

Les spermatozoïdes ont-ils du nez ?

L'odorat peut être considéré comme le mode de sensibilité apparu le plus primitivement dans le monde animal. Les eucaryotes unicellulaires disposent en effet d'une batterie de chimiorécepteurs leur permettant de « sentir » la composition chimique du milieu environnant et d'adapter leur physiologie en conséquence. Ces dispositifs chimiosenseurs contrôlent entre autres la mobilité cellulaire, relayant ainsi le chimiotropisme, qui permet à la cellule de se déplacer afin d'assurer de façon optimale ses fonctions vitales, telles que la nutrition ou la reproduction. Dans ce dernier cadre, de nombreux eucaryotes unicellulaires disposent de « phéromones » leur permettant d'interagir à distance avec les individus de l'autre sexe [1]. Ces formes de communication « intergamétique » se retrouvent chez de nombreux invertébrés sous la forme d'un chimiotactisme des spermatozoïdes vers l'ovule. Ainsi chez l'oursin, des peptides synthétisés par l'ovule sont reconnus à la surface des spermatozoïdes par un récepteur de la famille des guanylyl cyclases. Il s'ensuit une cascade de transduction complexe aboutissant à la stimulation de la mobilité des spermatozoïdes, et par là, à leur attraction vers l'ovule [2]. Des arguments expérimentaux récents ont été apportés en faveur de l'existence d'un chimiotactisme du spermatozoïde chez certaines espèces de protochordés [3] et de vertébrés, en particulier chez l'homme [4]. Les mécanismes moléculaires sous-jacents en restent cependant mal connus. Les bases moléculaires de l'olfaction chez les vertébrés ont, quant à elles, été récemment révolutionnées par le clonage d'une famille multigénique codant pour des récepteurs olfactifs [5, 6]. Les membres de cette famille, dont le nombre est estimé à un millier chez les mammifères, présentent des caractéristiques structurales communes qui en font un sous-groupe particulier parmi les récepteurs couplés aux protéines G.

Nous avons pu montrer que certains membres de cette famille de récepteurs olfactifs étaient exprimés dans le testicule [7]. Des expériences de *Northern blot* ont démontré l'expression sélective de l'un de ces gènes (appelé *DTMT*) dans les spermatocytes et les spermatides [8]. Dans l'hypothèse où les protéines correspondant à ces gènes de récepteurs olfactifs seraient effectivement présentes et fonctionnelles à la surface des gamètes mâles, il serait tentant de spéculer qu'elles puissent jouer un rôle dans le chimiotactisme du spermatozoïde lors de la fécondation, avec d'importantes implications dans les domaines de la stérilité et de la contraception. Nous avons donc poussé plus loin nos investigations et tout d'abord tenté de déterminer si un même gène de récepteur olfactif est exprimé à la fois dans la muqueuse olfactive et le testicule, ou au contraire si l'expression dans ces deux tissus était mutuellement exclusive. Des expériences de protection à la RNase ont ainsi permis de montrer que seuls quelques membres de cette famille génique sont préférentiellement exprimés dans le testicule et que ce sous-groupe « testiculaire » n'est exprimé que faiblement dans la muqueuse olfactive [8]. D'autres gènes de récepteurs olfactifs pris au hasard ne sont quant à eux détectés qu'au sein de la muqueuse olfactive et pas dans le testicule. Ces résultats démontrent clairement que certains gènes de récepteurs olfactifs sont peu ou pas exprimés au niveau de leur site d'expression attendu (à savoir la muqueuse olfactive), le testicule constituant leur site d'expression principal. Ils montrent également que cette expression n'est pas le résultat d'une fuite transcriptionnelle générale au sein de ce tissu, car celle-ci devrait impliquer tous les membres de la famille des récepteurs olfactifs. Des expériences d'hybridation *in situ* réalisées chez la souris et le poisson-chat ont montré que chaque neurone olfactif n'exprime qu'un petit

nombre de récepteurs olfactifs différents [9, 10]. Nous ne savons pas encore à ce stade si les faibles quantités de transcrits détectés dans la muqueuse olfactive pour les gènes olfactifs « testiculaires » sont largement distribués (mais à très bas niveau) ou limités à un petit nombre de neurones olfactifs. Ce n'est que dans cette dernière hypothèse qu'une fonction pourrait leur être attribuée au sein du neuroépithélium olfactif.

La présence de transcrits spécifiques dans la lignée germinale mâle n'implique pas nécessairement que les protéines correspondantes soient effectivement traduites et fonctionnelles. Nous avons donc tenté de déterminer si la protéine correspondant à l'un de ces gènes était effectivement présente à la surface des cellules germinales, et à quel stade de leur maturation. Pour ce faire, des anticorps polyclonaux dirigés contre le produit du gène canin *DTMT* (dont les transcrits testiculaires sont particulièrement abondants) ont été utilisés dans diverses expériences d'immunodétection [8]. Celles-ci ont permis de caractériser le profil d'expression du récepteur *DTMT* et de le corréler aux particularités de la maturation spermatique chez le chien. Chez tous les mammifères, la spermiogenèse s'accompagne de l'élimination de la majeure partie du cytoplasme et des organites intracellulaires sous la forme d'un corps résiduel, phagocyté par les cellules de Sertoli. En outre, chez certains mammifères (dont le rat et le chien), une partie du cytoplasme du spermatide reste associée au spermatozoïde immature sous la forme d'une gouttelette cytoplasmique localisée à la jonction de la tête et du flagelle. Cette gouttelette migre ensuite le long de la pièce intermédiaire du flagelle au cours du transit épидидymaire, et est éliminée à ce niveau.

Nous avons pu détecter le récepteur olfactif *DTMT* au niveau des cellules germinales mâles à partir des stades les plus tardifs de la spermatogenèse

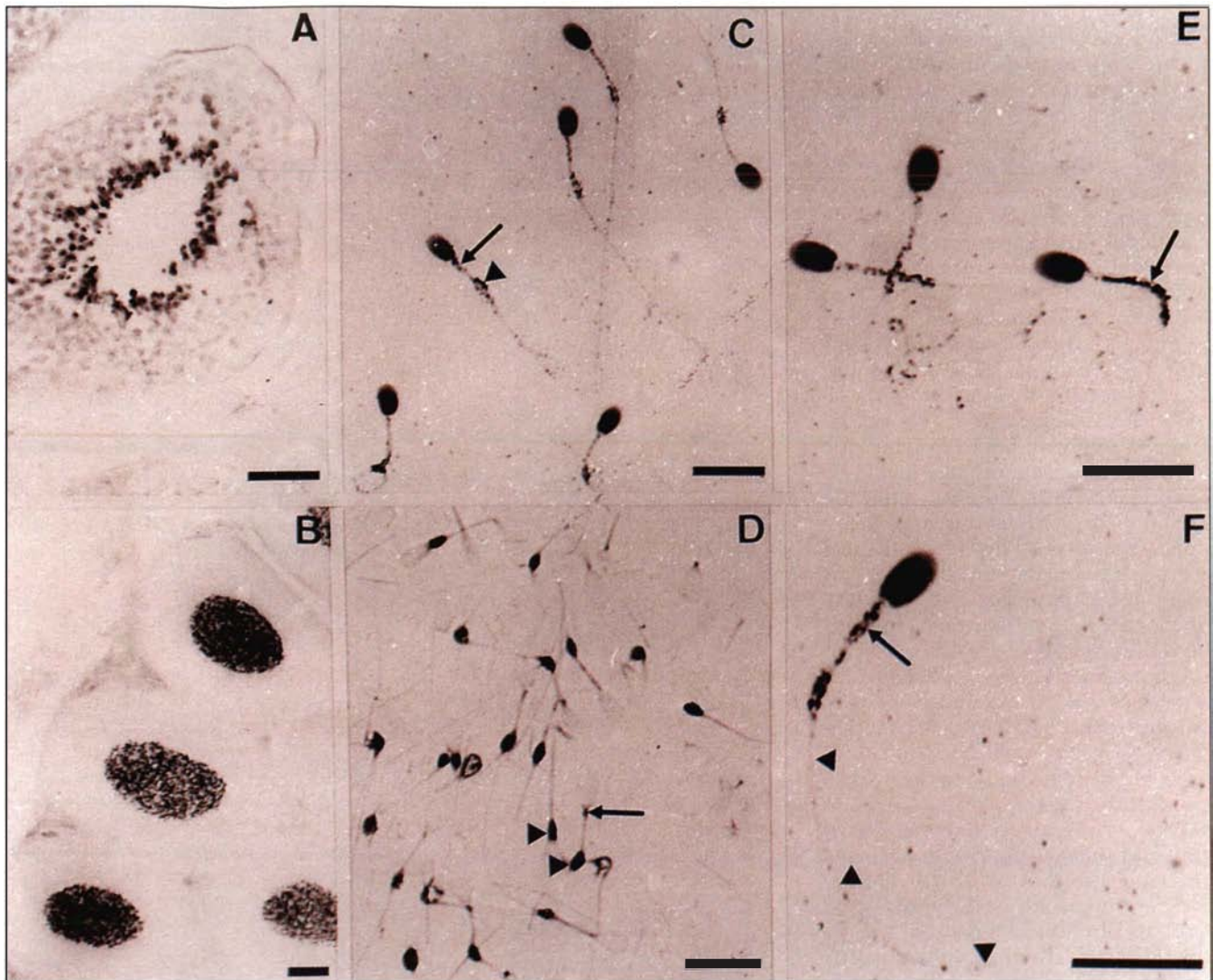


Figure 1. **Profil d'expression du récepteur olfactif canin DTMT au cours du développement des gamètes mâles.** A. Immunodétection de DTMT à la peroxidase sur cryosections de testicule de chien, au niveau des spermatides tardifs. Barre = 50 μ m. B. Immunodétection à la peroxidase sur cryosections d'épididyme. La lumière des tubes épididymaires est remplie de spermatozoïdes immunoréactifs. Barre = 50 μ m. C, D. Immunodétection à l'or colloïdal et révélation à l'argent (C) et à la peroxidase (D) démontrant le marquage spécifique des spermatozoïdes épididymaires au niveau de leur gouttelette cytoplasmique (pointes de flèche), ainsi que sur la pièce intermédiaire de leur flagelle (flèches). Barres = 10 μ m. E, F. Immunodétection à l'or colloïdal et révélation à l'argent réalisée sur frottis de spermatozoïdes éjaculés mettant en évidence une immunoréactivité au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle (flèches), à l'exclusion de tous les autres composants du gamète, y compris la pièce principale du flagelle (pointes de flèche). Barres = 10 μ m. Une légère contre-coloration à l'hématoxyline a été réalisée pour les images C, E, F, afin de mieux localiser la tête des spermatozoïdes.

(spermatozoïdes ronds et allongés) (*figure 1A*). L'immunoréactivité associée au récepteur se concentre ensuite dans la gouttelette cytoplasmique, intensément marquée sur les spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires (*figures 1B, C, D et 2A, B, C*). Après la migration et l'élimination de la gouttelette, une immunoréactivité persiste au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle des spermatozoïdes mûrs (*figures 1E, F et 2D*). Des expériences d'immunoblotting ont également révélé la présence du récepteur dans des extraits de membranes de spermatozoïdes mûrs [8].

La production, même en quantité importante, d'une protéine donnée au niveau d'un tissu spécifique pourrait ne pas avoir toujours de signification physiologique [11]. Néanmoins, la présence d'une protéine de la famille des récepteurs olfactifs sur les spermatozoïdes mûrs, de même que le caractère sélectif et préférentiel de l'expression d'un nombre limité de membres de cette famille dans le testicule, renforcent l'hypothèse que ces récepteurs jouent effectivement un rôle dans la physiologie de la reproduction. Ce rôle pourrait s'intégrer dans le réseau complexe d'interactions paracrines et endocrines responsables de la différenciation des gamètes mâles. Ces récepteurs pourraient aussi être impliqués dans la physiologie des spermatozoïdes mûrs, comme le suggère la présence de DTMT au niveau de leur flagelle. A cet égard, il faut noter que plusieurs protéines fonctionnelles du flagelle du spermatozoïde mûr présentent une distribution comparable à celle de DTMT, y compris une immunoréactivité importante au niveau de la gouttelette cytoplasmique [12]. Il a d'ailleurs déjà été suggéré que la gouttelette jouerait un rôle dans la mise en place finale des constituants membranaires du spermatozoïde [13].

Il est dès lors tentant de spéculer que DTMT puisse être impliqué dans la régulation de la mobilité et/ou le chimiotactisme du sperme. Le chimiotactisme du spermatozoïde est un phénomène bien connu chez de nombreux invertébrés, et ses bases moléculaires ont été particulièrement bien définies chez l'oursin [2].

Il est intéressant de noter que dans le spermatozoïde d'oursin le récepteur responsable de la reconnaissance des peptides chémoattractants libérés par l'ovule, ainsi que les protéines impliquées dans la cascade de transduction qu'il initie, sont tous localisés au niveau de son flagelle [14].

Si les bases moléculaires du chimiotactisme intergamétique restent très mal connues chez les vertébrés, la régulation de la mobilité du spermatozoïde de mammifère commence à être élucidée sur le plan moléculaire, impliquant les effets stimulants de l'AMPc et bipolaires du calcium [2,

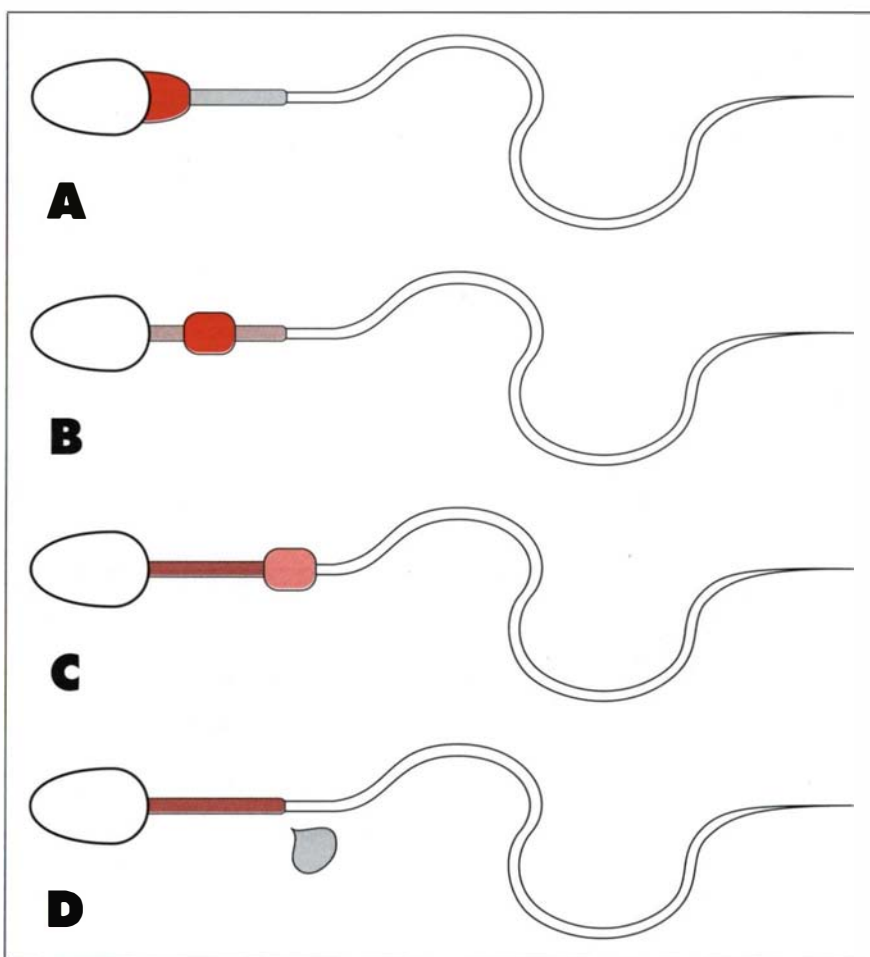


Figure 2. Schéma illustrant la localisation de l'immunoréactivité du récepteur olfactif DTMT (représentée en rouge), au cours de la migration de la gouttelette cytoplasmique le long de la pièce intermédiaire du flagelle de spermatozoïde épидидymaire. Dans le testicule et le rete testis, la gouttelette, fortement marquée, occupe la jonction entre la tête et le cou du spermatozoïde, la pièce intermédiaire (représentée en gris) restant non marquée (**A**). Durant le transit épидидymaire proximal, la gouttelette migre rapidement le long du flagelle (**B**), et se maintient à la jonction des pièces intermédiaire et principale du flagelle jusqu'au canal déférent (**C**). Dans le même temps, l'immunoréactivité de DTMT apparaît sur la pièce intermédiaire (**B et C**). La gouttelette est ensuite éliminée, tandis que le spermatozoïde éjaculé conserve l'immunoréactivité de la pièce intermédiaire (**D**).

15]. Les protéines G hétérotrimériques (dont certaines sont présentes et fonctionnelles dans les spermatozoïdes de rat et de souris [16, 17]), n'ont pas encore été impliquées dans la régulation de la mobilité du spermatozoïde, bien que certains ligands bien connus de récepteurs couplés aux protéines G soient capables de stimuler la mobilité du sperme humain [18, 19]. La transduction des signaux dans les neurones olfactifs met également en jeu les effets de l'AMPc [20], mais aussi du calcium [21], comme cela a été récemment confirmé par des expériences d'expression fonctionnelle de gènes codant pour des récepteurs olfactifs de rat [22]. L'analogie entre la muqueuse olfactive et les cellules spermatiques ne se limite d'ailleurs pas à l'expression d'une même famille de récepteurs olfactifs. Ainsi, ce sont les mêmes isoenzymes de la kinase β -ARK et de la β -arrestine, toutes deux impliquées dans les mécanismes de désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G, qui sont exprimées à la fois dans les neurones olfactifs et les spermatides de rat [23].

Le récepteur olfactif DTMT et les autres membres de la « famille testiculaire » des récepteurs olfactifs pourraient donc bien être impliqués dans le chimiotactisme ou la régulation de la mobilité du spermatozoïde. A cet égard, il faut noter que dans les modèles expérimentaux de la chimioattraction du sperme humain, seule une fraction des gamètes semble être sensible aux chémoattractants [24]. La distribution hétérogène de DTMT parmi les cellules spermatiques, de même que le nombre de récepteurs apparentés différents exprimés dans le testicule (au moins trois chez le chien, peut-être davantage dans d'autres espèces, selon nos expériences préliminaires non publiées), pourraient rendre compte d'un tel phénomène de sélection intergamétique.

En conclusion, un sous-groupe particulier de la famille multigénique des récepteurs olfactifs semble être exprimé spécifiquement dans les cellules germinales mâles. Pour au moins l'un de ces gènes chez le chien, la protéine correspondante se retrouve au niveau des spermatozoïdes mûrs,

avec un profil d'expression compatible avec un rôle fonctionnel dans la régulation de la maturation du sperme, de sa mobilité ou de son pouvoir fécondant. Les recherches doivent maintenant se centrer sur la fonction possible du récepteur DTMT, en recherchant la nature et le site de production de son ligand endogène, et en examinant les effets physiologiques et biochimiques de celui-ci sur les différentes composantes de la fonction spermatique. Les récepteurs apparentés seront également recherchés et étudiés dans d'autres espèces, en particulier chez l'homme, étant donné les implications potentielles que ces récepteurs pourraient avoir dans les domaines de la stérilité et de la contraception ■

Remerciements

Nous remercions J.E. Dumont pour son support et son intérêt continus. Nous remercions également J.L. Conreur pour les tirages de microphotographies. Le travail réalisé dans le laboratoire des auteurs a été financé par le Programme belge des Pôles d'Attraction Interuniversitaire mis en place par le Gouvernement belge, Service du Premier ministre, Département de la Programmation Scientifique, ainsi que par le Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, et Boehringer Ingelheim. La responsabilité scientifique est assumée par les auteurs. P.V. et M.P. sont respectivement Aspirant et Chercheur qualifié du Fonds National de la Recherche Scientifique.

Pierre Vanderhaeghen
Stéphane Schurmans
Marc Parmentier

Institut de recherche interdisciplinaire en biologie Humaine et Nucléaire (IRIBHN), ULB Campus Erasme, 808, route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgique.

Gilbert Vassart

Département de génétique médicale, Université libre de Bruxelles, Campus Erasme, 808, route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgique.

RÉFÉRENCES

1. Van Houten J. Signal transduction in chemoreception. In : Spanich JL, Satir BH, eds. *Sensory receptors and signal transduction*. New York : Wiley-Liss, 1991 : 65-136.
2. Garbers DL. Molecular basis of fertilization. *Annu Rev Biochem* 1989 ; 58 : 719-42.
3. Yoshida M, Inaba K, Morizawa M. Sperm chemotaxis during the process of fertilization in the Ascidians *Ciona savignyi* and *Ciona intestinalis*. *Dev Biol* 1993 ; 157 : 497-506.
4. Ralt D, Goldberg M, Fetterhoff P, et al. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 2840-4.
5. Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 1991 ; 65 : 175-87.
6. Parmentier M, Vanderhaeghen P, Schurmans S, Libert F, Vassart G. Génétique moléculaire des récepteurs olfactifs. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 1083-90.
7. Parmentier M, Libert F, Schurmans S, et al. Members of the putative olfactory receptor gene family are expressed in mammalian germ cells. *Nature* 1992 ; 355 : 453-5.
8. Vanderhaeghen P, Schurmans S, Vassart G, Parmentier M. Olfactory receptors are displayed on dog mature sperm cells. *J Cell Biol* 1993 ; 123 : 1441-52.
9. Ngai J, Chess A, Dowling M, Necles N, Macagno E, Axel R. Coding of olfactory information: topography of odorant receptor expression in the catfish olfactory epithelium. *Cell* 1993 ; 72 : 667-80.
10. Ressler KJ, Sullivan SL, Buck L. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 1993 ; 73 : 597-609.
11. Erickson HP. Gene knockouts of *c-src*, transforming growth factor β 1, and tenascin suggest superfluous, nonfunctional expression of proteins. *J Cell Biol* 1993 ; 120 : 1079-81.
12. Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 1983 ; 28 : 75-104.
13. Oko R, Hermo L, Chan P, Fazel A, Bergeron J. The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains sacular elements with Golgi characteristics. *J Cell Biol* 1993 ; 123 : 809-21.
14. Toowicharanont P, Shapiro BM. Regional differentiation of the sea urchin sperm plasma membrane. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 6877-83.
15. Tash JS. Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil Cytoskel* 1989 ; 14 : 332-9.

RÉFÉRENCES

16. Glassner M, Jones J, Kligman I, Woolkalis J, Gerton GL, Kopf GS. Immunocytochemical and biochemical characterization of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in mammalian spermatozoa. *Dev Biol* 1991 ; 146 : 438-50.
17. Haugen TB, Eskild W, Hansson V. Evidence for a novel splice variant of the α subunit of G_o in rat male haploid germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 183 : 41-7.
18. Ricker DD, Minhas BS, Kumar R, Robertson J, Dodson MG. The effects of platelet-activating factor on the motility of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1989 ; 52 : 655-8.
19. Sato H, Schill WB. Temperature-dependent effects of the components of kallikrein-kinin system on sperm motility *in vitro*. *Fertil Steril* 1987 ; 47 : 684-8.
20. Ronnett G, Snyder S. Molecular messengers of olfaction. *Trends Neurosci* 1992 ; 15 : 508-12.
21. Boekhoff I, Tareilus E, Strotmann J, Breer H. Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J* 1990 ; 9 : 2453-8.
22. Raming K, Krieger J, Strotmann J, Boekhoff I, Kubick S, Baumstark C, Breer H. Cloning and expression of odorant receptors. *Nature* 1993 ; 361 : 353-6.
23. Dawson T, Arriza J, Jaworsky D, Borisy F, Attradamal H, Lefkowitz R, Ronnett G. β -adrenergic receptor kinase-2 and β -arrestin-2 as mediators of odorant-induced desensitization. *Science* 1993 ; 259 : 825-9.
24. Eisenbach M, Ralt D. Precontact mammalian sperm-egg communication and role in fertilization. *Am J Physiol* 1992 ; 262 : C1095-101.

TIRÉS A PART

P. Vanderhaeghen.