf Ab, PDGFB, PIGF, PLAT, POSTN, PROS1, SERPINH1, SPARC, THY1	27	18	Dermatological Diseases and Conditions, Inflammatory Disease, Skeletal and Muscular Disorders
8	ADCY, ADCY2, ADRB, Alpha tubulin, AURKA, Beta Tubulin, Calmodulin, CAMK1, Ck2, Creb, EFNB2, FSH, G protein, G protein alphai, Gpcr, GSTM4, Hdac, HELLS, IQGAP3, KIF18B, NDC80, NECAB1, NMDA Receptor, PTGER2, Ras, SASS6, STIL, TUBA1A, TUBA1C, TUBB, TUBB6, tubulin (complex), tubulin (family), UBAC2, Vegf	24	18	Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease
9	26s Proteasome, AMPK, ATAD2, ATPase, Calcineurin protein(s), caspase, Cg, CHST8, CMPK2, cytochrome C, DTX3L, EGF, Hsp70, Hsp90, IL1, INTS1, Lh, Mek, Nos, NOS1, Oasl2, P glycoprotein, PARP, PARP12, PARP14, PP2A, PPAT, PRKAA, PTGS2, RNF213, STAT1, SYN2, TNFRSF12A, TOR3A, Ubiquitin	24	17	Endocrine System Development and Function, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry
10	ANXA3, APP, BACE2, beta-estradiol, BHLHB9, BLOC1S2, C4orf33, CATIP, CDCA7, CENPI, COL14A1, FUCA1, GABRP, KRT83, KRTAP10-7, LYN, MOBP, NAV1, NDUFB11, OGDH, Pate4, phosphatidylserine, PRR13, RNF32, RTP4, SLC6A20, SLC02B1, SLITRK4, TMA16, TREML2, TSPYL5, UBL3, VAC14, VWA5A, ZNF2	22	16	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Movement, Hematological System Development and Function

**S5 Fig. Top ten networks significantly modified in the corpus epididymis of Dicer1 cKO compared to control mice according to IPA analysis.** Only probe-sets displaying a fold change >1.5 and a p-value <0.01 were considered. Total of probe-sets included = 426.

ID	Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
1	Akt, Ap1, BCL3, caspase, CCND1, CD3, Collagen type I, Collagen(s), ERK, ERK1/2, estrogen receptor, Focal adhesion kinase, FSH, GDF11, HELLS, Immunoglobulin, KRT19, Mapk, Mek, NOS1, P38 MAPK, Pdgf (complex), PDGF BB, PI3K (complex), PIK3AP1, Pkc(s), Ras, SLC1A1, Smad2/3, SOCS2, TCR, THBS1, TNC, Vegf, XAF1	30	12	Cell Death and Survival, Cancer, Organismal Injury and Abnormalities
2	20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 26s Proteasome, ADAMTS5, ADCYAP1R1, ALDH1A3, Androgen-AR, ANPEP, arachidonic acid, ATF1, CYP2U1, HERC3, IFI35, IFNG, indican, Interferon alpha, IRGM, KCND1, Laminin1, NFE2L2, NFkB (complex), PAPPA2, Pka, PLEK, PLPP6, PRKCB, PRKCH, RHBDL1, SLC1A1, SLC7A5, Slfn1, SLFN13, TNFAIP6, TNFRSF10A, tretinoin, TUBB6	22	9	Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Cell Death and Survival
3	Pate4, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine	3	1	Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Cell-To-Cell Signaling and Interaction

**S6 Fig. Top networks significantly modified in the corpus epididymis of Dicer1 cKO com- pared to control mice according to IPA analysis.** Only probe-sets displaying a fold change >2 and a p-value <0.001 were considered. Total of probe-sets included = 24.

ID	Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
1	26s Proteasome, AKAP3, AKAP4, Akt, AZGP1, AZIN2, Calmodulin, DNAJB7, DNAJB8, DNAJC5G, GGN, HDAC1, HSP, Hsp90, Hsp22/Hsp40/Hsp90, HSPA1L, HSPA4L, HSPB9, KLHL10, MAK, MLF1, OAZ3, ODF1, ODF2, PAPOLB, PGK2, PHOSPHO1, PPEF1, Prm1, SHCBP1L, SPA17, Tnp1, TSKS, TSSK2, TSSK6	58	29	Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease, Cellular Development
2	BTG2, caspase, CLEC4C, Collagen(s), CTGF, CYR61, DDX4, E2f, ERK1/2, Fascin, FBP1, FSCN3, FSH, GAPDHS, GK, LDL, LPIN1, LRAT, Mek, NFAT (complex), NR4A1, OTUB2, PDGF BB, PEBP4, PGAM2, PIWIL1, Pkc(s), PRKCQ, Proinsulin, Rac, Ras, RSPH6A, S100A8, SOCS7, SPZ1	38	21	Cellular Assembly and Organization, Cellular Movement, Embryonic Development
3	ANKAR, CARM1, CHIC2, CLPB, CNNM3, CUL3, DNAJC14, ELAVL1, FRS3, GDI2, GLT1D1, GTSF1, HSPA5, HSPB1, HSPB7, IQCB1, KLHL3, LDHAL6B, LOC285423, LRRC8B, METTL21C, MTIF2, NAPSA, NPHP4, PACS2, Ppp1cc, REEP6, SPATA7, SPERT, Sva, SYCE1, TEX33, TMEM56, WDR77, YWHAZ	24	15	Cellular Function and Maintenance, Organ Development, Tissue Development
4	ALB, APP, C9orf24, CABS1, CCT6B, DNAH1, DNAH5, DNAH6, DNAH8, DNAH9, DNAH10, DNAH11, DNAH12, DNAH14, DNAL1, DNAL11, FAM71E2, PLBD1, PSRC1, SEPT12, SH3GL3, SLFNL1, SPAG6, SPAG16, SPAG17, SPATA4, TMEM53, TRAPPC1, TRAPPC3, TRAPPC4, TRAPPC5, TRAPPC9, TRAPPC10, TRAPPC2L, TTLL6	23	15	Cellular Movement, Reproductive System Development and Function, Cancer
5	AF366264 (includes others), ALS2CR12, BBOF1, beta-estradiol, CCNE2, CEP112, CKS1B, CP, ENPP2, EZH2, H1fnt, HES5, HIC1, HOXA10, JAK2, KRT4, KRT19, LTF, Morc2b, MYBL1, PIWIL1, POLE2, Poteg, PPP1R13L, Rian, SF3B2, SH3BP4, SMPDL3A, SPATA18, STARD6, TCTE3, TNFAIP8, TP53,	23	15	Cancer, Hematological Disease, Immunological Disease
6	1700003E24Rik/1700019M22Rik, 4933415F23Rik, ABCC1, ADAM2, Adam3, Adam1a, CCNB1IP1, CEP295NL, CHODL, CLGN, COL16A1, Cox8c, FAM71F1, FBLIM1, FhI4, FHL5, FIGLA, FOS, GALNTL5, GDE1, GSG1, HTT, IPMK, ITGA9, ITGB1, LTF, OAZ3, PDILT, PMFBP1, SRF, Tnp1, Tnp2, TRAPPC3, UBQLN3, YBX2	21	14	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Reproductive System Development and Function, Cellular Development
7	Ca2+, CCT5, CDC20, CDK5, CPVL, CREM, DUSP14, ENTPD2, FABP9, fructose 1, 6 biphosphatase, Fscb, Hspg, LTA, M1AP, MICU1, MORN3, NAPSA, Oxct2a/Oxct2b, Phk, PPP1R1A, PRG2, PRKACA, RMDN2, SPATC1, SPEM1, TAF7L, THEG, Tnp2, TRIP13, TUBA1A, TUBB4B, TUBGCP4, USP44, USP49, USP50	20	13	Cellular Movement, Reproductive System Development and Function, Organismal Injury and Abnormalities
8	ABCF1, ACSBG2, ANKEF1, BRAP, C10orf90, C16orf78, CAND1, CCDC105, COPS5, DSP, FBXO44, GDI2, GTPBP4, HYDIN, IKBIP, KDM1A, KHSRP, KIF27, MAPT, METTL21C, NT5C1B, PHF7, QRICH2, RPL9, SNAI1, SPATA21, SRPK1, STRBP, TEX35, TRMT61A, TTBK1, TTBK2, TUBA8, TUBB4B, UBC	18	13	Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Gastrointestinal Disease
9	2610318N02Rik, ABLIM3, ADAM2, ADAM18, ADAMTS4, ADAMTS7, ADAMTS12, Bex1, BRCC3, C10orf62, CATSPER4, CATSPERG, CCDC33, COMP, KRT19, KRTAP10-9, KRTAP4-12, LOC102724788/PRODH, LY6D, Metalloprotease, PAPPA, PAXIP1, PLSCR1, PPARG, SBSPON, SCG5, SOCS7, SPAG4, STAT5A, TGFB1, TRAF4, TTC23L, UBL4B, VASP, ZNF581	18	12	Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Gastrointestinal Disease
10	APOA1, ARG2, BLZF1, C12orf50, C1orf109, CCDC67, Cmtm2a, cyclic AMP, DGKH, DNAJC28, FANK1, GOLGA2, HNF4A, HRASLS5, HTR4, ICA1L, IL1B, JUN, KIFC3, LENG1, LMO1, LRRC6, LRRC46, OSBP, SPATA6, TAF7L, TBP, TCEANC, TCFL5, TFPT, TSSK3, TXNDC2, UQCC1, ZMYND10, ZNF572	18	12	Reproductive System Development and Function, Gene Expression, Endocrine System Disorders

**S7 Fig. Top ten networks significantly modified in the cauda epididymis of Dicer1 cKO compared to control mice according to IPA analysis.** Only probe-sets displaying a fold change >1.5 and a p-value <0.01 were considered. Total of probe-sets included = 513.



exo1\_prise2 2017-07-04 12-58-27

### exo1\_prise2 2017-07-04 12-58-27



Results

Mean:

Mode:

SD:

D10:

D50:

Stats: Merged Data

exo1\_prise2 2017-07-04 12-58-27 Error bars indicate + / -1 standard error of the mean

147.7 nm

135.0 nm

44.3 nm

102.3 nm

137.9 nm

#### Included Files

exo1\_prise2 2017-07-04 12-58-38 exo1\_prise2 2017-07-04 13-00-16 exo1\_prise2 2017-07-04 13-01-22

#### **Details**

#### NTA Version: NTA 3.1 Build 3.1.46 Script Used: Time Captured: Operator: Pre-treatment: Sample Name: Diluent: Remarks: Capture Settings Camera Type: Camera Level:

Slider Shutter: Slider Gain: FPS Number of Frames: Temperature: Viscosity: Dilution factor:

Detect Threshold: 4 Blur Size:

Analysis Settings

Auto Max Jump Distance: Auto: 8.5 - 9.2 pix

NTA 3.1 Build 3.1.46	D90:	200.5 nm			
Triplicate.txt					
12:58:27 04/07/2017	Stats: Mean +/- Standard Error				
nm	Mean:	147.4 +/- 1.8 nm			
qEV + Amicon 100K filter - D9 - exo1(26.06.17) ~	Mode:	134.5 +/- 2.8 nm			
	SD:	44.5 +/- 3.5 nm			
PBS	D10:	102.4 +/- 3.2 nm			
ecm 6	D50:	137.5 +/- 2.2 nm			
	D90:	199.7 +/- 2.3 nm			
	Concentration:	6.68e+009 +/- 5.01e+008 particles/ml			
		339.0 +/- 25.4 particles/frame			
CCD		287.7 +/- 19.3 centres/frame			
16					
1500					
680					
30.0					
900					
22.0 °C					
(Water) 1.0 cP					
Dilution not recorded					

Fig. S8 FValidation de la taille des exosomes. L'analyse de suivi de nanoparticules a été effectué avec un échantillon d'exosomes. L'échantillon a été mesuré 3 fois par la machine.