

Université de Montréal

**Les transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BI, SR-BII,
CD36 et ABCA1 contribuent au maintien de
l'homéostasie du cholestérol
intratesticulaire**

par

Casimir D. AKPOVI

Pathologie et Biologie Cellulaire

Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Ph. D.

en Pathologie et Biologie Cellulaire

option Biologie Cellulaire

Septembre 2008

© AKPOVI, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Les transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1
contribuent au maintien de l'homéostasie du
cholestérol intratesticulaire

présentée par:

Casimir D. AKPOVI

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. D.-L. Ghitescu:	Président-rapporteur
Dr. R.-M. Pelletier:	Directeur de recherche
Dr. M.L. Vitale:	Co-directeur
Dr. V. Gavino:	Membre du jury
Dr. J. Lafond:	Examineur externe
Dr. N. Leclerc:	Représentant du doyen de la FES

Résumé

Le testicule assure la production des spermatozoïdes et la sécrétion de la testostérone. Chaque fonction est assumée par un compartiment cellulaire distinct: l'épithélium séminifère et le tissu interstitiel. Le cholestérol, présent dans les deux compartiments, est un composé indispensable aux membranes cellulaires et un précurseur essentiel de la testostérone. Dans le compartiment interstitiel, environ 40 % du cholestérol utilisé pour la production hormonale est importé du sang à partir des lipoprotéines HDL et/ou LDL. Dans l'épithélium séminifère, la cellule de Sertoli assure le contrôle et le maintien de la spermatogenèse. Elle a la capacité de synthétiser du cholestérol à partir de l'acétate *in vitro*, néanmoins, il n'y a pas d'évidence qu'elle le fait *in vivo*. De plus il existe, au niveau des tubules séminifères, une barrière hémato-testiculaire qui empêche le libre passage de plusieurs composés sanguins, y compris le cholestérol. Nous avons testé l'hypothèse qu'il existe des moyens d'importation du cholestérol sanguin, mais aussi l'exportation du cholestérol intra-tissulaire, qui contourneraient cette barrière et qui contribueraient au maintien du taux intratubulaire du cholestérol compatible avec le bon déroulement de la spermatogenèse. Nous avons comparé les taux de variation de l'expression de l'ARNm et de la protéine des transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1 aux taux de variation du cholestérol libre et estérifié au cours de la spermatogenèse chez les souris normales durant le développement postnatal. Afin de mieux apprécier le niveau d'implication de chacun de ces récepteurs, nous avons examiné comment la suppression du gène d'une enzyme comme la lipase hormono-sensible (HSL) ou de celui d'un transporteur de cholestérol comme SR-BI, CD36 ou NPC1 était

compensée et comment cette suppression affectait le taux de cholestérol libre et estérifié dans chacun des deux compartiments cellulaires du testicule. Nous avons dans un premier temps mis au point une nouvelle technique d'isolation des testicules en fraction enrichie en tissu interstitiel (ITf) et en tubules séminifères (STf) qui a l'avantage de mieux préserver l'intégrité des formes phosphorylées et glycosylées des protéines comparée aux techniques préexistantes. Les résultats de nos analyses ont montré que l'expression de SR-BI et CD36 étaient maximales dans les ITf au moment où les souris ont complété leur maturité sexuelle et où le niveau de synthèse de la testostérone était maximal. Dans les tubules séminifères, l'expression maximale de SR-BI et le taux le plus élevé de cholestérol estérifié étaient mesurés de façon concomitante à 35 jours après la naissance, au moment où la première vague de l'activité spermatogénétique était complétée. L'expression de l'ABCA1 était maximale au moment où le taux de cholestérol était élevé et minimale au moment où le taux de cholestérol était le plus bas, alors que le niveau d'expression de CD36 était maximal chez l'adulte au moment où le taux de spermiation était le plus élevé. L'expression de SR-BII variait peu dans les deux compartiments cellulaires durant le développement. La suppression génétique de la HSL et de NPC1, qui cause une infertilité chez les souris mâles, était accompagnée d'une accumulation de cholestérol libre et estérifié dans les tubules séminifères. Par contre, la suppression génétique de SR-BI et CD36, qui ne causent pas d'infertilité chez les souris mâles était sans impact significatif sur le taux de cholestérol intratubulaire. Nous avons montré que l'invalidation génétique d'un transporteur sélectif ou d'une enzyme du métabolisme du cholestérol était accompagnée d'un ensemble de mécanismes de compensation visant à maintenir le taux de cholestérol

libre aux niveaux semblables à ceux mesurés dans les fractions tissulaires de souris normales. Ensemble, nos résultats ont montré que l'expression des transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1 variait en fonction de la spermatogenèse et du taux intratesticulaire du cholestérol suggérant leur contribution au maintien de l'homéostasie du cholestérol intratesticulaire.

Mots-clés : Cholestérol, transporteurs sélectifs de cholestérol, tubules séminifères, tissu interstitiel, spermatogenèse, souris normale, souris génétiquement déficiente, vison orchitique.

Abstract

The testis is made up of loops of convoluted seminiferous tubules surrounded by interstitial tissue composed of loose connective tissue containing Leydig cells that secrete testosterone into the bloodstream. The seminiferous tubules are lined with a stratified epithelium containing germ cells at various stages of development and the supporting Sertoli cells. Cholesterol is present in both compartments and is crucial for the development of germ cells, the fertility of spermatozoa as well as for testosterone production. In the interstitial compartment, approximately 40 % of the cholesterol used for the hormonal production is imported from blood lipoproteins HDL and LDL. In the seminiferous epithelium, Sertoli cells plays key role in the development and maintenance of spermatogenesis. Sertoli cells have the capacity to synthesize cholesterol from acetate *in vitro*, however, there is no evidence that they do so *in vivo*. In addition, there is a blood-testis barrier within the seminiferous tubules that prevents the free passage of several blood compounds including cholesterol. We tested the hypothesis that there are ways of blood cholesterol uptake, but also the intratubular cholesterol efflux that by-pass this barrier and contribute to the cholesterol homeostasis within the tubules. We compared expression patterns of the mRNA and proteins for selective cholesterol transporters SR-BI, SR-BII, CD36 and ABCA1 with those of free and esterified cholesterol during the spermatogenesis in normal mice during the postnatal development. To better appreciate the level of involvement of each receptor, we examined the effect of the deletion of the genes for an enzyme (HSL) or for cholesterol transporters (SR-BI, CD36 or NPC1) on the rate of free and esterified cholesterol in both compartments of the testis. At first, we worked out a new

technique to separate the testes into interstitial tissue- (ITf) and seminiferous tubule-enriched fractions (STf) that has the advantage of allowing a more faithful detection of the phosphorylated and glycosylated forms of the proteins compared to existing techniques. Our results showed that the expression of SR-BI and CD36 was maximum in the ITf when mice completed their sexual maturity and reached the peak level of testosterone synthesis. In the seminiferous tubule-enriched fractions, the maximum level of SR-BI expression coincided with the highest level of esterified cholesterol during the development at 35 days, as the first wave of the spermatogenetic activity was completed. ABCA1 reached the highest expression level when cholesterol was high and reached the lowest when cholesterol was at its minimum, while the level of CD36 expression was maximal in the adult tubules as the rate of spermiation was the highest. The knockout of the HSL and NPC1, which renders the male mice infertile, was accompanied by the accumulation of free and esterified cholesterol in the seminiferous tubules. On the other hand, the knockout of SR-BI and CD36, linked to infertility, did not affect the rate of intratubular cholesterol. Here we showed that genetic withdrawal of a cholesterol transporter or of an enzyme involved in cholesterol metabolism was compensated by other transporters or enzymes in order to maintain the level of free cholesterol similar to those measured in the tissue-enriched fractions of wild-type mice. Together, our results showed that the expression of the selective cholesterol transporters SR-BI, SR-BII, CD36 and ABCA1 varied according to the spermatogenesis and intratesticular cholesterol rate, thus suggesting their contribution to the preservation of the intratesticular cholesterol homeostasis.

Keywords: Cholesterol, selective cholesterol transporter, seminiferous tubules, interstitial tissue, spermatogenesis, normal mice, knockout mice.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	vi
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des schémas.....	xviii
Liste des annexes.....	xix
Remerciements.....	xxi
Liste des abréviations.....	xxiii
1. INTRODUCTION.....	1
2. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	4
2.1 La structure du testicule.....	4
2.1.1 La barrière hémato-testiculaire et la compartimentalisation de l'épithélium séminifère.....	5
2.1.2 Le tissu interstitiel.....	5
2.1.3 L'épithélium séminifère.....	7
2.2 Le rôle du cholestérol dans le testicule.....	10
2.2.1 Le tissu interstitiel.....	10
2.2.2 Le tubule séminifère.....	10
2.2.3 Le spermatozoïde.....	11
2.3 Le métabolisme du cholestérol dans le testicule.....	12

2.3.1	Facteurs enzymatiques	14
2.3.2	Facteurs non enzymatiques du métabolisme du cholestérol: les transporteurs de cholestérol	17
2.4	Objectifs et hypothèse	43
3.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	45
3.1	Matériels	45
3.1.1	Réactifs	45
3.1.2	Logiciels	52
3.1.3	Modèles animaux	52
3.2	Méthodes	55
3.2.1	Prélèvement et traitement des tissus	55
3.2.2	PCR en temps réel (Realtime polymerase chain reaction)	58
3.2.3	Western blot	60
3.2.4	Dosage du cholestérol	63
3.2.5	Immuno-marquage en microscopie optique	65
3.2.6	Quantification des bandes immunoréactives et analyses statistiques	67
4.	RÉSULTATS	69
4.1	Caractérisation des fractions enrichies en tissu interstitiel et en tubules séminifères générées sans enzymes digestives	69
4.1.1	Caractérisation morphologique des fractions enrichies	69
4.1.2	Avantages et désavantages d'une digestion enzymatique préalable	69

4.2	Études des transporteurs sélectifs de cholestérol au cours du développement postnatal chez la souris normale	70
4.2.1	SR-BI et SR-BII	70
4.2.2	CD36	74
4.2.3	ABCA1	76
4.2.4	Cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum durant le développement	76
4.3	Étude chez les souris génétiquement déficientes en SR-BI, CD36 et HSL	77
4.3.1	Souris génétiquement déficientes en transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BI et CD36	78
4.3.2	Souris génétiquement déficientes en HSL	82
4.4	Étude des transporteurs sélectifs de cholestérol chez les visons et mesure du taux de cholestérol	84
4.4.1	Mesure du taux protéinique des transporteurs sélectifs de cholestérol dans les STf	84
4.4.2	Cholestérol libre et estérifié chez les visons normaux et orchitiques	85
4.5	Étude des transporteurs sélectifs et des enzymes du métabolisme du cholestérol dans les STf de souris NPC1+/+ et NPC1-/-	87
4.6	Étude de protéines de jonctions lacunaires chez la souris	88
4.6.1	Quantification des taux protéiniques de différentes connexines dans les STf de souris normales durant le développement	88

4.6.2	Quantification des taux protéiniques de différentes connexines dans les STf de souris SR-BI ^{+/+} et SR-BI ^{-/-}	90
4.6.3	Quantification des taux protéiniques de cavéoline-1 et de flotilline-1 dans les STf de souris SR-BI ^{+/+} et SR-BI ^{-/-}	91
5.	DISCUSSION	143
5.1	Caractérisation des fractions enrichies en tissu interstitiel (ITf) et en tubules séminifères (STf).....	143
5.2	Étude des transporteurs sélectifs de cholestérol chez les souris normales durant le développement postnatal.....	144
5.2.1	SR-BI et SR-BII	144
5.2.2	CD36	148
5.2.3	ABCA1	150
5.3	Étude de compensation chez les souris génétiquement déficientes en SR-BI, CD36 et HSL.....	152
5.3.1	Souris SR-BI ^{-/-}	152
5.3.2	Souris CD36 ^{-/-}	155
5.3.3	Souris HSL ^{-/-}	157
5.4	Étude chez les visons orchitiques.....	160
5.5	Souris NPC1 ^{-/-}	161
5.6	Étude de protéines de jonctions lacunaires chez la souris.....	163
5.6.1	Variation du taux protéinique de connexines dans les STf durant le développement chez les souris normales	163

5.6.2	Expression de protéines de jonctions dans les tubules séminifères de souris SR-BI ^{+/+} et SR-BI ^{-/-}	164
6.	CONCLUSION ET SUGGESTIONS.....	166
7.	BIBLIOGRAPHIE	169

Liste des tableaux

Tableau 1: Amorces utilisées pour le PCR en temps réel	68
Tableau 2: Taux de dilution d'anticorps utilisés en Western blot.....	68
Tableau 3: Résumé des analyses de l'ARNm, de la protéine et du cholestérol libre et estérifié dans les ITf de souris SR-BI ^{-/-} , CD36 ^{-/-} et HSL ^{-/-} comparées aux souris normales	92
Tableau 4: Résumé des analyses de l'ARNm, de la protéine et du cholestérol libre et estérifié dans les STf de souris SR-BI ^{-/-} , CD36 ^{-/-} et HSL ^{-/-} comparées aux souris normales	93

Liste des figures

Figure 1: Étude de la spécificité des anticorps et sondes de SR-BI et SR-BII.....	94
Figure 1: Étude de la spécificité des anticorps et sondes de SR-BI et SR-BII.....	94
Figure 2: Quantification des taux protéiniques de SR-BI et SR-BII dans différents tissus de souris	96
Figure 3: Quantification de l'ARNm et de la protéine de SR-BI et SR-BII dans les ITf et STf de souris normales durant le développement	98
Figure 4: Immuno-histochimie de SR-BI et SR-BII dans le testicule de souris adultes ...	100
Figure 5: Étude de la spécificité des anticorps et sondes de CD36.....	102
Figure 6: Quantification de l'ARNm et de la protéine de CD36 dans les ITf et STf de souris normales durant le développement.....	104
Figure 7: Immuno-histochimie de CD36 dans le testicule de souris adultes	106
Figure 8: Quantification de l'ARNm et de la protéine d'ABCA1 dans les ITf et les STf de souris normales durant le développement.....	108
Figure 9: Immuno-histochimie d'ABCA1 dans le testicule de souris adultes	110
Figure 10: Taux de CL et de CE dans les ITf, les STf et le sérum de souris normales durant le développement	112
Figure 11: Quantification de l'ARNm et de la protéine des transporteurs sélectifs de cholestérol dans les ITf et STf de souris SR-BI ^{+/+} et SR-BI ^{-/-}	114
Figure 12: Quantification des taux protéiniques des enzymes dans les ITf et les STf de souris SR-BI ^{+/+} et SR-BI ^{-/-}	116

Figure 13: Cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum de souris SR-BI+/+ et SR-BI/-.....	118
Figure 14: Quantification de l'ARNm et de la protéine des transporteurs sélectifs de cholestérol dans les ITf et STf de souris CD36+/+ et CD36/-.....	120
Figure 15: Quantification des taux protéiniques des enzymes dans les ITf et STf de souris CD36+/+ et CD36/-.....	122
Figure 16: Cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum de souris CD36+/+ et CD36/-.....	124
Figure 17: Quantification de l'ARNm et de la protéine des transporteurs sélectifs de cholestérol dans les ITf et STf de souris HSL+/+ et HSL/-.....	126
Figure 18: Quantification des taux protéiniques des enzymes dans les ITf et les STf de souris HSL+/+ et HSL/-.....	128
Figure 19: Cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum de souris HSL+/+ et HSL/-.....	130
Figure 20: Quantification des taux protéiniques de CD36 et d'ABCA1 dans les STf de vison normal et orchitique.....	132
Figure 21: Quantification des taux de protéines des transporteurs sélectifs du cholestérol, des enzymes et de cholestérol libre et estérifié dans les STf de souris NPC1+/+ et NPC1/-.....	134
Figure 22: Quantification des taux protéiniques des connexines dans les STf de souris normales durant le développement.....	136

Figure 23: Quantification des taux protéiniques des connexines dans les STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-} 139

Figure 24: Quantification des taux protéiniques de cavéoline-1 et de flotilline-1 dans les STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-}..... 141

Liste des schémas

Schéma 1: Schéma récapitulatif de l'homéostasie du cholestérol dans l'épithélium.....	3
séminifère.....	3
Schéma 2: Structure du testicule	3
Schéma 3: Schéma de l'épithélium séminifère	3
Schéma 4: Structures morphologiques de cellules germinales caractéristiques des phases de la spermatogenèse chez la souris.....	4
Schéma 5: Résumé schématique des facteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol dans le testicule	6
Schéma 6: Représentation graphique de la protéine de SR-BI de rongeur.....	9
Schéma 7: Séquences de la région C-terminale spécifique à SR-BII.	13
Schéma 9: SR-BI est impliqué dans la transmission des signaux d'apoptose.....	24
Schéma 8: SR-BI comme récepteur de phagocytose de cellules germinales	24
Schéma 10: Structure de CD36	35
Schéma 11: Représentation schématique de la topologie de l'ABCA1	38

Liste des annexes

Annexe 1: Article 1	206
Annexe 2: Article 2	221

*A mon épouse,
à ma famille*

Remerciements

Mes premiers mots de remerciement sont adressés à mon directeur de thèse Dr. R.-Marc Pelletier et à ma co-directrice Dr. Maria L. Vitale. Vous m'avez fait confiance à un moment de ma vie où j'avais perdu confiance en moi-même. Merci pour cela. Merci pour avoir été là pour moi, tout le temps, dans toutes les circonstances. Nos continuelles oppositions, contradictions et confrontations ont sûrement été la clé de notre travail commun. Plus qu'un directeur de thèse, vous êtes un ami pour moi Marc, un ami qui m'a tenu la main jusqu'aux dernières lignes de cette thèse. Ce n'est pas seulement un merci que je dois vous dire, mais vous promettre d'être un bon exemple pour d'autres.

Je remercie les membres du comité de parrainage de mes études de doctorat Dr. B. Murphy et Dr. V. Gavino pour leur guide tout au long de mes travaux de recherches;

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers les membres du jury qui ont bien voulu consacrer à ma thèse une partie de leur temps extrêmement précieux.

Merci à Dr. D.-L. Ghitescu pour ses conseils et son soutien durant toutes ces années qu'ont duré mes études de maîtrise et de doctorat.

J'ai réalisé une partie de mes travaux de recherche dans le laboratoire de recherche de Dr. J. Lafond, directrice de BioMed UQAM et professeur à l'université UQAM, que je tiens à remercier pour avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire.

Je voudrais remercier Dr. L. Brisette pour nous avoir gracieusement offert les souris génétiquement déficientes en SR-BI et CD36, et Dr. B. Murphy pour les souris génétiquement déficientes en NPC1.

Merci aussi à tous mes collègues et amis de longue date du laboratoire L. Chen et S. Solinet. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite une fructueuse carrière.

Merci à mon épouse B.H. Akakpo pour sa présence dans ma vie, son soutien et ses encouragements tout au long de ces longues années de mon doctorat.

Merci enfin à mes parents et à ma famille pour les sacrifices qu'ils ont faits de me voir partir du domicile pendant tant d'années. Merci pour votre patience, votre compréhension et votre soutien.

Liste des abréviations

ITf:	Fractions enrichies en tissu interstitiel
STf:	Fractions enrichies en tubules séminifères
SR-BI:	Récepteur époueur de B type I
SR-BII:	Récepteur époueur de B type II
ABCA1:	“ATP-binding cassette transporter A1”
CD36:	Cluster de differentiation 36
ACAT:	Acyl-coenzymes A: cholestérol acyltransférase
HSL:	Lipase hormono-sensible
HMG-CoA réd.:	Hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase
FSH:	Hormone Folliculostimulante
PS:	Phosphatidylsérine
HDL:	Lipoprotéine de high densité
LDL:	Lipoprotéine de faible densité
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
d:	Jour

1. INTRODUCTION

Le testicule assure la production des spermatozoïdes et la sécrétion de la testostérone. Chaque fonction est assumée par un compartiment cellulaire distinct: l'épithélium séminifère et le tissu interstitiel. Le cholestérol, présent dans les deux compartiments, est un composé indispensable à toutes les cellules vivantes et un précurseur essentiel des androgènes (Eik-Nes, 1971). Environ 60 % du cholestérol utilisé pour la production hormonale est synthétisé *de novo* par les cellules de Leydig (Morris et Chaikoff, 1959). Le reste est importé du sang (Morris et Chaikoff, 1959) à partir des lipoprotéines LDL et HDL (Gwynne et Strauss, 1982; Benahmed et coll., 1983). Dans l'épithélium séminifère, la cellule de Sertoli a la capacité de synthétiser du cholestérol à partir de l'acétate *in vitro* (Wiebe et Tilbe, 1979), néanmoins, il n'y a pas d'évidence qu'elle le fasse *in vivo*. L'épithélium séminifère dispose d'autres sources de cholestérol. En effet, la cellule de Sertoli phagocyte les cellules germinales en apoptose (Chemes, 1986) et les corps résiduels issus de la spermiation (Clermont et coll., 1987) dont elle récupère le contenu en cholestérol (Schéma 1). Plusieurs études ont rapporté que les variations du taux de cholestérol dans les tubules séminifères sont reliées aux variations de l'activité spermatogénétique et l'arrêt naturel ou pathologique de la spermatogenèse entraîne une accumulation du cholestérol intratubulaire (Lofts et Boswell, 1960). Durant l'activité spermatogénétique, le départ cyclique de millions de spermatozoïdes dont les membranes contiennent une quantité importante du cholestérol tubulaire (Pelletier et Friend, 1986) contribue à baisser le taux de cholestérol dans les tubules. Les cellules de Sertoli perdent également du cholestérol par efflux parce que la suppression du gène d'ABCA1 est

accompagnée d'une accumulation de cholestérol dans les tubules (Selva et coll., 2004). L'absence de synthèse endogène de cholestérol dans les cellules de Sertoli et le fait que l'épithélium échappe du cholestérol par efflux et le départ cyclique des spermatozoïdes suggèrent que les tubules séminifères dépendraient du cholestérol de sources exogènes. L'entrée libre de plusieurs éléments du sang dont le cholestérol, dans le tubule est bloquée par la barrière hémato-testiculaire (Setchell, 1967; Pelletier et Byers, 1992). Cela suppose donc qu'il existe des moyens d'importation, mais aussi d'efflux, du cholestérol qui contourneraient cette barrière.

Quelques études ont abordé la question de l'origine du cholestérol dans les tubules séminifères. Cependant, celles-ci furent réalisées sur des cultures de cellules de Sertoli de rongeurs pré-pubères (Fofana et coll., 1996; Fofana et coll., 2000) ou sur des extraits de testicules entiers (Benahmed et coll., 1983; Bravo et coll., 1994). Les cellules de Sertoli pré-pubères n'étant pas commises ne sauraient être représentatives du comportement de cellules matures. De même, les résultats basés sur des extraits de testicules entiers ne rendent pas compte de la contribution de chaque compartiment au métabolisme du cholestérol testiculaire. C'est pourquoi dans notre étude, nous avons adopté une approche *in vivo* en réalisant toutes nos expériences sur des fractions enrichies en tissu interstitiel et en tubules séminifères.

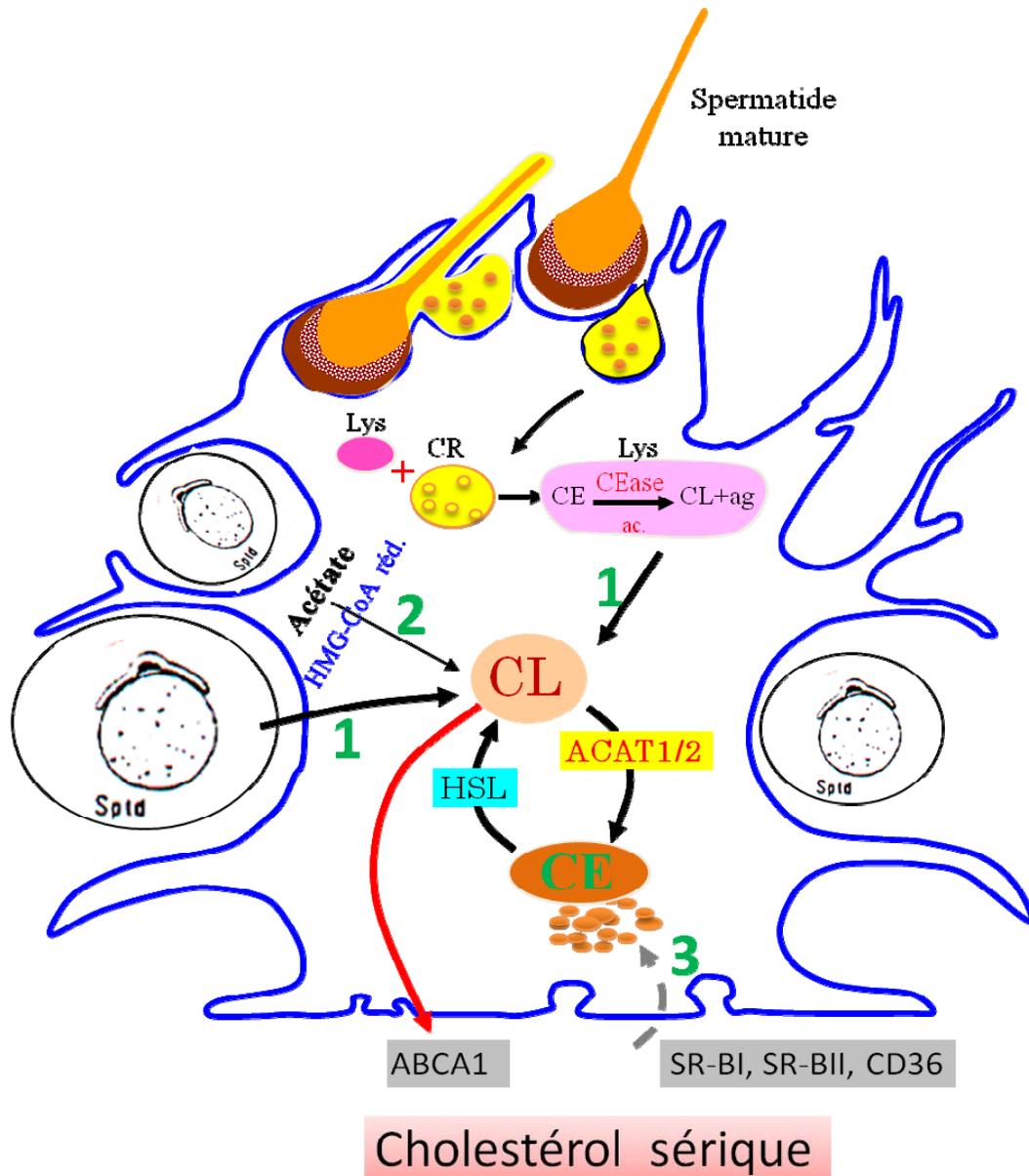


Schéma 1: Schéma récapitulatif de l'homéostasie du cholestérol dans l'épithélium séminifère.

CL: cholestérol libre, CE: cholestérol estérifié, CR: corps résiduel, Lys: lysosome, CEase ac.: cholestérol ester hydrolase acide, ag: acide gras; 1: recyclage du cholestérol contenu dans les corps résiduels et de cellules germinales en apoptose; 2: synthèse de cholestérol *de novo* à partir de l'acétate; 3: importation du cholestérol à partir du sang via les transporteurs sélectif.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 La structure du testicule

Le testicule est formé de deux compartiments cellulaires: un compartiment interstitiel fait de tissu conjonctif richement vascularisé et un compartiment tubulaire tapissé d'un épithélium séminifère. Les spermatozoïdes sont produits dans l'épithélium séminifère à partir des spermatogonies et le tissu interstitiel contient les cellules de Leydig qui produisent la testostérone.

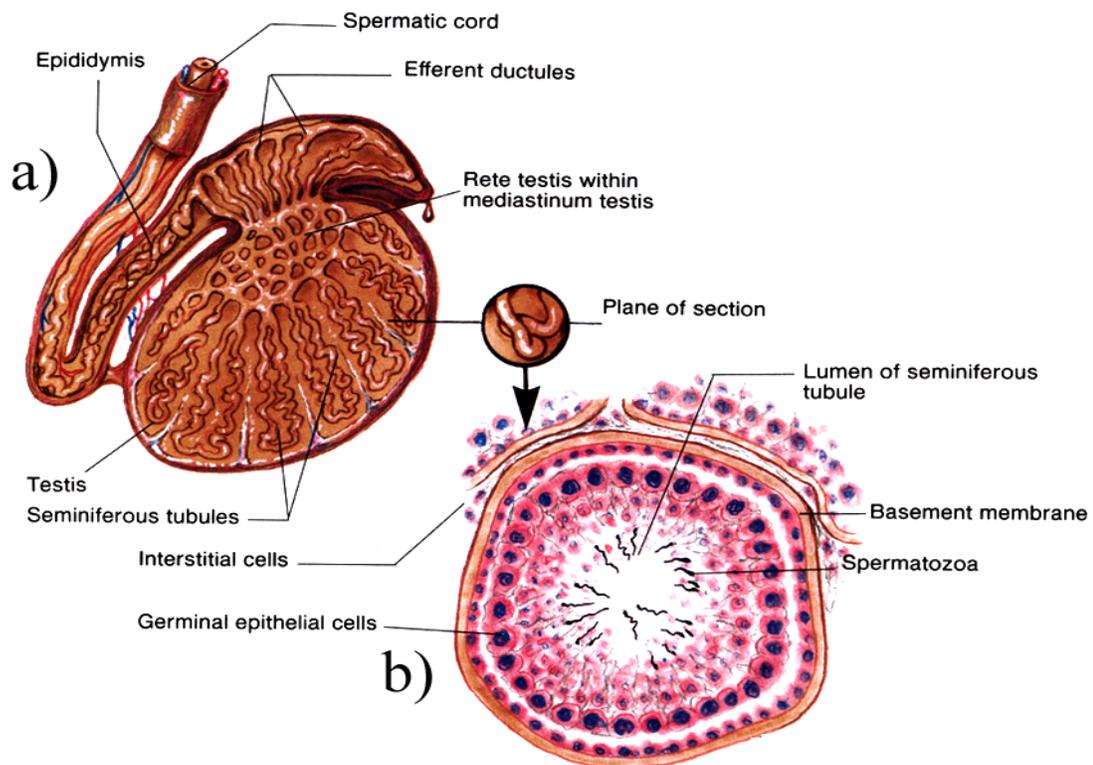


Schéma 2: Structure du testicule

Structure schématique montrant le testicule en coupe sagittale (a) et les tubules séminifères en coupe transversale (b) (Wilson, 1978).

2.1.1 La barrière hémato-testiculaire et la compartimentalisation de l'épithélium séminifère

Chaque cellule de Sertoli est reliée aux cellules de Sertoli adjacentes par des jonctions occlusives qui délimitent deux compartiments (Schéma 3): 1) un compartiment basal qui contient les spermatogonies et les spermatocytes jusqu'au stade préleptotène et 2) un compartiment adlumenal qui contient les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes (Dym et Fawcett, 1970; Pelletier et Byers, 1992). La présence d'une barrière hémato-testiculaire délimitant deux compartiments empêche la fuite de spermatozoïdes intratubulaires vers la circulation systémique et lymphatique. Cette notion est importante, car le système immunitaire ne tolère pas les antigènes des spermatozoïdes et peut alors développer des anticorps anti-spermatozoïdes pouvant aboutir à la stérilité (Tung et coll., 1981).

2.1.2 Le tissu interstitiel

Le tissu interstitiel contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs, des fibroblastes, des macrophages et des cellules de Leydig. Les macrophages sont nombreux dans le testicule de rat (Niemi et coll., 1986) et de souris (Hume et coll., 1984) et représentent approximativement 20% du nombre total des cellules du tissu interstitiel. Les cellules de Leydig sont responsables de la production de la testostérone (Hall et coll., 1969). Elles contiennent beaucoup de gouttelettes lipidiques (Christensen et Fawcett, 1966) et établissent des contacts étroits avec les macrophages (Hutson, 1992).

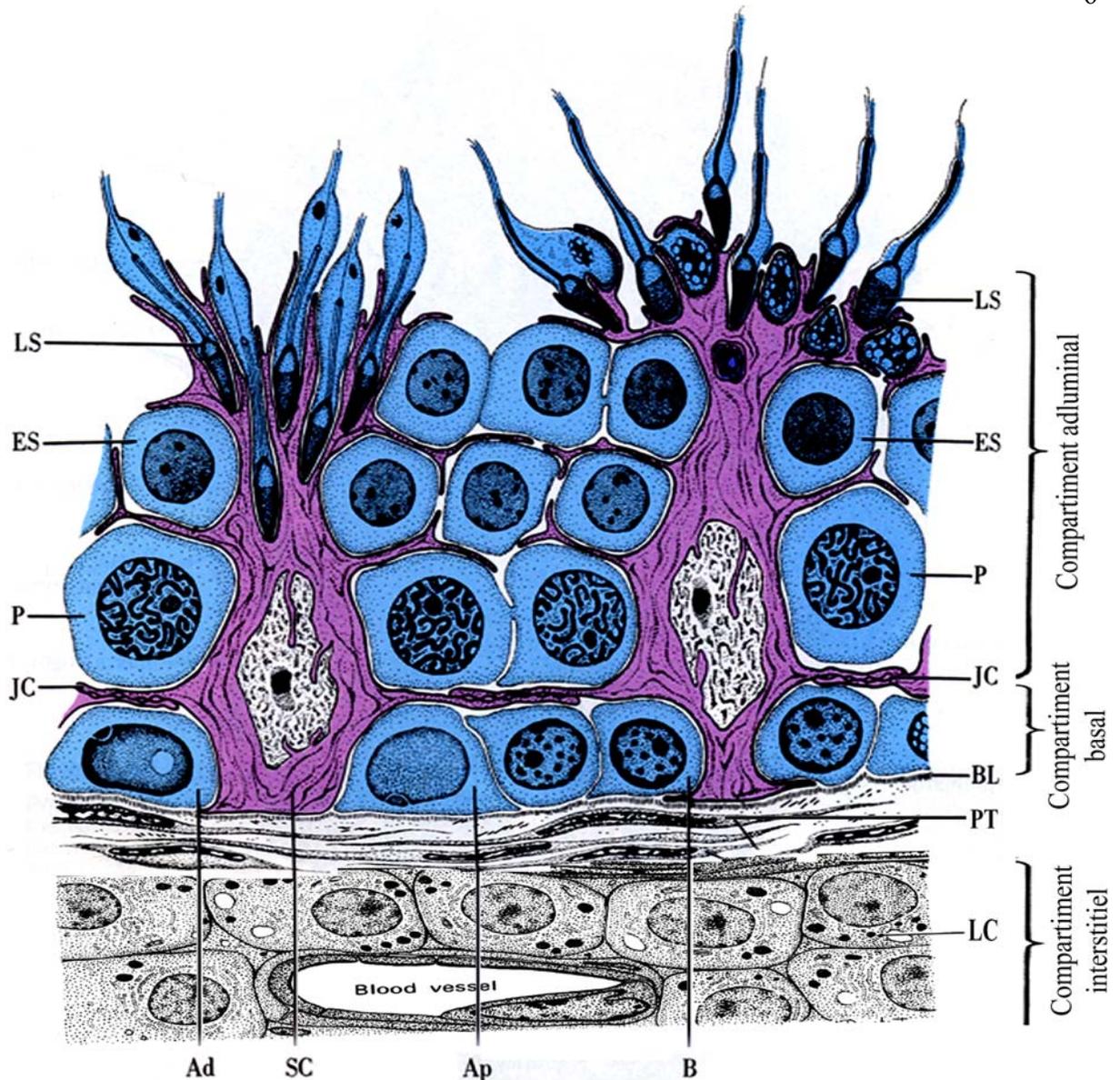


Schéma 3: Schéma de l'épithélium séminifère

Schéma de l'épithélium séminifère montrant la relation entre les cellules de Sertoli (SC) et les cellules germinales à différents stades de leur développement: Les spermatogonies type A foncées (Ad) et pâles (Ap) et type B sont en deçà de la barrière hémato-testiculaire formée de complexes de jonctions (JC). Les spermatozoïdes pachytènes (P), les spermatozoïdes ronds (ES) et allongés (LS) sont au delà de la barrière hémato-testiculaire. Le tissu interstitiel contient les cellules de Leydig (LC).
Modifié de (Clermont, 1963)

2.1.3 L'épithélium séminifère

Il existe deux types de cellules dans l'épithélium séminifère: les cellules germinales et les cellules somatiques de Sertoli.

2.1.3.1 La cellule de Sertoli

La cellule de Sertoli est en contact avec les cellules germinales et elle est la seule à s'étendre de la base à l'apex de l'épithélium séminifère (Schéma 3). Durant la période fœtale, la prolifération des cellules de Sertoli croît rapidement et atteint son pic juste avant la naissance (Orth, 1982). Après la naissance, leur prolifération diminue progressivement et s'arrête vers le 12^e jour chez la souris (Kluin et coll., 1984) et entre les 14^e et 21^e jours chez le rat (Orth, 1982). Les cellules de Sertoli adjacentes sont unies par des jonctions adhérentes (Russell, 1977), lacunaires (Pelletier et Byers, 1992; Pelletier, 1995) et occlusives (Pelletier et Byers, 1992). Chez l'adulte, certaines fonctions de la cellule de Sertoli sont contrôlées par des hormones hypophysaires dont l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Steinberger et coll., 1978; Heckert et Griswold, 1991) et par la testostérone (Mills, 1990). Les cellules de Sertoli synthétisent environ 200 protéines différentes associées à la fonction de la reproduction dont l'inhibine (rétrocontrôle de la FSH), l'androgen binding protein (ABP, transport des androgènes), le Stem Cell Factor (SCF, facteur de migration des gonocytes) (Griswold, 1988).

2.1.3.2 Les cellules germinales

La spermatogenèse est le processus biologique par lequel les cellules germinales diploïdes se différencient en cellules haploïdes, les spermatozoïdes. La séquence

d'apparition des cellules germinales de plus en plus matures dans l'épithélium séminifère durant ce processus est classiquement la même chez tous les mammifères (Clermont, 1972). Chez la souris, seuls les gonocytes, les spermatogonies type A et les cellules de Sertoli sont présents dans les tubules au 3^e jour après la naissance (Kluin et coll., 1982). Au 5^e jour, les spermatogonies type B s'y ajoutent, et aux environs du 7^e jour les premiers spermatocytes primaires font leur apparition (Kluin et coll., 1982). Les tubules augmentent de diamètre et les associations de cellules germinales, caractéristiques du testicule adulte, commencent à apparaître graduellement. Les spermatocytes secondaires et les spermatides rondes apparaissent en nombre croissant entre les 18^e et 20^e jours respectivement, et au 27^e jour, les premières spermatides allongées sont observées. La spermatogenèse est complète au 35^e jour après la naissance (Kluin et coll., 1982) (Schéma 4). Dans le testicule adulte, les cellules germinales existent en complexes associations classifiées en «stades du cycle» sur la base du stade de différenciation des spermatides (Leblond et Clermont, 1952; Oakberg, 1956). Trois phases différentes peuvent être distinguées durant la spermatogenèse: (a) la phase de prolifération cellulaire par mitose, (b) par méiose et (c) la spermiogénèse (Leblond et Clermont, 1952; Oakberg, 1956), associées respectivement aux spermatogonies, aux spermatocytes et aux spermatides (Schéma 4). L'apoptose a lieu surtout au moment de la prolifération (spermatogonies) et de la méiose (spermatocytes) (Blanco-Rodriguez, 1998).

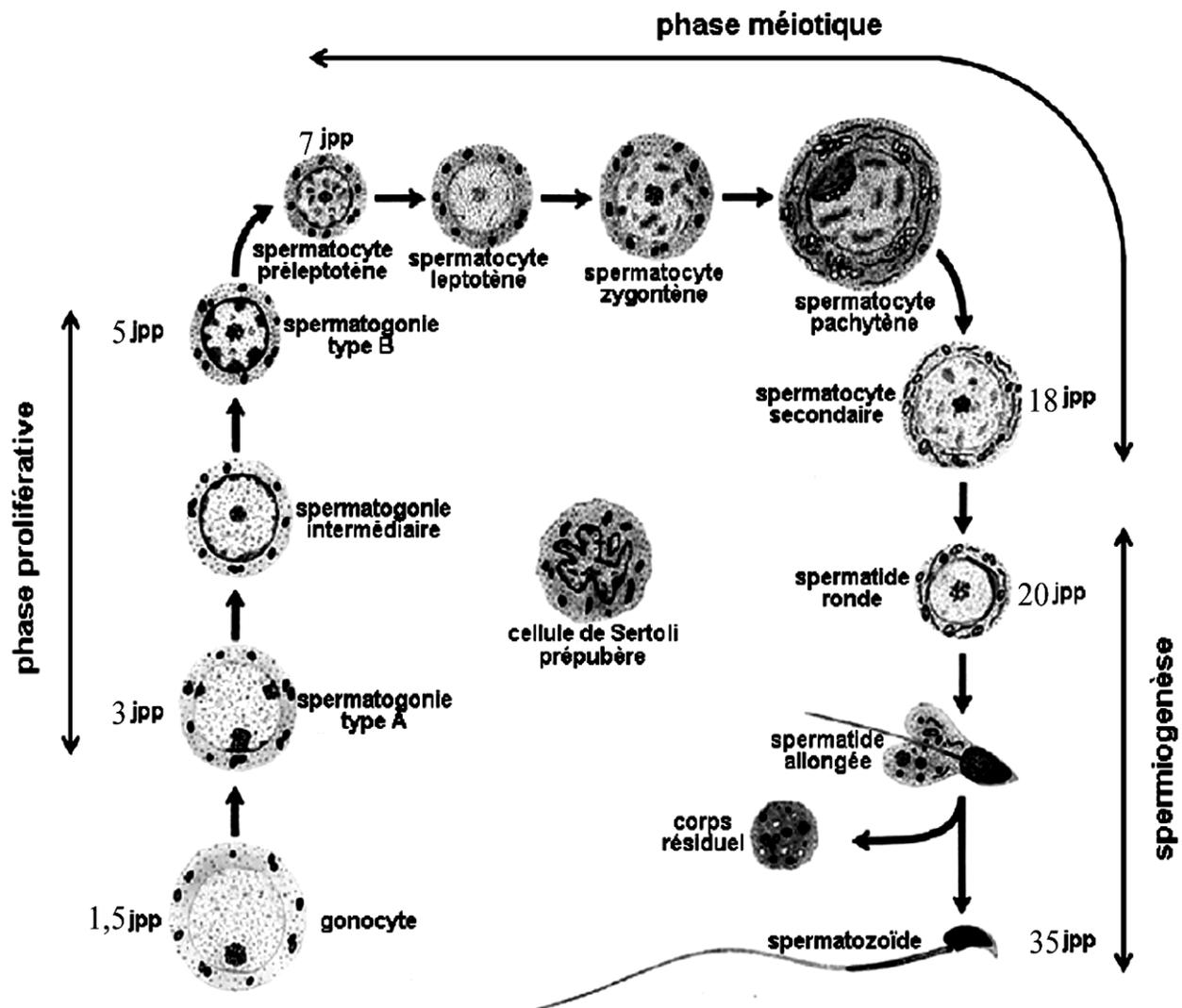


Schéma 4: Structures morphologiques de cellules germinales caractéristiques des phases de la spermatogénèse chez la souris

Le Schéma met en relief le volume relatif et les caractéristiques morphologiques des cellules germinales à chacun des stades de l'épithélium séminifère. Les trois phases de la spermatogénèse sont également indiquées. jpp : jours *post-partum*. Modifié de (Bellve et coll., 1977)

2.2 Le rôle du cholestérol dans le testicule

2.2.1 Le tissu interstitiel

Le cholestérol est le précurseur majeur de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes dans le testicule, l'ovaire et le cortex surrénal (Eik-Nes, 1971). L'administration de l'hormone lutéinisante (LH) augmente la stéroïdogénèse et baisse la réserve en cholestérol dans le testicule (Hall et coll., 1969; Bartke, 1971a). Le cholestérol libre et estérifié ont des localisations intracellulaires différentes et répondent différemment à la stimulation hormonale dans le testicule (Pokel et coll., 1972). L'administration de LH provoque la baisse du taux de cholestérol estérifié contenu dans les gouttelettes lipidiques alors que la suppression de la LH entraîne l'accumulation (Pokel et coll., 1972). Par contre l'effet du même traitement hormonal sur le taux de cholestérol libre est plus difficile à évaluer (Pokel et coll., 1972). La transformation du cholestérol estérifié en stéroïde nécessite son hydrolyse préalable en acide gras et en cholestérol libre. Le cholestérol libre peut diffuser à travers les membranes cellulaires et s'équilibrer rapidement avec le cholestérol libre intracellulaire (Goodman, 1965). Cette dynamique de flux explique l'absence de variation du taux de cholestérol libre interstitiel dans diverses conditions expérimentales (Aoki et Massa, 1975).

2.2.2 Le tubule séminifère

Les cellules de Sertoli sont incapables de synthétiser des androgènes (Gregory et DePhilip, 1998) et n'utilisent pas le cholestérol à cette fin. Ces cellules peuvent synthétiser des œstrogènes à partir de la testostérone mais pas à partir du cholestérol (Dorrington et

coll., 1978; Carreau et coll., 2002). Le cholestérol est indispensable à la fluidité des membranes, par conséquent à la survie de toutes les cellules. Les tubules séminifères contiennent seulement 6,6% du cholestérol testiculaire total (Ichihara, 1969). Cependant, le maintien de cette fraction est indispensable au déroulement de la spermatogenèse. Le cholestérol intratubulaire augmente lorsque la spermatogenèse est naturellement ou pathologiquement arrêtée. Par exemple durant la période de régression saisonnière du testicule chez les amphibiens et les reptiles (Lofts et Boswell, 1960), le vison (Onstad, 1967; Kabbaj et coll., 2003; Akpovi et coll., 2006) et durant l'orchite autoimmune spontanée chez le vison (Akpovi et coll., 2006) ou chez la souris présentant le syndrome de féminisation testiculaire (Chung et Hamilton, 1975).

2.2.3 Le spermatozoïde

Chez la plupart des espèces, le cholestérol est le plus abondant des stérols dans le spermatozoïde éjaculé en comparaison avec le desmostérol (précurseur intermédiaire de cholestérol), le cholesta-7,24-dien-3 β -ol, le sulfate de desmostérol, le sulfate de cholestérol, et les esters de cholestérol qui sont en quantité réduite (Nikolopoulou et coll., 1985; Agrawal et coll., 1988; Awano et coll., 1989). Dans les cellules somatiques, l'essentiel du cholestérol libre est contenu dans la membrane plasmique (Yeagle, 1985). Dans les spermatozoïdes, le ratio cholestérol/phospholipides (C/PL) est plus élevé dans la membrane plasmique que dans les membranes de l'acrosome (Parks et coll., 1987). Cependant, la concentration en cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes varie d'une espèce à une autre. Le ratio C/PL mesuré dans la fraction de membrane de spermatozoïdes

est de 0,20 chez le sanglier (Parks et Lynch, 1992); 0,36 chez l'étalon (Parks et Lynch, 1992); 0,40 chez le bovin (Parks et coll., 1987); 0,43 chez le bélier (Parks et Hammerstedt, 1985) et 0,83 chez l'homme (Mack et coll., 1986). Le spermatozoïde est capable de synthétiser du cholestérol *in vitro* à partir de l'acétate mais en quantité limitée (Gunasegaram et coll., 1995). Il est généralement reconnu que les spermatozoïdes acquièrent du cholestérol de leur environnement (Parks et Hammerstedt, 1985; Rana et coll., 1991). Chez le bouc et le bélier, la membrane plasmique des spermatozoïdes acquièrent du cholestérol durant leur transit épидидymaire (Parks et Hammerstedt, 1985; Rana et coll., 1991), mais elle en perd chez le cheval (Hall et coll., 1991; Lopez et de Souza, 1991) et n'est pas affectée chez le sanglier (Nikolopoulou et coll., 1985). Le taux élevé de cholestérol contenu dans la membrane plasmique du spermatozoïde diminue la fluidité membranaire et empêche la capacitation (Yanagimachi, 1994; Cross, 1998).

2.3 Le métabolisme du cholestérol dans le testicule

Dans le testicule, le taux du cholestérol estérifié chute à la fin du développement postnatal chez la souris (Bartke, 1971a) et le vison (Akpovi et coll., 2006). D'une façon générale, les cellules obtiennent le cholestérol nécessaire à leur fonctionnement par la synthèse *de novo* ou par son importation à partir des lipoprotéines du sang. L'excès de cholestérol intracellulaire est estérifié et mis en réserve sous forme de gouttelettes lipidiques (Goodman, 1965) ou exporté et transporté au foie par transport inverse du cholestérol (Franceschini et coll., 1991). Les facteurs de régulation cellulaire du

métabolisme du cholestérol peuvent être regroupés en facteurs enzymatiques et non enzymatiques (Schéma 5).

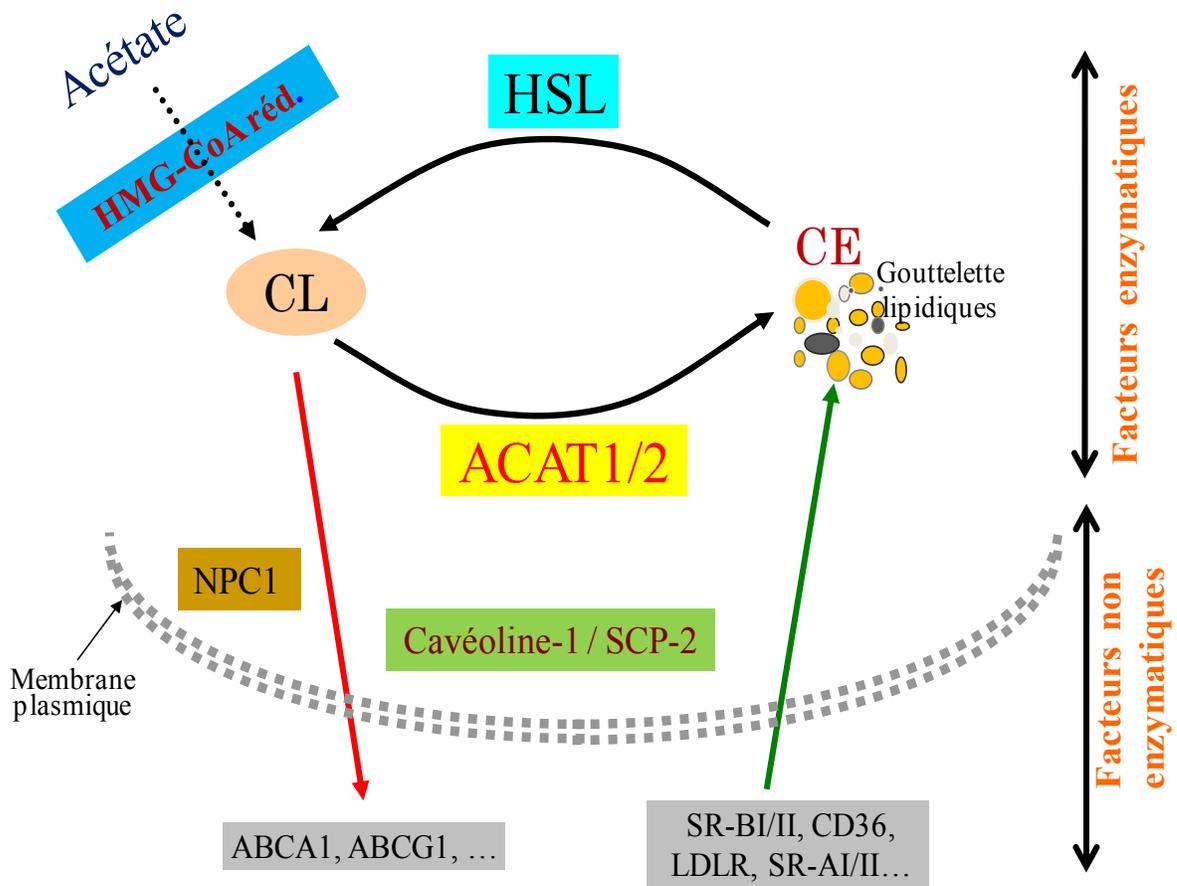


Schéma 5: Résumé schématique des facteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol dans le testicule

CL : cholestérol libre, CE : cholestérol ester.

2.3.1 Facteurs enzymatiques

2.3.1.1 La synthèse de cholestérol: HMG-CoA réductase

Toutes les cellules peuvent synthétiser le cholestérol *de novo* (Dietschy et Turley, 2002). Tous les tissus, à part le foie, synthétisent collectivement autant de cholestérol que le foie lui-même (Dietschy et coll., 1993). La biosynthèse du cholestérol nécessite les actions combinées de plusieurs enzymes. Le complexe de protéines «Sterol Regulatory Element Binding Proteins» / «SREBP cleavage activating protease» (SREBP/SCAP), localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique, contrôle l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol (Horton et coll., 2002). Lorsque le niveau intracellulaire de cholestérol baisse, SCAP achemine SREBP vers l'appareil de Golgi où il sera clivé par deux enzymes S1P et S2P puis transformé en facteur de transcription (Brown et Goldstein, 1997; Horton et coll., 2002). SREBP est une famille de protéines qui regroupe SREPB1a, SREPB1c, SREPB2 (Brown et Goldstein, 1999; Osborne, 2000) et SREPB2gc qui est exprimé exclusivement dans les cellules germinales mâles (Wang et coll., 2002). Une fois activé, le SREBP est transloqué au noyau où il active la transcription de l'hydroxyméthyl-glutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) et celle de plusieurs autres enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol comme la HMG-CoA synthase, la farnesyl diphosphate synthase, et la squalene synthase (Osborne, 1995; Ericsson et coll., 1996). De plus, les SREBPs contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le transport de cholestérol tels que le récepteur de LDL, SR-BI/SR-BII et ABCA1 (Repa et coll., 2000) et dans la synthèse des acides gras tels que l'acétyl-CoA carboxylase, les acides gras synthases, la stéaroyl CoA désaturase-1, et la lipoprotéine lipase (Kim et Spiegelman, 1996;

Lopez et coll., 1996). La HMG-CoA réductase catalyse la réduction de la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) en mévalonate, étape limitante de la synthèse du cholestérol et des isoprénoïdes (Goldstein et Brown, 1990). L'expression et l'activité de la HMG-CoA réductase sont contrôlées par un complexe régulateur multivalent qui est régulé par les produits du métabolisme du mévalonate (Brown et Goldstein, 1980). Ceci implique, en outre, l'ubiquitination stérol-dépendante de la HMG-CoA réductase (Ravid et coll., 2000) suivie de sa dégradation (Sever et coll., 2003). Trois formes d'ARNm de la HMG-CoA réductase ont été rapportées dans le testicule dont deux sont spécifiques (4.0 – 4.2-kb) à l'organe et une autre (4.8-kb) est ubiquiste (Ness et Nazian, 1992). Toutefois, seule l'expression de la forme ubiquiste a été corrélée avec l'activité enzymatique de la HMG-CoA réductase dans le testicule (Ness et Nazian, 1992). La HMG-CoA réductase joue un rôle fondamental dans le testicule parce qu'environ 60% du cholestérol utilisé dans le tissu interstitiel provient de la synthèse *de novo* (Morris et Chaikoff, 1959). Le cholestérol synthétisé par la cellule de Leydig est rapidement converti en testostérone lorsque celle-ci est stimulée par l'hormone gonadotrophine chorionique humaine (hCG) (Hou et coll., 1990). Il a été démontré que l'inhibition de la HMG-CoA réductase dans la cellule de Leydig par la pravastatine cause une baisse de la synthèse de la testostérone et du pool de cholestérol estérifié (van Vliet et coll., 1995). L'activité enzymatique de la HMG-CoA réductase est élevée dans les pachytènes mais faible dans les spermatides (Potter et coll., 1981).

2.3.1.2 L'estérification du cholestérol libre: ACAT1 et ACAT2

L'acyl-coenzyme A: cholestérol acyltransférase type 1 (ACAT1) et type 2 (ACAT2) assurent l'estérification du cholestérol intracellulaire (Goodman, 1965). Dans le foie et l'intestin grêle, le cholestérol estérifié est incorporé aux apolipoprotéines avant d'être sécrété dans la circulation sous forme de VLDL et de chylomicron (Hamilton, 1972; Havel, 1977). Les lipoprotéines circulantes sont captées par les cellules et leur contenu en cholestérol estérifié est hydrolysé en cholestérol libre pour être utilisé (Glass et coll., 1983). Au besoin, le cholestérol libre peut être ré-estérifié dans la cellule par l'ACAT1 puis accumulé dans les gouttelettes lipidiques (Meiner et coll., 1997). L'ACAT1 et l'ACAT2 ont une distribution tissulaire différente. L'ACAT1 est ubiquiste et son expression est élevée dans l'intestin grêle, le foie et les tissus stéroïdogéniques y compris le testicule (Chang et coll., 1997; Meiner et coll., 1997; Sakashita et coll., 2000). Par contre, l'expression de l'ACAT2 est restreinte au foie et à l'intestin grêle où elle assure l'essentiel de l'estérification du cholestérol (Buhman et coll., 2000; Wilcox et coll., 2001; Repa et coll., 2004). Dans les tissus stéroïdogéniques, c'est l'ACAT1 qui assure cette fonction (Tavani et coll., 1982; Veldhuis et coll., 1985). L'inactivation génétique de l'ACAT1 ou de l'ACAT2 n'a pas d'impact rapporté sur la reproduction féminine et masculine (Accad et coll., 2000; Buhman et coll., 2000; Repa et coll., 2004). L'inactivation du gène d'ACAT1 abolit l'activité d'estérification de cholestérol dans le testicule (Yagyu et coll., 2000), ce qui soulève la question de savoir si l'ACAT2 est active dans le testicule.

2.3.1.3 L'hydrolyse du cholestérol estérifié: HSL

La lipase hormono-sensible (*hormone-sensitive lipase (HSL)*) est une enzyme multifonctionnelle qui catalyse l'hydrolyse des tri-, di- et mono-acylglycérols, dans le tissu adipeux et d'esters de cholestérol et de rétinol dans la glande surrénale, les gonades et les macrophages (Yeaman, 1990; Kraemer et Shen, 2002). C'est une hydrolase neutre intracellulaire dont le rôle dans la stéroïdogénèse a été largement étudié dans la glande surrénale et l'ovaire (Yeaman, 1990; Kraemer et coll., 1991; Hui, 1996). La HSL (protéine et ARNm) est exprimée dans les spermatides, les spermatozoïdes, la cellule de Sertoli et les macrophages testiculaires (Kraemer et coll., 1993; Holst et coll., 1994; Kabbaj et coll., 2003) mais absente dans les cellules de Leydig (Holst et coll., 1994; Kabbaj et coll., 2003). Le taux sanguin de testostérone n'est pas altéré chez la souris HSL^{-/-} (Holst et coll., 1994; Holst et coll., 1996).

Les travaux réalisés sur des souris HSL^{-/-} ont montré que les mâles homozygotes étaient stériles (Osuga et coll., 2000; Chung et coll., 2001) à cause d'une oligospermie et les tubules séminifères montraient une accumulation d'ester de cholestérol (Vallet-Erdtmann et coll., 2004). La stérilité consécutive à la suppression du gène d'HSL chez le mâle était due à l'absence d'une isoforme spécifique au testicule (HSL_{tes}) (Vallet-Erdtmann et coll., 2004). Cette isoforme est exprimée seulement dans les cellules germinales post-méiotiques mais absente des cellules de Sertoli (Vallet-Erdtmann et coll., 2004).

2.3.2 Facteurs non enzymatiques du métabolisme du cholestérol: les transporteurs de cholestérol

2.3.2.1 Les transporteurs intracellulaires

Plus de 85% du cholestérol cellulaire est localisé dans la membrane plasmique (Yeagle, 1985; Schroeder et coll., 1990), ce qui représente 35 - 45% des lipides contenus dans la membrane plasmique (Kaplan et Simoni, 1985). Le réticulum endoplasmique où le cholestérol est synthétisé contient très peu de cholestérol libre (Lange et Steck, 1997) parce qu'il est transporté aussitôt après synthèse vers d'autres organelles ou estérifié et mis en réserve (Zambrano et coll., 1975). Le cholestérol importé à partir des lipoprotéines contribue aussi à son pool intracellulaire (Benahmed et coll., 1983a; Brown et Goldstein, 1986).

Le cholestérol est acheminé d'un compartiment cellulaire à un autre par transport vésiculaire et non vésiculaire (Liscum et Underwood, 1995; Lange et Steck, 1996). Le transport vésiculaire nécessite le cytosquelette et de l'énergie sous forme d'ATP alors que le transport non vésiculaire est assuré par des protéines solubles telles que le « sterol carrier protein 2 » (SCP-2) (Puglielli et coll., 1995), la cavéoline-1 (Liu et coll., 2002) et le Niemann-Pick type C (NPC) (Garver et coll., 2002).

2.3.2.1.1 Cavéoline-1 et SCP-2

La cavéoline-1 est une protéine membranaire des cavéoles ou microdomaines membranaires riches en cholestérol (Maxfield et Wustner, 2002). La cavéoline-2 est généralement co-exprimée avec la cavéoline-1 avec laquelle elle peut former des hétérodimères, alors que la cavéoline-3 remplace la cavéoline-1 dans les cellules du muscle strié (Liu et coll., 2002). L'expression (ARNm et protéine) de la cavéoline-1 a été rapportée dans les cellules germinales en développement et dans les spermatozoïdes (Travis et coll.,

2001) mais pas dans la cellule de Sertoli (Evans et coll., 2003). Inversement, SCP-2 est exprimé dans la cellule de Sertoli mais pas dans les cellules germinales (van Haren et coll., 1992). Travis et coll. (2001) ont rapporté que la cavéoline-1 contribue à la formation de l'acrosome dans les cellules germinales. La cavéoline-1 interagit également avec la protéine SCP-2 (Zhou et coll., 2004) durant le transport du cholestérol libre du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Puglielli et coll., 1995). Dans la cellule de Leydig, SCP-2 transporte le cholestérol du cytosol vers la mitochondrie (van Noort et coll., 1988) et les peroxysomes (Mendis-Handagama et coll., 1992).

2.3.2.1.2 Niemann-Pick type C (NPC)

L'endocytose de particules de LDL du sang aboutit à l'hydrolyse acide intralysosomiale du cholestérol estérifié puis à la libération du cholestérol libre dans les endosomes (Beglova et Blacklow, 2005). Le transport du cholestérol ainsi généré vers d'autres organelles cellulaires dépend de deux protéines: le Niemann-Pick type C1 (NPC1) et type C2 (NPC2). Ces protéines ont été ainsi nommées parce que ce sont les protéines dont la mutation est à l'origine de la maladie nommée Niemann-Pick type C (Vanier et coll., 1991; Chang et coll., 2005). Le NPC1 est une protéine à 13 domaines transmembranaires (Davies et Ioannou, 2000) associée à la membrane des endosomes tardifs (Garver et coll., 2000) tandis que le NPC2 est une protéine soluble, glycosylée et localisée dans la lumière des endosomes tardifs. Ces deux protéines se lient au cholestérol libre (Ko et coll., 2001; Ko et coll., 2003; Ohgami et coll., 2004).

La suppression génétique de NPC1 chez la souris entraîne une accumulation de cholestérol dans le testicule (Xie et coll., 1999). Les cellules de Leydig de souris NPC1^{-/-}

produisent moins de testostérone (Roff et coll., 1993). La suppression du gène de NPC1 empêche le transport du cholestérol vers la mitochondrie où il devrait être converti en 20 α -hydroxy-cholestérol, composé intermédiaire de la synthèse de la testostérone (Roff et coll., 1993). Les souris mâles et femelles NPC1^{-/-} sont infertiles (Erickson et coll., 2002; Fan et coll., 2006). Les spermatozoïdes produits par les souris NPC1^{-/-} sont incapables de se fusionner et de féconder l'ovule *in vitro* (Fan et coll., 2006).

2.3.2.2 Transporteurs sélectifs de cholestérol à travers la membrane plasmique

Les tissus stéroïdogéniques importent du cholestérol dérivé des lipoprotéines circulantes (Morris et Chaikoff, 1959; Faust et coll., 1977; Andersen et Dietschy, 1978). Les HDL et les LDL peuvent acheminer le cholestérol aux tissus stéroïdogéniques (Johnson et coll., 1991). Cependant, la contribution relative de chacune de ces lipoprotéines varie selon l'espèce. Les HDL constituent la principale source de cholestérol circulant dans des tissus stéroïdogéniques chez les rongeurs (Glass et coll., 1983; Rigotti et coll., 2003) alors que les LDL constituent la source majeure chez l'humain (Liu et Krieger, 2002). Plusieurs récepteurs sont capables de se lier aux LDL/HDL pour médier le transport du cholestérol à l'intérieur de la cellule.

- *Le récepteur du LDL (LDLR)*: appelé aussi récepteur d'Apo B/E, LDLR se lie au LDL, VLDL et aux chylomicrons (Innerarity et Mahley, 1978; Brown et Goldstein, 1986). La captation de cholestérol médié par le LDLR conduit à l'hydrolyse acide intralysosomiale du cholestérol estérifié (Brown et Goldstein, 1986; Davis et coll., 1987).

- *Les récepteurs «scavengers» de classe A type I (SR-AI) et SR-AII* proviennent de l'épissage alternatif d'un même ARN natif (Kodama et coll., 1990; Rohrer et Kuhn, 1990) et sont exprimés (ARNm et protéine) dans les macrophages. Ils médient la phagocytose des LDL modifiés (oxydé et acétylé)(Krieger et Herz, 1994), des molécules polyanioniques (Krieger et coll., 1993; Krieger et Herz, 1994) et des cellules en apoptose (Platt et coll., 1999). Il n'est pas connu si SR-AI et SR-AII sont exprimés dans le testicule.

- *Les récepteurs «scavengers» de classe B*: ce sont le CD36, le SR-BI et le SR-BII (Wyler et coll., 1993; Acton et coll., 1994; Calvo et coll., 1995) qui peuvent médier le transport de cholestérol dérivé des LDL modifiés (Acton et coll., 1994; Calvo et coll., 1998; Podrez et coll., 2000). Cependant, contrairement au LDLR, le CD36 et le SR-BI/SR-BII sont surtout connus pour leur propriété de liaison aux HDL via l'Apo A (I et II) (Johnson et coll., 1991; Acton et coll., 1996; de Beer et coll., 2004)

Nous avons ciblé CD36, SR-BI et SR-BII dans notre étude parce que: 1) ceux-ci sont des récepteurs spécifiques de HDL, la source préférentielle de cholestérol circulant dans les tissus stéroïdogéniques chez la souris (Rigotti et coll., 1997; Azhar et coll., 1999; Reaven et coll., 1999) et 2) CD36, SR-BI et SR-BII sont des récepteurs multiligands (Krieger, 2001) impliqué aussi dans la phagocytose des cellules germinales apoptotiques au cours de la spermatogenèse (Shiratsuchi et coll., 1999; Nakagawa et coll., 2005). Nous avons de plus étudié l'ABCA1 dont la suppression génétique expérimentale entraîne une hypofertilité suivie d'une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les tubules séminifères (Selva et coll., 2004).

2.3.2.2.1 SR-BI et SR-BII

2.3.2.2.1.1 Structure

Le SR-BI et le SR-BII font partie de la famille de récepteurs «éboueurs» de classe B qui comprend aussi le CD36 (Acton et coll., 1994; Webb et coll., 1997). Le gène de SR-BI est localisé sur le chromosome 5 chez la souris (Welch et coll., 1997) et sur le chromosome 12 chez le rat et l'humain (Johnson et coll., 1998). L'homologue du SR-BI chez l'humain est le CLA-1 (Calvo et Vega, 1993). Le SR-BI est le récepteur spécifique des lipoprotéines de haute densité (HDL) auxquelles il se lie pour en transférer sélectivement (sans endocytose) le contenu lipidique à l'intérieur de la cellule (Acton et coll., 1996; Temel et coll., 1997; Krieger, 1999). Cette fonction a été mise en évidence par la surexpression de la protéine de SR-BI dans les «*Chinese hamster ovary cells*» (CHO) qui augmentait l'entrée sélective de cholestérol estérifié dérivé des HDL (CE-HDL) (Acton et coll., 1994). La structure de la protéine de SR-BI est largement préservée dans les différentes espèces. Le SR-BI de rat partage respectivement, 90 %, 88 % et 78 % d'homologie avec celui de souris, du hamster et de l'homme (Johnson et coll., 1991).

SR-BII est une isoforme de SR-BI et provient de l'épissage alternatif d'un même précurseur d'ARN. Il possède un domaine cytoplasmique plus court que SR-BI. SR-BI et SR-BII se lient aux HDL avec la même affinité, mais SR-BII assure la captation cellulaire des HDL par endocytose (Eckhardt et coll., 2004 et 2006). SR-BI est une glycoprotéine de 509 acides aminés de 82-86 kDa (Acton et coll., 1994) en forme de boucle à courts domaines cytoplasmiques amino- (N) et carboxy- (C) terminaux, deux domaines transmembranaires et une large boucle extracellulaire N-glycosylée (Babitt et coll., 1997;

Krieger, 1999; Vinals et coll., 2003) (Schéma 6). SR-BI et SR-BII possèdent des séquences peptidiques identiques à l'exception du domaine intracellulaire C-terminal. Le domaine C-terminal de SR-BI compte 42 acides aminés de l'exon 12, celui de SR-BII 39 de l'exon 13 différents de ceux de SR-BI (Webb et coll., 1997; Webb et coll., 1998) (Schéma 7).

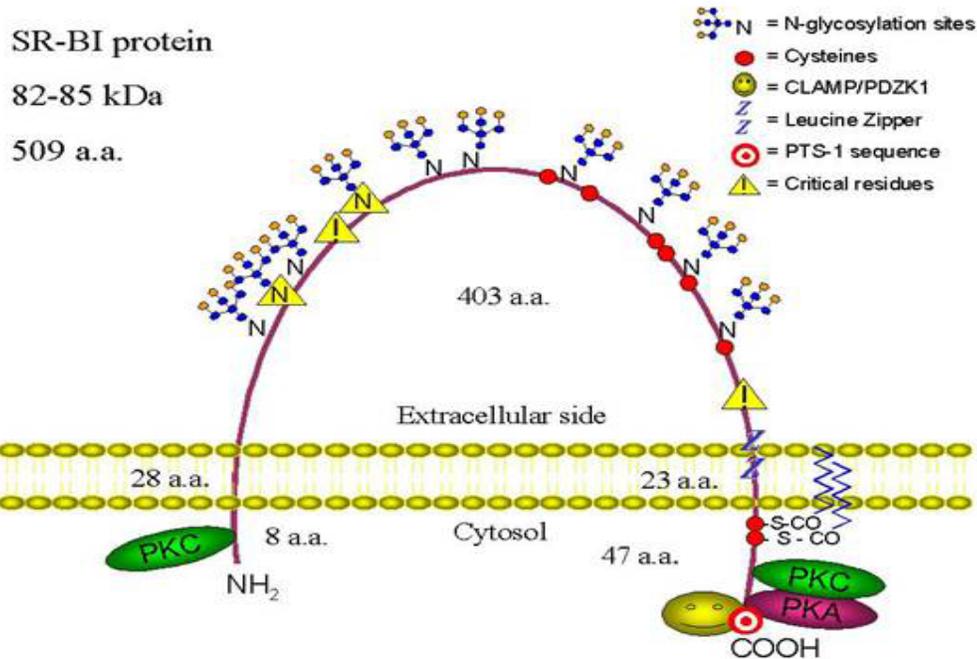


Schéma 6: Représentation graphique de la protéine de SR-BI de rongeur.

Les triangles indiquent les résidus critiques dont la mutation (M158 et Q402/418) et/ou la perte de la N-glycosylation (N108 et N173) conduit à l'annulation de la captation sélective de lipides (Rhainds et Brissette, 2004).

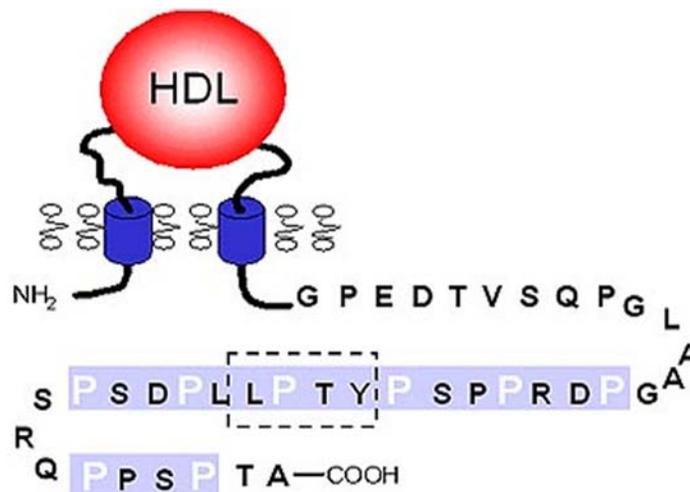


Schéma 7: Séquences de la région C-terminale spécifique à SR-BII.

Le domaine cytoplasmique C-terminal de SR-BII contient des sites critiques de signalisation: motifs riche en prolines (PxxP) (case grise) qui pourrait reconnaître les domaines SH3; un domaine candidat à la liaison au SH2 contenant une tyrosine et de résidus d'acide aminé hydrophobe (cadre en pointillé) (Mulcahy et coll., 2004).

2.3.2.2.1.2 Localisation

L'expression de la protéine de SR-BI est élevée dans le foie et les tissus stéroïdogéniques (Landschulz et coll., 1996; Rigotti et coll., 2003; Akpovi et coll., 2006). Les auteurs (Landschulz et coll., 1996; Reaven et coll., 2000) qui ont rapporté une expression faible de SR-BI dans le testicule avait fait leurs mesures sur les homogénats de testicule entier. En séparant le testicule en ses deux compartiments cellulaires distincts, nous avons montré que le niveau d'expression protéinique de SR-BI était élevé dans les fractions testiculaires et dans le foie (Akpovi et coll., 2006).

Les cellules de Leydig et les macrophages (Reaven et coll., 2000; Yu et coll., 2004; van der Velde et Groen, 2005), les cellules germinales et les cellules de Sertoli expriment SR-BI et SR-BII (Landschulz et coll., 1996; Nakagawa et coll., 2004; Akpovi et coll., 2006).

2.3.2.2.1.3 Régulation de l'expression

2.3.2.2.1.3.1 Régulation transcriptionnelle

L'hormone gonadotrophine chorionique humaine (hCG) accroît l'incorporation de cholestérol dérivé des HDL dans la testostérone en augmentant l'expression de l'ARNm et de la protéine de SR-BI dans les cellules de Leydig (Landschulz et coll., 1996; Reaven et coll., 2000). L'expression de SR-BI dans les macrophages est régulée par des facteurs différents. Les ligands des récepteurs nucléaires PPAR α / γ (peroxisome proliferator-activated receptor), la 15-deoxy- δ -12,4-prostaglandine J2 (Chinetti et coll., 2000) et la testostérone (Langer et coll., 2002) augmentent l'expression de la protéine SR-BI dans les

macrophages. Dans l'épithélium séminifère, l'expression de SR-BI est sous le contrôle de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Nakagawa et coll., 2004).

2.3.2.2.1.3.2 Régulation post-transcriptionnelle

2.3.2.2.1.3.2.1 *Phosphorylation, glycosylation et acylation*

La région cytoplasmique C-terminale de SR-BI comporte plusieurs sites potentiels de phosphorylation: neuf positions en sérine, un en thréonine et deux en tyrosine (Calvo et Vega, 1993). Certaines de ces positions sont des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C (sérine 476 et sérine 477) et par des protéines kinases AMPc- et GMPc-dépendantes (sérine 481) (Calvo et Vega, 1993). Jusqu'à présent, aucun site de phosphorylation n'a encore été identifié dans la structure de SR-BII.

SR-BI et SR-BII sont N-glycosylés sous leur forme mature (Babitt et coll., 1997; Vinals et coll., 2003). Il existe onze sites (résidus 102, 108, 116, 173, 212, 227, 255, 288,310, 330, 383) de glycosylation sur la boucle extracellulaire de SR-BI murin et neuf chez l'humain et le cobaye (Vinals et coll., 2003). Toutefois, tous les sites de glycosylation ne sont pas indispensables à la fonction de SR-BI. Vinals et coll. (2003) ont montré que la glycosylation en positions 108 et 173 était indispensable à la capacité de SR-BI à se lier aux HDL. L'impact de la glycosylation sur la fonction de SR-BII n'est pas connu.

SR-BI est rattaché à la membrane plasmique par deux sites d'acylation (palmitoylation ou myristoylation) en Cys⁴⁶² et Cys⁴⁷⁰ (Babitt et coll., 1997) et SR-BII (palmitoylation) en Cys⁴⁶² (Webb et coll., 1998).

2.3.2.2.1.3.2.2 *Interaction protéine-protéine*

SR-BI et SR-BII sont capables de former des homo-dimères et hétérodimères (Reaven et coll., 2004; Sahoo et coll., 2007). SR-BI est constitutivement exprimé sous forme de dimère dans la glande surrénale, l'ovaire et le testicule (Reaven et coll., 2004). Dans le testicule, SR-BII est exprimé sous forme de dimère chez le rat et de monomère chez la souris (Reaven et coll., 2004).

Le domaine cytoplasmique C-terminal de SR-BI contient le motif (EAKL) de liaison au PDZK1 (Silver, 2002). SR-BI et PDZK1 co-immunoprécipitent dans les hépatocytes *in vivo* (Ikemoto et coll., 2000). PDZK1 est une protéine de 70 kDa qui contient le domaine PDZ (Kocher et coll., 1998). La suppression génétique expérimentale de PDZK1 réduit l'expression de la protéine SR-BI dans le foie alors qu'elle est sans impact sur le testicule (Kocher et coll., 2003).

2.3.2.2.1.3.2.3 *Autres propriétés de SR-BI et de SR-BII*

SR-BI contient une séquence de ciblage peroxysomale PTS1 (*peroxysomal targeting sequence*) dans le domaine C-terminal. PTS1 médie l'importation de divers composés dans le peroxysome (Dodt et coll., 1995; Fransen et coll., 1995). SR-BI pourrait donc être impliqué dans la β -oxydation de cholestérol dans les peroxysomes. SR-BI contient un autre motif, le *leucine-zipper*, dans le même domaine C-terminal (Landschulz et coll., 1988) impliqué dans la formation de dimère de SR-BI (Sahoo et coll., 2007). SR-BII est dépourvu de PTS1 et de *leucine-zipper* (Johnson et coll., 1998). Cependant, six motifs proline-proline (PXXP) et deux motifs PXXP ont été identifiés dans le domaine C-terminal

de SR-BII humain (Mulcahy et coll., 2004) et murin (Webb et coll., 1998), mais pas dans SR-BI. Le motif PXXP est un ligand au domaine SH3 (*src homology 3*) contenu dans plusieurs protéines (Pawson, 1995). Dans le cas de SR-BII, il pourrait s'agir de la phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) (Mulcahy et coll., 2004).

2.3.2.2.1.4 Ligands de SR-BI et de SR-BII

SR-BI peut se lier à une multitude de ligands (Krieger, 2001). Une liaison spécifique du ligand au SR-BI nécessite une distribution appropriée de charges négatives du ligand (Williams et coll., 2000). L'acétylation, la maléylation et la glycation, qui augmentent la charge négative nette des protéines (BSA, LDL) et changent leur conformation, améliorent l'affinité de liaison du ligand au SR-BI (Ohgami et coll., 2001; Miyazaki et coll., 2002). Les apoprotéines des HDL, Apo A-I, Apo A-II et Apo C-III se lient également au SR-BI avec forte affinité (Xu et coll., 1997). Le SR-BI peut se lier au HDL, LDL, VLDL (Acton et coll., 1996; Trigatti et coll., 2000b). L'Apo E est également un ligand de SR-BI mais de plus faible affinité que l'Apo A-I (kD = 38 μ g/ml et 3,8 μ g/ml respectivement) (Li et coll., 2002). En plus des lipoprotéines, le SR-BI peut se lier à l'albumine bovine maléylée (M-BSA) (Acton et coll., 1994), à la protéine amyloïde A sérique (Paresce et coll., 1996) et aux phospholipides (PL) anioniques comme la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidylinositol (PI) (Urban et coll., 2000; Kawasaki et coll., 2002). La liaison de SR-BI à la PS se fait au niveau des acides aminés 33-191 de la boucle extracellulaire du récepteur (Kawasaki et coll., 2002).

2.3.2.2.1.5 Fonctions

2.3.2.2.1.5.1 Transport du cholestérol

Les souris femelles SR-BI^{-/-} sont infertiles à cause d'un défaut de maturation des ovocytes causé par un mauvais métabolisme du cholestérol dans l'ovaire (Trigatti et coll., 1999). Le fait que les souris mâles SR-BI^{-/-} ne soient pas infertiles implique l'existence possible de mécanismes compensatoires dans le testicule. SR-BI joue un rôle important dans le transport du cholestérol dans le testicule : 1) La stimulation des cellules de Leydig à la hCG augmente l'expression de SR-BI (Azhar et coll., 1998; Azhar et Reaven, 2002) et un accroissement de l'incorporation de cholestérol dérivé des HDL dans la testostérone (Reaven et coll., 2000); 2) Dans les conditions physiologiques normales, environ 30% du cholestérol métabolisé dans les cellules de Leydig proviennent des HDL (Xie et coll., 2006) dont le récepteur spécifique est le SR-BI (Glass et coll., 1983; Rigotti et coll., 1997; Azhar et Reaven, 2002); 3) Les HDL sont également la source majeure de cholestérol d'origine sanguine dans les tubules séminifères (Fofana et coll., 1996) ; 4) Chez le vison normal par exemple, le maintien du taux intratubulaire du cholestérol compatible avec l'activité spermatogénétique requiert une expression élevée de SR-BI et de SR-BII (Akpovi et coll., 2006). Chez le vison atteint d'orchite autoimmune spontanée, l'accumulation de cholestérol dans les tubules est accompagnée d'une baisse de l'expression de SR-BII (Akpovi et coll., 2006).

2.3.2.2.1.5.1.1 *Influx du cholestérol*

SR-BI contribue à l'entrée sélective dans la cellule de cholestérol dérivé des HDL en se liant d'abord à la lipoprotéine puis en facilitant la diffusion du cholestérol de la lipoprotéine vers la membrane plasmique (Connelly et Williams, 2004). Le transport sélectif de cholestérol dépend de la spécificité de liaison entre HDL et SR-BI. SR-BI est un multiligand capable de se lier à plusieurs lipoprotéines, mais seul HDL induit un transport sélectif de cholestérol, les autres lipoprotéines (LDL, VLDL, chylomicron, LDLox, LDLac, HDLox...) étant transportées par endocytose (Trigatti et coll., 2000b). Le domaine C-terminal de SR-BI est indispensable au transfert sélectif de cholestérol (Parathath et coll., 2004). CD36 et SR-BII se lient au HDL avec une affinité semblable à celle de SR-BI, mais CD36 est moins efficace dans le transport sélectif (Connelly et coll., 1999) alors que SR-BII effectue l'endocytose de HDL (Eckhardt et coll., 2006).

Trois modèles sont proposés pour expliquer le rôle de SR-BI dans la médiation de l'entrée sélective de cholestérol dérivé de HDL dans la cellule. 1) La liaison de SR-BI au HDL entraîne une héli-fusion entre les phospholipides de HDL et la face externe de la membrane plasmique suivie du transport des lipides vers la membrane plasmique (Gu et coll., 1998). 2) Dans un second modèle, SR-BI forme des canaux non-aqueux entre le HDL et la membrane plasmique à travers lesquels migrerait le cholestérol estérifié suivant son gradient de concentration (Rodrigueza et coll., 1999). 3) Le troisième modèle suggère que le transfert sélectif de cholestérol dérivé de HDL se fait par un processus de rétro-endocytose (Silver et coll., 2000). D'autres auteurs pensent que ce dernier modèle reflète d'avantage la fonction de SR-BII (Eckhardt et coll., 2006) que celle de SR-BI.

2.3.2.2.1.5.1.2 *Efflux du cholestérol*

Il existe d'innombrables preuves dans la littérature que le SR-BI effectue l'efflux du cholestérol libre cellulaire: 1) la localisation de SR-BI dans les cavéoles qui facilitent l'efflux du cholestérol (Fielding et Fielding, 1995); 2) il existe une corrélation entre l'augmentation de l'expression de la protéine de SR-BI et l'efflux du cholestérol libre dans l'ovaire (Ji et coll., 1997); 3) les cellules transfectées au SR-BI exportent le cholestérol libre radiomarqué vers les HDL et les liposomes (Jian et coll., 1998); 4) les hépatocytes et les macrophages effectuent l'efflux du cholestérol via SR-BI (Yancey et coll., 2000); 5) les macrophages issus de souris SR-BI^{-/-} accumulent le cholestérol et développent l'athérosclérose (Zhang et coll., 2003). Cependant, l'implication de SR-BI dans l'efflux du cholestérol reste controversée. Wang et coll. (2007) ont rapporté que l'efflux du cholestérol est significativement réduit dans les macrophages de souris ABCA1^{-/-} et ABCG1^{-/-}, mais pas dans ceux de souris SR-BI^{-/-} (Wang et coll., 2007). Selon ces auteurs, l'effet anti-athérosclérotique de SR-BI (Trigatti et coll., 1999) n'est pas lié à son rôle dans l'efflux du cholestérol (Zhang et coll., 2005).

2.3.2.2.1.5.2 Apoptose et phagocytose

La mort cellulaire programmée ou apoptose de cellules germinales peut être induite par une variété de stimuli comme l'exposition du testicule à la chaleur, une baisse importante de gonadotrophines ou du taux intratesticulaire de la testostérone (Sinha Hikim et Swerdloff, 1999). Les spermatocytes préleptotènes et pachytènes et les spermatides rondes aux stades VII et VIII sont les plus sujets à l'apoptose causée par une privation

hormonale (Sinha-Hikim et Swerdloff, 1993). L'absence de testostérone entraîne un arrêt de la différenciation des spermatides rondes aux stades VII et VIII et leur détachement prématuré de la cellule de Sertoli (O'Donnell et coll., 1996). Toutefois, l'apoptose peut également se produire de façon spontanée (Blanco-Rodriguez et Martinez-Garcia, 1996). Durant la spermatogenèse, plus de la moitié des cellules germinales en différenciation meurent, par apoptose, avant leur maturation en spermatozoïdes (Miething, 1992; Blanco-Rodriguez, 1998). Malgré cette apoptose massive, très peu de cellules germinales en apoptose sont détectées par des analyses histochimiques du testicule (Savill et Fadok, 2000). Cette observation s'expliquerait par le fait que les cellules germinales en apoptose sont rapidement éliminées par la cellule de Sertoli (Pineau et coll., 1991; Miething, 1992). Ceci suppose une identification des cellules en apoptose. La phosphatidylsérine (PS) de la membrane plasmique est un marqueur de cellules en apoptose (Schlegel et Williamson, 2001). Elle est basculée de la face interne de la membrane plasmique qu'elle occupe dans la cellule normale à sa face externe dans la cellule en apoptose (Zachowski, 1993; Krieser et White, 2002). Diverses études réalisées *in vitro* (Shiratsuchi et coll., 1997; Nakagawa et coll., 2004) et *in vivo* (Nakagawa et coll., 2005) ont montré que les cellules de Sertoli phagocytent les cellules germinales en apoptose par un mécanisme dépendant de la PS et de SR-BI (Nakanishi et Shiratsuchi, 2004). Dans un modèle proposé par Nakanishi et Shiratsuchi (2004), le SR-BI exprimé à la surface de la cellule de Sertoli se lie à la PS (Kawasaki et coll., 2002) qui identifie la cellule en apoptose. Le résultat final est l'élimination par phagocytose de la cellule germinale ciblée (Schéma 8).

La liaison SR-BI-PS déclenche l'activation d'une ou de plusieurs voies de signalisations qui passent par la phosphorylation de trois protéines kinases de la famille des

MAPKs dont p38, ERK et JNK (Osada et coll., 2006). Dans la cellule endothéliale, SR-BI induit l'apoptose en activant les mêmes voies de signalisation avec la contribution de «*nitric oxide syntase*» (NOS) (Li et coll., 2005). L'expression de la protéine de NOS a été rapportée dans les cellules germinales (Burnett et coll., 1995) où son expression est augmentée durant l'apoptose (Zini et coll., 1996; Lue et coll., 2003). La surexpression de NOS augmente le taux d'apoptose dans des cellules germinales (Ishikawa et coll., 2005). Le mécanisme présenté au Schéma 9 pourrait bien s'appliquer à l'apoptose des cellules germinales.

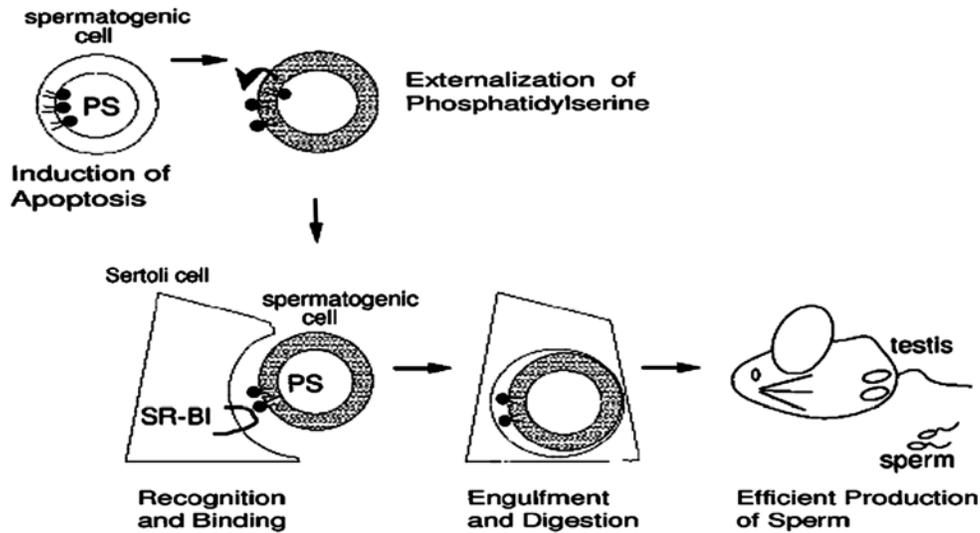


Schéma 8: SR-BI comme récepteur de phagocytose de cellules germinales

Les cellules germinales en apoptose exposent la PS à la face externe de leur membrane plasmique. La cellule de Sertoli, via le SR-BI, se lie à la PS. Cette liaison aboutit à l'élimination de la cellule germinale. (Adapté de Nakanishi et coll., 2004)

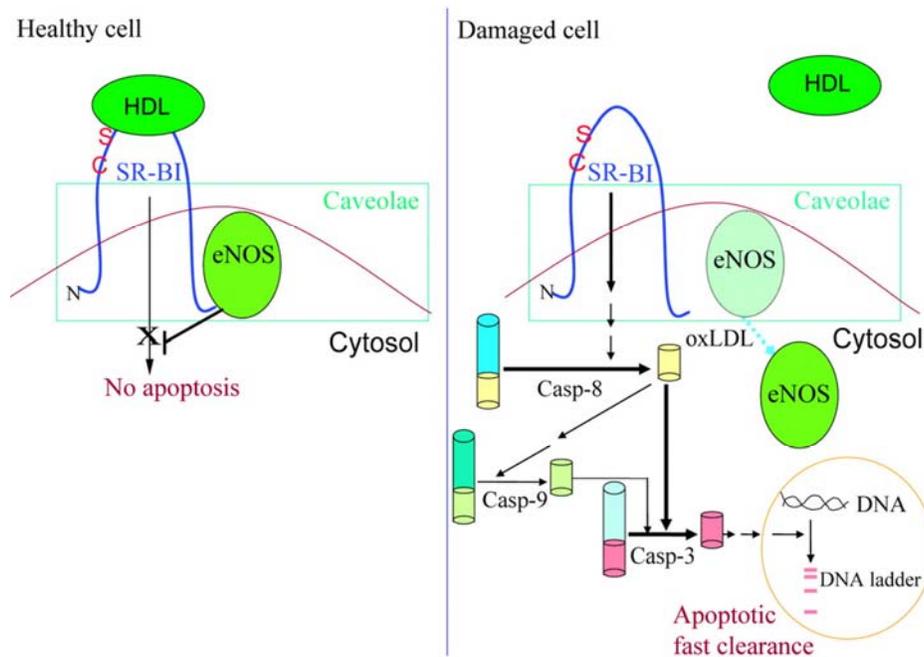


Schéma 9: SR-BI est impliqué dans la transmission des signaux d'apoptose

En présence de HDL, l'eNOS présente dans les cavéoles, bloque l'induction de l'apoptose par le SR-BI (schéma de droite). En absence de HDL et en conditions de stress, l'eNOS est délocalisée des cavéoles. Il s'en suit une activation de caspase 8 suivie d'autres caspase puis de l'apoptose (Li et coll., 2005).

2.3.2.2.2 CD36

2.3.2.2.2.1 Structure

Le gène de CD36 code pour une protéine de 471 acides aminés de poids moléculaire estimé à 53 kDa (Jochen et Hays, 1993). Le CD36 est une protéine à large boucle extracellulaire N-glycosylée en 10 positions de poids moléculaire de 80-90 kDa (Oquendo et coll., 1989). CD36 et SR-BI sont issus d'une même famille et leurs structures sont semblables (Schéma 10). Cependant, le domaine intracellulaire C-terminal de CD36 est plus court que celui de SR-BI et il est caractérisé par une paire de résidus de cystéine et par une palmitoylation (Tao et coll., 1996). Cette caractéristique assure le positionnement de CD36 dans les cavéoles et les radeaux lipidique (*rafts*) et affecte sa fonction (Pohl et coll., 2005; Ring et coll., 2006).

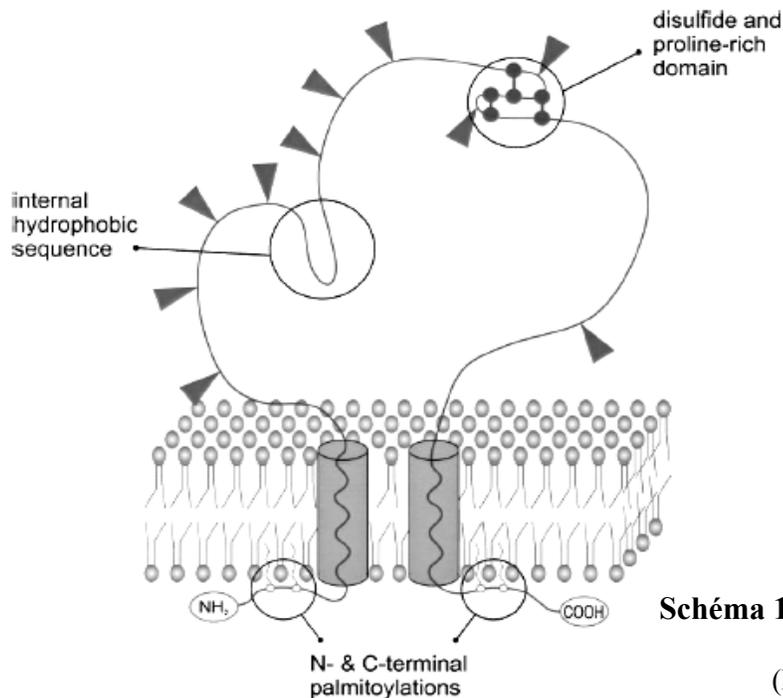


Schéma 10: Structure de CD36

(Hajri et Abumrad, 2002)

2.3.2.2.2.2 *Expression et localisation*

Dans le testicule, l'expression de la protéine de CD36 a été rapportée dans les cellules de Sertoli (Arenas et coll., 2004; Gillot et coll., 2005), les spermatides rondes et allongées (Zibara et coll., 2002) et les cellules de Leydig (Arenas et coll., 2004). La régulation post-traductionnelle joue un rôle important dans la distribution de la protéine de CD36. Dans le muscle par exemple, le taux de CD36 à la membrane plasmique est augmenté après la contraction musculaire et par la stimulation à l'insuline (Luiken et coll., 2002). Gillot et collègues (2005) ont rapporté que l'apparition de certaines cellules germinales dans les tubules séminifères favorise la translocation du CD36 cytosolique à la membrane plasmique des cellules de Sertoli.

2.3.2.2.2.3 *Fonctions*

En tant que récepteur éboueur, CD36 a la capacité de se lier à une variété de ligands: phospholipides anioniques (Rigotti et coll., 1995), cellules en apoptose (Ren et coll., 1995), thrombospondine (Asch et coll., 1987), collagène (Tandon et coll., 1989), acides gras à chaînes longues (Abumrad et coll., 1998). Mais CD36 est surtout connu pour son rôle dans le transport de LDL oxydées. De façon générale, l'activité de CD36 peut être bénéfique ou dommageante à l'organisme. L'activité bénéfique de CD36 est reliée à sa capacité à médier 1) la phagocytose des cellules en apoptose (Ren et coll., 1995; Susztak et coll., 2005), 2) la phagocytose d'agents pathogènes (Albert et coll., 1998), et 3) l'inhibition de l'angiogenèse durant la cicatrisation (Simantov et coll., 2005). CD36 est également impliqué dans 1) la phagocytose de lipoprotéines oxydées dans des conditions

pathologiques (hyperlipidémie, athérosclérose, diabète) (Endemann et coll., 1993; Nakata et coll., 1999), 2) l'inhibition de l'angiogenèse dans l'hyperlipidémie et le diabète (Febbraio et coll., 2002) et 3) l'induction de réactions pro-inflammatoires dans le contexte d'internalisation excessive de LDL oxydées (Nakata et coll., 1999; Febbraio et coll., 2000).

Le niveau d'expression de l'ARNm et de la protéine de CD36 augmente de 100% dans le testicule de souris ApoE^{-/-} (Zibara et coll., 2002). Gillot et collègues (2005) ont proposé que CD36 soit impliqué dans les échanges lipidiques entre cellules de Sertoli et cellules germinales et dans la phagocytose des corps résiduels. Toutefois, les souris CD36^{-/-} sont fertiles (Febbraio et coll., 1999).

2.3.2.2.3 ABCA1

2.3.2.2.3.1 Structure

ABCA1 fait parti de la famille de transporteurs ayant un domaine de liaison à l'ATP (ATP binding cassette, ABC). Chez l'homme, on compte environ 49 ABCs dont 13 dans le sous groupe ABCA (Dean et coll., 2001). Tous les transporteurs ABCs utilisent de l'ATP pour générer l'énergie nécessaire au transport du substrat à travers la membrane plasmique. Du point de vue structural, les transporteurs ABCs ont été classés en deux groupes : 1) ceux ayant deux unités similaires jointes de façon covalente et 2) ceux ayant une structure unique et qui doivent former un homo- ou hétéro-dimère pour être fonctionnels (Dean et coll., 2001). ABCA1 appartient au premier groupe.

ABCA1 est une protéine membranaire intégrale de 2261 acides aminés de 240 kDa (Schmitz et Buechler, 2002). Chaque sous-unité d'ABCA1 possède six domaines

transmembranaires et un domaine de liaison aux nucléotides (NBD) contenant deux motifs peptidiques (Walker A et Walker B) communs à la plus part des protéines se liant à l'ATP et un motif peptidique spécifique aux ABCs (Walker C) (Dean et coll., 2001) (Schéma 11). Les deux sous-unités de la protéine ABCA1 sont séparées par un domaine hydrophobe qui peut interagir avec la membrane plasmique pour faciliter le transport du substrat (Ioannou, 2001).

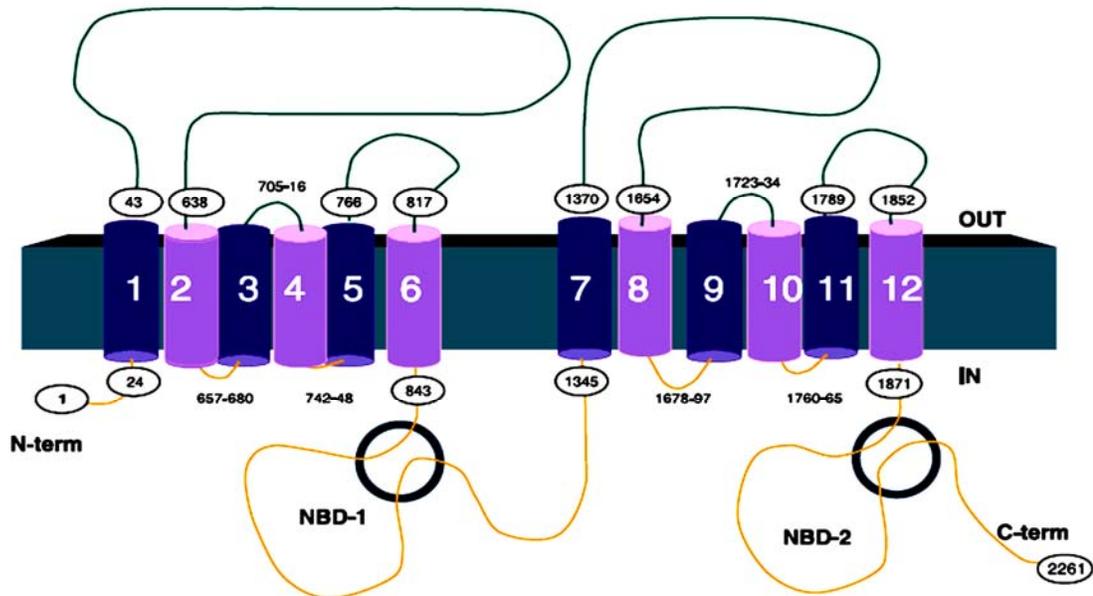


Schéma 11: Représentation schématique de la topologie de l'ABCA1

ABCA1 est composé de 12 domaines transmembranaires (symbolisés sous forme de cylindres) et possède six boucles extracellulaires (en vert) et 5 boucles intracellulaires (en jaune). Les Domaines de liaison à l'ATP (NBD) sont indiqués (Hamon et coll., 2002).

2.3.2.2.3.2 Localisation

Chez l'homme, l'expression de l'ARNm d'ABCA1 a été rapportée dans le foie, le placenta, l'intestin grêle et le poumon (Kielar et coll., 2001). Chez la souris, l'ARNm d'ABCA1 est abondant dans le foie, le rein, la glande surrénale, le cœur et le cerveau (Wellington et coll., 2002). L'ARNm d'ABCA1 est également élevé dans le testicule de babouin (Lawn et coll., 2001) et de souris (Selva et coll., 2004). L'expression de la protéine d'ABCA1 a été rapportée dans le foie, le testicule et la glande surrénale de souris (Wellington et coll., 2002). Les cellules de Leydig, de Sertoli (Lawn et coll., 2001; Selva et coll., 2004) et germinales (Selva et coll., 2004) expriment l'ARNm et la protéine d'ABCA1.

2.3.2.2.3.3 Régulation de l'expression

2.3.2.2.3.3.1 Régulation transcriptionnelle

La transcription du gène d'ABCA1 est régulée par le cholestérol (Costet et coll., 2000). Cette régulation implique l'activation des facteurs nucléaires de transcription LXR α/β et RXR (Costet et coll., 2000; Schwartz et coll., 2000). En se liant aux stérols oxydés et à l'acide rétinoïque, les facteurs de transcription LXR α/β et RXR forment des hétérodimères qui acquièrent la capacité d'activer le gène d'ABCA1 (Ohama et coll., 2002). Dans le testicule, la délétion expérimentale du gène de RXR β chez la souris est accompagnée d'une spermatogenèse anormale suivie d'une accumulation de lipides (Kastner et coll., 1996). Ces conséquences rappellent celles rapportées chez la souris ABCA1 $^{-/-}$ (Selva et coll., 2004). C'est pourquoi Selva et coll. (2004) ont postulé que la

transcription du gène d'ABCA1 était induite par les agonistes du complexe LXR/RXR dans la cellule de Sertoli et de Leydig.

2.3.2.2.3.3.2 Régulation post-transcriptionnelle

2.3.2.2.3.3.2.1 *La stabilisation de la protéine à la membrane plasmique*

La modulation de la stabilité de la protéine est un aspect important de la régulation post-traductionnelle d'ABCA1. La protéine ABCA1 est rapidement dégradée (demi-vie = 1 à 2 heures) lorsqu'elle n'est pas liée aux apoprotéines (Wang et coll., 2003). La phosphorylation en thréonine (T) 1286 et 1305 de la séquence d'acides aminés 1283-1306 nommée PEST (proline-glutamate-sérine-thréonine) dans la structure de la protéine ABCA1 provoque sa protéolyse par la calpaïne (Martinez et coll., 2003).

2.3.2.2.3.3.2.2 *Le trafic de la protéine*

La modulation du trafic de la protéine ABCA1 a un impact majeur sur le niveau de son expression et sa fonction. ABCA1 est rapidement recyclé entre les compartiments endosomes tardifs/lysosomes et la membrane plasmique (Neufeld et coll., 2001). ABCA1 est sélectivement exprimé à la membrane basale des cellules endothéliales (Panzenboeck et coll., 2002) et des hépatocytes (Neufeld et coll., 2002). Comme SR-BI, ABCA1 a le potentiel de se lier aux protéines contenant le domaine PDZ par son domaine intracellulaire C-terminal (Buechler et coll., 2002b). Toutefois, le rôle de cette interaction dans l'expression polarisée d'ABCA1 n'est pas établi. Le trafic intracellulaire d'ABCA1 se fait par les vésicules et nécessite une famille de récepteurs membranaires nommés SNAREs

dont fait partie la sous-famille des syntaxins (Schmitz et Buechler, 2002; Bared et coll., 2004). L'inhibition de la syntaxin 13 réduit l'expression de la protéine ABCA1 et l'efflux du cholestérol sans affecter l'ARNm (Schmitz et Buechler, 2002). La syntaxin 13 apparaît comme un stabilisateur de la protéine ABCA1 probablement par la modulation de son transport vésiculaire (Bared et coll., 2004).

2.3.2.2.3.4 Fonctions

2.3.2.2.3.4.1 Transport du cholestérol

La plupart des cellules, à part celles du foie et des tissus stéroïdogéniques, sont incapables de métaboliser le cholestérol; elles doivent exporter le cholestérol en excès vers le foie sous forme de lipoprotéines (Brown et Goldstein, 1999). L'assemblage des particules de lipoprotéines de hautes densité (HDL) (Hara et Yokoyama, 1991) à partir d'apoprotéines libres et de lipides cellulaires est une étape importante du transport inverse du cholestérol cellulaire (Hara et Yokoyama, 1991; Yokoyama, 2000). C'est la défaillance de ce transport du cholestérol qui est à l'origine de la maladie de Tangier (Francis et coll., 1995; Remaley et coll., 1997) qui est causée par une mutation génétique dans la structure de la protéine d'ABCA1 (Bodzioch et coll., 1999; Rust et coll., 1999). C'est une maladie caractérisée par une déficience en HDL circulantes (Brooks-Wilson et coll., 1999). La suppression génétique de l'ABCA1 chez la souris entraîne les mêmes symptômes (McNeish et coll., 2000) en plus de provoquer une hypofertilité (Selva et coll., 2004). De plus, les cellules de Sertoli de souris ABCA1^{-/-} en culture sont incapables d'effectuer l'efflux du cholestérol radiomarqué; elles l'accumulent dans les gouttelettes lipidiques

(Selva et coll., 2004). De la même manière, les cellules de Leydig de souris ABCA1^{-/-} produisent moins de testostérone comparée au phénotype sauvage (Selva et coll., 2004). Ce phénotype est semblable à celui rapporté chez la souris dont le gène d'ApoA-I avait été invalidé (Plump et coll., 1996). Les conséquences de la suppression génétique de l'ABCA1 sur la fertilité mâle restent imprécises. Les souris mâles ABCA1^{-/-} sont hypofertiles (Selva et coll., 2004). Les souris femelles ABCA1^{-/-} montrent une malformation du placenta, un retard dans la croissance des embryons, la perte de fœtus et la mort néonatale dûs à une altération de la stéroïdogénèse causée par la déficience en cholestérol dérivé des HDL sériques (Christiansen-Weber et coll., 2000).

2.3.2.2.3.4.2 Apoptose et phagocytose

La protéine ABCA1 est impliquée dans la translocation de la phosphatidylsérine (PS) de la face interne à la face externe de la membrane plasmique des cellules en apoptose (Luciani et Chimini, 1996; Hamon et coll., 2002). La phagocytose des cellules en apoptose est anormale dans les souris ABCA1^{-/-} (Hamon et coll., 2002) et leurs macrophages péritonéaux phagocytent 50% moins de cellules en apoptose comparé au phénotype sauvage (Hamon et coll., 2002). ABCA1 interagit également avec le Fas par l'intermédiaire de son « death domain » (FADD), ce qui suggère qu'ABCA1 est aussi impliqué dans la régulation de l'apoptose (Buechler et coll., 2002a). Les cellules germinales en dégénérescence sont phagocytées par la cellule de Sertoli (Russell et Clermont, 1977; Chemes, 1986). Les cellules de Sertoli en culture primaire (Mizuno et coll., 1996) ou *in vivo* (Nakagawa et coll., 2005) éliminent les cellules germinales en apoptose par un mécanisme dépendant de PS. Le mécanisme de translocation de PS dans les cellules

germinale en apoptose reste inconnu. Nous avons montré que l'expression de la protéine ABCA1 est dérégulée chez le vison atteint d'orchite autoimmune spontanée (Pelletier et coll., 2008) chez lequel nous avons précédemment démontré l'élimination des cellules germinale en apoptose est déficiente (Akpovi et coll., 2006).

2.4 Objectifs et hypothèse

Pour contribuer à élucider la question de l'origine du cholestérol dans les tubules séminifères, nous avons ciblé quelques transporteurs sélectifs du cholestérol dont le SR-BI, le SR-BII, le CD36 et l'ABCA-1. Selon notre hypothèse, ces récepteurs sont impliqués dans le transport sélectif le cholestérol, au-delà de la barrière hémato-testiculaire, du compartiment interstitiel vers l'épithélium séminifère, mais aussi dans l'efflux du composé -en excès- vers le sang. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons dans un premier développé une nouvelle approche d'isolation du testicule en fractions enrichies en tissu interstitiel et en tubules séminifères. Ensuite nous avons mesuré l'expression (protéines et ARNm) de chacun de ces quatre récepteurs dans les deux compartiments cellulaires distincts du testicule à tous les 7j durant le développement postnatal (7j, 14j, 21j, 28j, 35j, 42j, 54j) chez la souris. Le taux de variation du cholestérol libre et estérifié fut mesuré dans chacun des échantillons énumérés plus haut et corrélé avec le taux de variation de l'expression de chacun des récepteurs précités mais aussi avec l'activité spermatogénétique.

Notre hypothèse fut basée aussi sur la notion que l'invalidation du gène d'un transporteur sélectif de cholestérol ou d'une enzyme du métabolisme du cholestérol sera accompagnée par des effets compensatoires de l'un ou plusieurs facteurs impliqués dans le

métabolisme de cholestérol dans les tubules séminifères ou dans le tissu interstitiel. Nous avons quantifié les variations du taux de cholestérol libre et estérifié chez des souris dont le gène de SR-BI, CD36, NPC1 et HSL avait été invalidé. Nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus chez des souris normales (Wild type) au cours du développement postnatal. Ensuite, nous avons analysé comment l'invalidation de chacun de ces gènes était compensée par les transporteurs sélectifs de cholestérol et les enzymes du métabolisme du cholestérol en mesurant l'ARNm et la protéine de SR-BI, SR-BII, CD36, ABCA1, HSL, HMG-CoA Réd., ACAT1 et ACAT2 dans les fractions interstitiels et tubulaires.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Matériels

3.1.1 Réactifs

3.1.1.1 Produits chimiques

Bradford protein assay, β -mercaptoethanol, SDS-PAGE standards (high et low), BioRad (Mississauga, ON, Canada); trousse RNeasy mini, trousse de Omniscript RT et de Taq PCR core, Qiagen (Mississauga, ON, Canada); trousse de dosage enzymatique de cholestérol libre et cholestérol total, Wako Chemical USA Inc. (Richmond, VA, É-U); Millipore (Billerica, MA, É-U); Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), diaminobenzidine tetra chloride (DAB), 1,4, diazabicyclo-[2.2.2.] octane (DABCO), poly-L-lysine, albumine du sérum bovin (BSA), Oligo-dT et Agarose, Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada); Solution de Bouin et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), BDH (Toronto, ON, Canada); Chloroforme, hexane, isopropanol, xylène, paraffine, et Permout, Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, É-U); DNase I (RNase-free), Enzyme Pst1, Syber Premix Ex Taq TM, aprotinine, leupeptine, chemiluminescence lumi light plus Western blotting substrate et BM chemiluminescence blotting substrate (POD), Roche (Laval, QC, Canada); Somnotol, MTC Pharmaceuticals (Cambridge, ON, Canada); Potassium Bisperoxo (1, 10-phenanthroline) oxovanadate (V) [bpV (phen)], Calbiochem (San Diego, CA, É-U); Streptavidine conjuguée à la peroxydase et RNase inhibitor, Amersham Pharmacia Biotech. (Baie d'Urfé, Qc, Canada).

3.1.1.2 Anticorps

3.1.1.2.1 Anticorps primaires

SR-BI et SR-BII: Nous avons utilisé trois anticorps anti-SR-BI différents. Pour les analyses de Western blot, nous avons utilisé un anticorps polyclonal (IgG), non purifié, fait chez le lapin et dirigé contre la séquence peptidique correspondant aux résidus 496-509 de la région C-terminale de SR-BI de souris. Le deuxième anticorps anti-SR-BI est la forme purifiée du premier et le troisième est un polyclonal (IgG), purifié, fait chez la chèvre et dirigé contre la séquence peptidique 400-509 acides aminés de la région C-terminale de SR-BI de souris. Nous avons utilisé les anticorps anti-SR-BI purifiés pour les marquages immuno-histochimique. Pour détecter le SR-BII par analyses de Western blot, nous avons utilisé un anticorps polyclonal (IgG), non purifié, fait chez le lapin et dirigé contre une séquence peptidique spécifique de SR-BII de souris correspondant aux résidus 491-506. Cette séquence fait partie de la région C-terminale par laquelle le SR-BI et le SR-BII se différencient. La forme purifiée du même anticorps anti-SR-BII a été utilisée pour l'immunomarquage de SR-BII. Tous les anticorps dirigés contre le SR-BI et le SR-BII ont été achetés chez Novus Biologicals (Littleton, CO, É-U) à l'exception de l'anti-SR-BI purifié fait chez la chèvre qui nous a été gracieusement offert par la même compagnie. Les anticorps anti-SR-BI et anti-SR-BII non purifiés donnent de bons résultats en Western blot mais engendrent des réactions non spécifiques en immuno-histochimie (Akpovi et coll. 2006). C'est pourquoi nous avons utilisé des anticorps purifiés pour les marquages immuno-histochimiques.

CD36: Nous avons testé et caractérisé au total six anticorps anti-CD36 différents.

- Anti-CD36 polyclonal (Ab36977) (Abcam, Cambridge, MA É-U): IgG de lapin dirigé contre la séquence peptidique comprise entre les acides aminés 100-200 de la région N-terminale de la protéine de CD36 humain.

- Anti-CD36 polyclonal (H-300) (Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, É-U): IgG de lapin et dirigé contre une protéine recombinante qui correspond aux acides aminés 1-300 du domaine extracellulaire du CD36 humain. C'est un anticorps qui réagit également avec le CD36 de souris et de rat par réaction croisée.

- Anti-CD36 monoclonal (ABM-5525) (Cascade Bioscience, Winchester, MA, É-U): C'est un anticorps de type IgA fait chez la souris en injectant un adénovirus contenant la séquence de CD36 à des souris dont le gène de CD36 avait été préalablement invalidé. Ensuite, l'anticorps synthétisé fut purifié en utilisant la protéine L. Cet anticorps est capable de détecter le CD36 de rat et de souris.

- Anti-CD36 polyclonal (NB 400-145): IgG de lapin contre les résidus d'acides aminés 300-400 de CD36 humain. Le CD36 humain partage 95% d'homologie avec le CD36 de rat, du cobaye et du lapin et 90% avec celui de la souris (Abumrad et coll., 1993). Cet anticorps nous a été gratuitement offert par Novus Biologicals (Littleton, CO, É-U).

- Anti-CD36 polyclonal (NB 400-144): IgG de lapin dirigé contre les résidus d'acides aminés 100-200 de la protéine CD36 humaine qui partage 100% d'homologie avec le CD36 du bœuf et du singe et 95% d'homologie avec celui du rat, du cobaye et de la souris (Abumrad et coll., 1993). Cet anticorps nous a été gratuitement offert par Novus Biologicals (Littleton, CO, É-U).

- Anti-CD36 (non commercial) polyclonal: IgG de lapin contre le CD36. Cet anticorps nous été généreusement donné par Dr M. Febbraio (Department of Cell Biology, Lerner Research Institute Cleveland Clinic; Ohio, É-U).

ABCA1: Pour les analyses de Western blot et l'immunomarquage d'ABCA1, nous avons utilisé le même anticorps anti-ABCA1 (NB 400-105) (Novus Biologicals, Littleton, CO, É-U). C'est un polyclonal de type IgG, fait chez le lapin et dirigé contre une séquence peptidique d'ABCA1 humain comprise entre les résidus 1100-1300 et purifié. C'est un anticorps qui reconnaît l'ABCA1 humain et de souris.

HSL: L'anticorps anti-HSL (XG-6128) (Prosci-Inc, Poway, CA, É-U) que nous avons utilisé est un anticorps polyclonal de type IgG fait chez la poule contre un ensemble de trois peptidiques qui correspondent à des séquences d'acides aminés de la HSL humaine, muridée et mucine (NSQEEAEAKDEV, SGRKPQKTTSP, et FGEHYKRNETGL).

HMG-CoA réductase (HMGR): L'anticorps anti-HMGR (07-457) (Upstate, Lake Placid, NY, É-U) que nous avons utilisé est un anticorps polyclonal de type IgG généré chez le lapin. L'immunogène utilisé était une séquence peptidique correspondant aux résidus des acides aminés 827-840 localisés dans la région C-terminale de la protéine de la HMGR humaine. Cette portion de la protéine de la HMGR humaine ciblée par l'anticorps est identique à celle du rat, du cobaye et de la souris. En conséquence, cet anticorps réagit également avec l'HMGR de ces animaux.

ACAT1: L'anticorps anti-ACAT1 (100028) est un anticorps polyclonal purifié de type IgG (Chemical, Ann Arbor, MI, É-U). Il a été généré chez le lapin contre une séquence peptidique d'ACAT1 humain comprise entre les acides aminés 6-23. Cette séquence

peptidique contre laquelle l'anti-ACAT1 a été synthétisé partage une forte homologie avec l'ACAT1 de rat, de souris, de cobaye et de singe.

ACAT2: L'anti-ACAT2 (100027) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, É-U) utilisé est une IgG de lapin. C'est un anticorps polyclonal, purifié et dirigé contre la séquence peptidique de la protéine d'ACAT2 humain comprise entre les acides aminés 3-20. Cet anticorps réagit également avec l'ACAT2 du rat, du cobaye, de la souris et du singe.

MLC: L'anti-MLC (M7905) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É-U) est un anticorps monoclonal de type IgM fait chez la souris. Cet anticorps a été généré contre la chaîne légère de la myosine II non musculaire (MLC) de poule mais réagit, par réaction croisée, avec la MLC de souris, de cobaye, de bovin, de lapin et d'humain.

Pan Cx43: L'anticorps polyclonal anti-pan Cx43 (C 6219) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É-U) reconnaît toutes les formes (phosphorylées et non phosphorylées) de la connexine 43. C'est un anticorps de type IgG de lapin contre les résidus d'acides aminés 363-382 localisés dans le domaine C-terminal de la connexine 43 humaine et de rat. Cet anticorps réagit également avec la connexine 43 de souris, de poule, de cobaye et de bovin.

Cx43 phosphorylée en sérine 368: Cet anticorps (AB3841) (Chemicon International, Temecula, CA, É-U) réagit avec la connexine 43 phosphorylée en sérine 368. C'est un anticorps de type IgG, polyclonal, fait chez le lapin contre un phospho-peptide synthétique correspondant aux résidus d'acides aminés avoisinant la sérine en position 368 du domaine C-terminal de la connexine 43 d'origine humaine. Il réagit aussi avec la connexine de souris, de rat et de singe.

Cx43 non phosphorylée en Sérine 368: Cet anticorps (13-8300) (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, É-U) est un anticorps monoclonal de type IgG,

fait chez la souris. L'immunogène utilisé pour sa synthèse correspond à une séquence peptidique localisée dans le domaine C-terminal de la Cx43 de rat. Cet anticorps reconnaît la forme non phosphorylée en sérine 368 de la connexine 43.

Les anticorps contre la Cx50, la Cx46, la Cx32, la Cx30.2 et la Cx26 nous ont été généreusement fournis par le Professeur N.M. Kumar (University of Illinois at Chicago, Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Chicago, IL, É-U). Nous avons également acheté des anticorps anti-Cx50 et anti-Cx46 qui sont identiques à ceux que nous avons offerts Dr N.M. Kumar:

Cx50: Anticorps polyclonal purifié de type IgG fait chez le lapin. L'immunogène utilisé correspond à la portion C-terminale de la protéine de Cx50 de souris qui présente 100% d'homologie avec le rat. Cet anticorps réagit avec la Cx50 de rat, mais pas avec celle d'origine humaine.

Cx46: Anticorps polyclonal purifié de type IgG, fait chez le lapin. L'immunogène utilisé correspond à la portion C-terminale de la protéine de Cx46 de souris. Cet anticorps réagit avec la Cx46 de souris.

Cx32: Anticorps polyclonal purifié de type IgG fait chez le lapin contre la Cx32 de rat. L'immunogène utilisé correspond à la portion cytoplasmique C-terminale de la protéine. Cet anticorps réagit également avec la Cx32 humaine et de rat.

Cx30.2: La Cx30.2 de la souris est l'homologue de la Cx31.9 d'origine humaine. L'anticorps anti-Cx30.2 que nous avons utilisé est synthétisé contre la région C-terminale de la Cx30.2 de souris. Aucune réaction croisée avec la Cx30.2 d'autres espèces n'a été rapportée.

Cx26: Anticorps polyclonal de type IgG de lapin purifié. L'immunogène utilisé pour la synthèse de cet anticorps est un peptide synthétique de 13 acides aminés dérivés du domaine C-terminal de la Cx 26 de souris. Ce peptide de souris diffère par un acide aminé de la séquence de rat et par 2 acides aminés non consécutifs de celle de l'humain.

Cx31: Anticorps de type IgG fait chez le lapin contre le domaine cytoplasmique C-terminal de Cx31 de souris (LS-C14534) (LifeSpan Biosciences, Inc., Seattle, WA, É-U).

Flotilline-1: Anticorps de type IgG1 fait chez la souris (610820) (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). L'immunogène utilisé provient de la flotilline-1 de souris et correspond à la séquence d'acides aminés 312-428 localisés dans le domaine C-terminal de la protéine.

Cavéoline-1: L'anti-cavéoline-1 (H-97, sc-7875) (Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA, É-U) est un anticorps de type IgG, fait chez le lapin contre une protéine recombinante qui correspond aux acides aminés 82-178 du domaine C-terminal de la cavéoline-1 humaine.

3.1.1.2.2 Anticorps secondaires

Anticorps couplés à la biotine: Anti-IgG de lapin, fragment F(ab')₂ de anti-IgG de lapin purifié et Anti-IgG de chèvre achetés chez Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (Mississauga, ON, Canada).

Anticorps couplés à la peroxydase: Anti-IgG de lapin, anti-IgG de poule, anti-IgG de souris, anti-IgM de souris, anti-IgA de souris achetés chez Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (Mississauga, ON, Canada).

3.1.2 Logiciels

Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, É-U); Sigma Plot 7.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, É-U); Light cycler 3.5 (Roche, Laval, QC, Canada); Programme de quantification relative version 1.01 (Roche, Laval, QC, Canada), EndNote XI (Université de Montréal, Département de Médecine, Montréal, QC, Canada), Adobe Photoshop 7.

3.1.3 Modèles animaux

3.1.3.1 Justification du choix des modèles animaux

Nous avons utilisé deux modèles animaux, le vison (*Mustela vison*) et la souris (*mus musculus*). Les méthodes utilisées pour le traitement des animaux sont conformes aux normes et approuvées par le comité de protection des animaux de l'université de Montréal.

Notre laboratoire utilise le vison comme modèle animal depuis plusieurs années et différents travaux nous ont permis de bien définir ce modèle (Kabbaj et coll., 2003; Akpovi et coll., 2006). Le vison est un animal à activité reproductive saisonnière caractérisée par des variations dans l'activité spermatogénétique au cours du cycle reproductif saisonnier annuel. Le cycle reproductif du vison adulte est étalé sur les 12 mois de l'année et comprend une période d'activité spermatogénétique dont le maximum se situe en février et mars et une période d'inactivité spermatogénétique caractérisée par une régression testiculaire d'avril à juillet. A la fin de la régression testiculaire, seules des spermatogonies sont présentes dans les tubules séminifères (Pelletier, 1986). A chaque âge du développement postnatal chez le vison correspond une séquence d'apparition des cellules germinales dans l'épithélium séminifère. La plupart des analyses que nous effectuons dans

notre laboratoire (activité enzymatique dans des extraits de microsomes, dosage de cholestérol, Western blot, etc.) nécessitent de grandes quantités d'échantillons. A ce titre, le vison offre l'avantage de fournir une plus grande quantité de fractions enrichies en tissu interstitiel (ITf) et en tubules séminifères (STf) que la souris. Le vison est l'un des rares animaux à développer, comme chez l'homme, une orchite autoimmune spontanée. C'est donc un modèle de choix pour l'exploration de différents aspects de cette maladie qui représente l'une des causes de l'infertilité d'origine immunologique chez l'homme (Tung et coll., 1981).

Le choix de la souris comme modèle animal repose sur plusieurs raisons: 1) C'est un animal à activité reproductive continue, contrairement au vison. Il constitue un modèle pour l'étude de l'implication des transporteurs sélectifs dans le métabolisme du cholestérol dans le testicule. 2) Ce modèle offre la possibilité d'étudier comment la suppression d'un gène impliqué dans le métabolisme du cholestérol testiculaire est compensée. 3) L'essentiel des anticorps que nous avons utilisés étaient dirigés contre les protéines d'autres animaux dont la souris et leur spécificité vis-à-vis des protéines du vison n'était pas prouvée. Nous avons donc utilisé les échantillons de souris (wild type et knockout) pour valider les analyses de Western blot effectuées chez le vison.

3.1.3.1.1 Le vison (*Mustela vison*)

Tous les visons ont été achetés chez Visonnière St. Damase (St. Damase, QC, Canada). Les visons ont été individuellement mis en cage, alimentés au régime riche en protéines et gardés dans des conditions naturelles d'éclairage. Les animaux ont été anesthésiés par injection intra-péritonéale (i.p) de 0,9 ml/kg de poids corporel de

pentobarbital sodique (Somnotol, MCI pharmaceutical, Mississauga, ON, Canada) et 0,15 ml/kg de poids corporel d'une solution d'hydrate de chlore 0.3 % saline stérile. Les animaux anesthésiés ont été ensuite décapités et les tissus ont été prélevés.

Pour chaque animal, le testicule droit fut utilisé pour des études d'immunohistochimie et le gauche a servi à réaliser des fractions enrichies en tissu interstitiel et en tubules séminifères.

3.1.3.1.1.1 *Vison normal*

Les visons ont été choisis sur la base des critères de fertilité basés sur le nombre, la morphologie et la mobilité des spermatozoïdes éjaculés. Pour les études portant sur le développement, les testicules ont été prélevés par intervalles de trente (30) jours pendant 1) la période néonatale (60 et 90 jours (j) d'âge), 2) la puberté (120-, 150-, 210-, 240 j) et 3) au début de l'âge adulte (270j). Chez le vison adulte, les testicules furent prélevés durant le cycle reproductif annuel par intervalles de 30 jours pendant la dernière semaine du mois entre la première et la deuxième année d'âge.

3.1.3.1.1.2 *Vison atteint d'orchite autoimmune spontanée*

Le choix des visons souffrant d'orchite autoimmune (AIO) spontanée était basé sur des critères que nous avons exposés ailleurs (Akpovi et coll., 2006). Brièvement, ce sont des visons dont le sperme doit être exempt de spermatozoïdes, qui doivent avoir un fort taux sérique d'anticorps anti-spermatozoïde et dont l'épithélium séminifère présente une destruction typique de l'orchite autoimmune spontanée.

3.1.3.1.2 La souris (*Mus musculus*)

3.1.3.1.2.1 Souris normale

Les souris normales ont été achetées à la compagnie Charles River (St-Constant QC, Canada). Les animaux ont été anesthésiés à l'aide d'une injection i.p de Somnotol (pentobarbital sodique, 0,9 ml/kg). Les testicules ont été prélevés aux âges suivants: 14-, 21-, 28-, 35-, 42-, >60 jours (adulte) après la naissance. A cause de leur petitesse, nous avons traité ensemble les testicules de plusieurs animaux du même âge pour les souris d'âge inférieur à 28 jours.

3.1.3.1.2.2 Souris *SR-BI*^{-/-}, *CD36*^{-/-}, *HSL*^{-/-} et *NPC1*^{-/-}

Les souris rendues génétiquement déficientes en SR-BI et en CD36 et leurs contrôles sauvages nous ont été généreusement fournis par Dr L. Brissette (Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, QC, Canada). Les souris rendues génétiquement déficientes en Hormone Sensitive Lipase (HSL) nous ont été gracieusement fournis par Dr C. Holm (Department of Experimental Medical Science, Lund University, Lund, Suède). Enfin, les souris NPC1^{-/-} nous été offertes par Dr. D. Bruce Murphy (Centre de recherche en reproduction animale, St-Hyacinthe, Université de Montréal).

3.2 Méthodes

3.2.1 Prélèvement et traitement des tissus

3.2.1.1 Sang et sérum

Le sang fut prélevé chez les animaux anesthésiés par ponction cardiaque. Les échantillons furent laissés à la température ambiante (environ 20 °C) pendant 2 heures pour permettre la coagulation et la séparation du sérum et du caillot. Chaque échantillon fut centrifugé ensuite à 2 000 rpm (250 g) à 4 °C (centrifugeuse Beckman GS-6R, rotors GH-3.8, Beckman, Mississauga, ON, Canada) pendant 20 min. Le sérum fut ensuite mis en aliquote et conservés à -80 °C.

3.2.1.2 Testicule et spermatozoïdes

3.2.1.2.1 Isolation et caractérisation des fractions enrichies en tissu interstitiel (ITf) et en tubules séminifères (STf)

Les ITf et les STf furent isolées suivant la technique décrite par Akpovi et coll. (2006 et 2009). Brièvement, les testicules décapsulés furent exposés au tampon de phosphate salin (PBS) (137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH 7.4) ou au PBS contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM EGTA, 2 µg/ml leupeptine, 2 µg/ml aprotinine, 4mM Na₃VO₄, 80mM NaF, 20 mM Na₄P₂O₇ et 10µM potassium bisperoxol (1, 10- phenanthroline) oxovanadate (bpV (phen))). Les tubules furent séparés du tissu interstitiel et chaque fraction enrichie fut caractérisée tel que nous l'avons décrit ailleurs (Akpovi et Pelletier, 2009). Le produit obtenu fut distribué dans des tubes de 15 ml et laissé sédimenter pendant 1 heure sur glace puis centrifugé à 600 rpm (80 g) (centrifugeuse Beckman GS-6R, rotors GH-3.8, Mississauga, ON, Canada) pendant 20 min et les ITf (surnageant) furent séparées des STf. Une fois lavée, chaque fraction fut mise en

suspension dans un volume égal de PBS seul ou contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases puis mise en aliquote et congelées à -80 °C.

3.2.1.2.2 Isolation des spermatozoïdes épидидymaires

Des épидидymes fraîchement prélevés chez la souris et le vison furent découpés en petits morceaux dans du PBS seul ou contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases puis agité sur glace pendant 1 heure. Les spermatozoïdes, en suspension dans le tampon, furent séparés du reste du tissu à l'aide d'un filtre doté des pores de 74 µm de diamètre. Le filtrat fut centrifugé pendant 15 minutes à 2 000 rpm (250 g) (GS-6R Beckman centrifuge (Beckman, Mississauga, ON, Canada). Le culot fut mis en suspension dans une solution de 10 mM Tris-HCl pH 8 contenant 1 mM EDTA pendant 5 minutes pour lyser les cellules épithéliales et les cellules sanguines présentes (Herrada et Wolgemuth, 1997), puis centrifugé à nouveau à 2 000 rpm (250 g) pendant 15 minutes. Les spermatozoïdes recueillis furent lavés deux fois et mis en suspension dans le tampon correspondant puis mis en aliquote et conservés à -80°C.

3.2.1.2.3 Autres tissus

Nous avons prélevé d'autres tissus comme le foie, le rein, la glande surrénale, l'intestin grêle, le poumon, l'hypophyse antérieure, le cerveau et le cœur que nous avons utilisés comme contrôles des analyses de Western blot. Ces tissus furent prélevés et homogénéisés dans une solution de PBS contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases.

3.2.2 PCR en temps réel (Realtime polymerase chain reaction)

3.2.2.1 Isolation des acides ribonucléiques

L'acide ribonucléique (ARN) total fut extrait à partir des échantillons de ITf et de STf en utilisant la trousse RNeasy mini et en suivant les instructions du manufacturier. Les échantillons furent homogénéisés dans 600 µl du tampon de lyse RLT à l'aide d'aiguilles de seringue. Six cents µl d'éthanol 70% furent ajoutés à chaque homogénat et bien mélangé. Le mélange fut ensuite transféré dans des mini-colonnes RNeasy placées dans des tubes de collection de 2 ml puis centrifugé pendant 15 secondes à 10 000 g (Microcentrifugeuse IEC, International Equipment Company, Nepean, ON, Canada). Les colonnes, auxquelles l'ARN était désormais fixé furent ensuite lavées aux tampons RW1 et RPE et transférées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. L'ARN total fixé à la colonne fut ensuite élué en ajoutant 20 à 40 µl d'eau sans RNAase et centrifugé à 10 000 g (Microcentrifugeuse IEC) pendant 1 min. La concentration en ARN total extrait de chaque échantillon fut mesurée au spectrophotomètre [Life science UV/Vis spectrophotometer (DUR 530) (Beckman Coulter™ Fullerton, CA, ÉU)].

3.2.2.2 Préparation de l'ADN complémentaire

L'ADN complémentaire (ADNc) fut obtenu par transcription inverse de l'ARN en utilisant la trousse Omniscript RT en présence de polydT. Cinq µg d'ARN total furent transcrits en ADNc à 37 °C pendant 1 heure en suivant les instructions du manufacturier. La réaction consistait en un mélange du tampon de transcriptase inverse (RT) 10X, Oligo-dT 10 mM, désoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) 5mM, inhibiteur de ARNase

(32600U/ml), enzyme Omniscript RT (4U/ml) et 5 µg d'ARN dans un volume final de 50 µl (Levesque-Sergerie et coll., 2007).

3.2.2.3 Quantification de l'expression de l'ARN messenger

Les réactions de PCR en temps réel ont été exécutées en présence de 0,5 µM de chaque amorce (Tableau 1) en suivant les instructions du fabricant (SYBR Premix Ex Taq™, Roche, Laval, QC, Canada). Dans toutes les réactions de PCR, un contrôle négatif, réalisé en absence de transcriptase et d'échantillon, n'avait révélé aucune amplification de produits de PCR. Toutes les réactions de PCR en temps réel furent réalisées en duplicata. Les amorces de PCR furent tirées des travaux de Van Eck et collègues (Van Eck et coll., 2003) à l'exception des amorces de SR-BII que nous avons générées en utilisant le logiciel de conception de sondes LightCycler 2.0 (Roche, Laval, QC, Canada). Toutes les amorces ont été achetées chez Operon Biotechnologies (Huntsville, AL, É-U). L'amplification de l'ADNc de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HPRT-1) a été utilisée comme contrôle interne (référence) pour la mesure de l'expression des gènes par le PCR en temps réel. Les courbes de dissociation ont été réalisées et visualisées pour toutes les réactions afin de s'assurer que l'amplification effectuée correspondait à un produit unique et à la température de fusion appropriée. Les résultats du PCR en temps réel étaient quantifiés en utilisant le programme RelQuant (relative quantification software, version 1.01, Roche, Laval, QC, Canada). La spécificité des produits du PCR en temps réel obtenus avec les amorces de SR-BII a été évaluée par digestion limitée en utilisant des enzymes de restriction selon les instructions du fabricant.

3.2.2.4 Digestion limitée du produit de PCR en temps réel de SR-BII

Pour vérifier la spécificité des résultats du PCR en temps réel du SR-BII, nous avons effectué la digestion enzymatique du produit d'amplification de l'ADNc obtenu en utilisant les amorces spécifiques de SR-BII. L'enzyme de restriction spécifique utilisée était le Pst1 (Roche, Laval, QC, Canada). La réaction fut réalisée dans un volume final de 20 μ l en présence de 2U de Pst1, du fragment d'ADNc et du tampon de digestion (10 X). Le mélange et le contrôle négatif furent incubés toute la nuit à 37 °C pour digestion. Après incubation, le contenu des deux tubes fut soumis à l'électrophorèse dans un gel de 3%. Une fois la migration complétée, le gel fut recueilli et immergé dans du PBS contenant du bromure d'éthidium, incubé sous agitation pendant 10 min puis photographié (2011 UV Transilluminator, Upland, CA, É-U).

3.2.2.5 Quantification de l'expression de l'ARN messenger

Les réactions de PCR semi-quantitatif furent effectuées en présence de 0,5 μ M de chaque amorce de CD36 (Tableau 1) et 2.5 U de Taq DNA polymérase (trousse de Taq PCR) en suivant les indications du fabricant de la trousse de PCR.

3.2.3 Western blot

3.2.3.1 Dosage des protéines

Les échantillons furent homogénéisés à l'aide d'un sonicateur (Fisher Sonic dismembrator modèle 300, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, ÉU). La concentration en protéines de chaque échantillon fut mesurée suivant la méthode de Bradford (Bradford,

1976) en utilisant les réactifs achetés chez Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Nous avons établi une courbe standard à l'aide de concentrations connues de BSA et avons déterminé la concentration en protéines à partir de cette courbe standard.

3.2.3.2 Électrophorèse sur gels dénaturants SDS-PAGE

Des quantités de protéines identiques de chaque échantillon furent prélevées, diluées dans du tampon d'échantillons 2X (8M d'urée, 3 % SDS, 5 % β -mercaptoéthanol, 0,005 % de BBP, 70 mM Tris-HCl pH 6,8) à une concentration finale de $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans un tube Eppendorf de $0,6\ \mu\text{l}$. Les tubes furent ensuite chauffés dans un bain d'eau bouillante pendant 3 minutes à l'exception des échantillons préparés pour l'analyse d'ABCA1 (le chauffage peut provoquer l'agrégation des protéines de grand poids moléculaire comme ABCA1) et de la Pan Cx43. Entre 20 et 80 μg de protéines furent introduits dans les puits de gel de polyacrylamide. La concentration en acrylamide des gels de concentration et de séparation était de 4 % et de 10 % respectivement. La migration fut effectuée à un voltage de 120 V pendant environ 2 heures (tampon du gel séparateur: 1,0M Tris-0,5 M glycine; tampon du gel d'entassement: 0,5M Tris-HCl pH 6,7; tampon d'électrode : 0.1M Tris, 0,15M glycine, 0,1 % SDS).

3.2.3.3 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Après migration, les protéines séparées ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert des protéines fut effectué à 4 °C avec un courant de 300 mA pendant 2 heures ou à 27 volts toute la nuit (Mini Transblot electrophoretic cell, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Le tampon de transfert contenait 25mM Tris-HCl pH 8,3; 150 mM glycine et 20 % (v/v) méthanol. Chaque membrane a été ensuite colorée au rouge de

Ponceau (0,2 % rouge de Ponceau et 3 % TCA dans l'eau distillée) afin d'évaluer la qualité du transfert et faciliter son découpage.

3.2.3.4 Immuno-buvardage des membranes

Les membranes ont été incubées une heure à 37 °C dans du PBS-lait écrémé 3 % sauf lorsque l'anticorps anti-CD36 de M. Febbraio fut utilisé. Dans ce cas les membranes furent incubées avec une solution 1% d'Immunoblot blocking reagent. Les membranes furent à nouveau incubées dans du PBS-lait écrémé 3 % (ou 0,05 % de Immunoblot blocking reagent pour le CD36) contenant la dilution appropriée de l'anticorps dirigé contre la protéine étudiée. La concentration utilisée pour chaque anticorps est indiquée dans le Tableau 2. L'incubation à 4 °C durant toute la nuit était la condition optimum pour l'ensemble des anticorps que nous avons utilisés à l'exception de la Pan Cx 43 qui fut incubé une heure à la température ambiante. Les membranes furent lavées (4 fois 15 minutes) à la température ambiante avec agitation dans une solution de PBS-Tween-20; 0,05 % (PBST-0,05 %). Après le dernier lavage, les membranes furent incubées dans du PBS-lait écrémé 3 % (ou 0,05% de Immunoblot blocking reagent pour CD36) contenant le deuxième anticorps approprié couplé à la peroxydase à une dilution de 1:2 000 dans chaque cas. Le temps d'incubation des membranes avec le 2e anticorps fut de 60 min à la température ambiante. Les membranes furent lavées à nouveau avec du PBST-0,05 % (3 fois 15 minutes) puis avec du PBS seul pendant 15 minutes. Le complexe antigène-anticorps fut révélé avec la solution de chemiluminescence de Roche (Laval, QC, Canada) (Lumi light plus Western blotting substrate ou BM chemiluminescence blotting substrate

(POD)). La lumière émise par l'action de la peroxydase fut captée sur Film classique bleu (EBA 45).

3.2.4 Dosage du cholestérol

3.2.4.1 Extraction des lipides

Les ITf et les STf furent homogénéisées et la concentration en protéines totales de chaque homogénat fut mesurée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Entre 60 et 80 µl de l'homogénat de chaque échantillon de ITf et de STf furent ajoutés à 5 ml d'hexane/isopropanol (3:2) préalablement prélevés dans un tube en verre à bouchon (Screw thread culture tube, 16 x 100 mm; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, É-U). Le mélange fut ensuite mis en suspension au vortex à intervalles de temps réguliers de 5 min pendant 30 min. Ensuite les tubes furent centrifugés pendant 5 min à 4 °C à 2 000 rpm (250 g) (GS-6R Beckman centrifuge (Mississauga, ON, Canada). La phase aqueuse occupe le fonds du tube et le solvant organique le dessus. La phase organique contenant la fraction d'extrait lipidique fut séparée dans un autre tube en verre gradué de 15 ml et recouvert de papier aluminium. Cinq ml du mélange hexane/isopropanol (3:2) furent ajoutés à la phase aqueuse pour une deuxième extraction suivie d'une troisième. Les fractions organiques issues des trois extractions furent mises ensemble dans le tube en verre gradué, mélangé à l'aide d'un vortex puis séparées en deux volumes égaux dans des tubes en verre gradués. Le contenu de chacun des tubes fut séché par évaporation au nitrogène à 40 °C à l'aide de N-EVAP Nitrogen Evaporators (Organomation Associates, Inc. Berlin, MA). Le produit de

l'extraction était sous forme de poudre blanchâtre, en très petite quantité, contenu au fonds du tube.

3.2.4.2 Mesure de cholestérol total et du cholestérol libre

Les extraits de lipides ont servi au dosage de cholestérol total (CT) et du libre (CL) de chaque échantillon. Pour ce faire, l'extrait de chaque tube fut dissout dans 25 μ l d'éthanol 100% puis les taux de CT et de CL furent mesurés par une technique enzymatique en suivant le protocole du fabricant de la trousse de dosage (Wako Chemical USA Inc., Richmond, VA). Dans le cas du sérum, 5 μ l de chaque échantillon furent dosés directement par la même technique. Le taux de cholestérol estérifié (CE) fut obtenu en soustrayant la mesure du CL de celle du CT. Le CL et le CE sont exprimés en μ g de cholestérol/mg de protéines totales pour les ITf et les STf, et en mg de cholestérol/dl de sérum pour le sang.

Validation de la technique d'extraction:

Nous avons effectué le dosage du CL et du CT contenu dans les produits des 4^{ième} et 5^{ième} extractions de STf de visons des mois d'août et de février dans lesquelles les taux de CL et de CE étaient respectivement maximales et minimales (Kabbaj et coll., 2003). Les résultats du dosage que nous avons obtenus étaient semblables dans les 4^{ième} et 5^{ième} extractions dans les 2 échantillons de STf: [CT] = 0,6 μ g cholestérol/mg protéines et [CL] = 0,19 μ g cholestérol/mg protéines. Ces valeurs sont statistiquement négligeables comparées aux résultats obtenus à partir du mélange des trois premiers extraits. A la lumière de ces

résultats, nous avons retenu que la proportion de cholestérol non extraite à partir de la 4^e extraction était négligeable.

3.2.5 Immuno-marquage en microscopie optique

3.2.5.1 Préparation des tissus

Les testicules de souris furent fixés par la perfusion d'une solution de Bouin (75% d'acide picrique supersaturé, 25% de formaline) contenant 5% d'acide acétique (Pelletier, 1995). Les testicules fixés furent déshydratés à l'éthanol (70, 90 et 100%) et passés au xylène puis enrobés dans la paraffine. Des coupes de 5 à 7 μm d'épaisseur ont été générées au microtome et montées sur lames enduites de 3-aminopropyltriéthoxysilane pour permettre une meilleure adhérence de la coupe à la lame.

3.2.5.2 Immuno-histochimie

Les lames furent déparaffinées dans deux bains successifs de xylène pendant 10 min chacun puis ré-hydratées dans l'éthanol (100, 90, 70 et 50%, 5 min par bain). Après le dernier bain d'éthanol (50%), les lames furent passées à l'eau distillée pendant 5 min puis au PBS pendant 10 min. Nous avons ensuite perméabilisé les coupes avec une solution de citrate de sodium, 10 mM, pH 6,0 portée à 90°C pendant 8 min (Sarsfield et coll., 1996). Pour bloquer l'activité peroxydase endogène du tissu, les lames ont été ensuite immergées dans du PBS contenant 0,6% de H₂O₂ pendant 10 min avec agitation. Les lames furent lavées dans du PBS puis dans du PBS contenant de Tween 0,1% (PBST 0,1%) pendant 5 min (Pelletier et coll., 1999b). Les coupes ont été ensuite saturées dans du PBS-lait 3% pendant une heure à la température ambiante puis incubées avec l'anticorps approprié dilué

dans du PBS-lait 3% durant toute la nuit. Les concentrations d'anticorps utilisées étaient les suivantes : anti-SRBI IgG purifié fait chez le lapin, 1:25; anti-SR-BI IgG purifié fait chez la chèvre, 1:50; anti-SR-BII IgG purifié fait chez le lapin, 1:10; anti-CD36 IgG fait chez le lapin (Laboratoire du Dr. Febbraio), 1:100; anti-ABCA1 IgG fait chez le lapin, 1:100. Après l'incubation avec le premier anticorps, les lames étaient lavées 4 fois dans du PBST 0.1% pendant 10 min à chaque fois et incubées avec le deuxième anticorps approprié couplé à la biotine dilué à 1:2 000 dans du PBS-lait 0,5%. Après une heure d'incubation à la température du laboratoire (environ 20 °C), les lames furent à nouveau lavées 4 fois dans du PBST 0,1% puis incubées avec de la streptavidine conjuguée à la peroxydase diluée à 1:200 dans du PBS-lait 0,5% pendant une heure à la température ambiante. Ensuite, les lames furent à nouveau lavées 4 fois dans du PBST 0.1% puis immergées dans une solution de PBS 1X contenant 0,05% de DAB et 0,03% de H₂O₂ pendant 8-12 min à l'obscurité. Une fois la coloration optimale obtenue, les lames furent lavées pendant 10 min à l'eau puis les coupes furent déshydratées dans l'éthanol (70, 90 et 100 %, 5 min par bain) puis dans deux bains successifs de xylène (10 min/bain) pour éliminer l'éthanol. Après le dernier bain de xylène, les lames furent rapidement montées, sans être séchées, dans le Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, É-U). Pour les contrôles négatifs, les lames furent incubées directement avec le deuxième anticorps avant d'être examinées au microscope. Les photographies représentant trois expériences indépendantes furent prises au microscope Zeiss Axiophot II (Zeiss, Jena, Germany) équipé d'une caméra. Les images furent captées en utilisant le programme Northern Eclipse.

3.2.6 Quantification des bandes immunoréactives et analyses statistiques

Nous avons numérisé les films de Western blots au scanner et l'intensité relative des bandes immunoréactives fut évaluée par densitométrie en utilisant le programme Scion Image Software (Scion corporation, Frederick, MD, ÉU). La densité optique de chaque bande fut mesurée trois fois. Un minimum de 3 expériences indépendantes fut réalisé pour chacune des protéines analysées. Nous avons ensuite calculé la moyenne de toutes les mesures obtenues pour chaque bande de chaque film. Pour le développement postnatal de souris, nous avons divisé la moyenne de la densité optique obtenue pour chacun des âges à l'intérieur d'une même expérience par la densité optique moyenne de l'échantillon de 14 jours (14d). Pour les études effectuées chez les souris génétiquement déficientes, nous avons utilisé la chaîne légère de la myosine II non-musculaire (MLC) comme standard interne. L'intensité de la bande immunoréactive de la MLC variait peu dans tous les échantillons des ITf et des STf de souris adultes mais pas durant le développement postnatal. Pour cela, la partie inférieure (< 40 kDa) de la membrane de nitrocellulose de chaque expérience fut découpée et incubée avec l'anticorps anti-MLC. Après quantification, nous avons divisé la densité optique moyenne de la bande immunoréactive de chaque protéine analysée par celle de la MLC correspondante à l'intérieur de chaque expérience.

3.2.6.2 Analyses statistiques des données

Toutes les données furent analysées par le test t de Student en utilisant le programme Sigma Plot 2001. Les résultats sont présentés sous forme de graphiques et

exprimés en moyenne \pm SEM (standard error of the mean). Les résultats de Western blot et de PCR en temps réel sont exprimés en unités arbitraires.

Tableau 1: Amorces utilisées pour le PCR en temps réel

Genes	GenBankTM accession No	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size (bp)
SR-BI	NM_016741	GGCTGCTGTTTGCTGCG	GCTGCTTGATGAGGGAGGG3'	63
SR-BII	NM_007644	AGAACGTAGAAGGACTGCCTGCTT	TCGGGTATACAGAAGCCAGCGTTT	91
ABCA1	NM_013454	GTTTGGAGATGGTTATACAATAGTTGT	TTCCCGAAACGCAAGTC	96
CD36	L23108	TTCTTCCAGCCAATGCCTTT	ATGTCTAGCACACCATAAGATGTACAGTT	110
HPRT-1	NM_013556	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	93

Tableau 2: Taux de dilution d'anticorps utilisés en Western blot

Anticorps	Dilution	Anticorps	Dilution
SR-BI	1:2 000	Cx43 non phospho.	1 :200
SR-BII	1:1 000	Cx50	1:250
ABCA1	1:500	Cx46	1:500
CD36	1:1 000	Cx32	1:100
HSL	1:400	Cx30.2	1:200
HMG-CoA réd.	1:500	Cx26	1:100
ACAT1	1:500	Flotilline-1	1:250
ACAT2	1:250	Cavéoline-1	1:5 000
Pan Cx43	1:20 000	MLC	1:5 000
Cx43 phospho.	1:400		

4. RÉSULTATS

4.1 Caractérisation des fractions enrichies en tissu interstitiel et en tubules séminifères générées sans enzymes digestives

4.1.1 Caractérisation morphologique des fractions enrichies

Les fractions enrichies en tubules séminifères (STf) étaient exemptes de résidus de tissu interstitiel (Annexe 2, fig. 2B). La texture des STf était différente de celle des fractions enrichies en tissu interstitiel (ITf) lesquelles avaient l'aspect d'un réseau de tissu conjonctif lâche (Annexe 2, fig. 2A). Il n'y avait aucune trace de tubules séminifères dans les ITf. En revanche, les ITf étaient contaminées par des spermatozoïdes qui s'étaient échappés de l'extrémité des tubules coupés durant l'isolation (Annexe 2, fig. 2A).

4.1.2 Avantages et désavantages d'une digestion enzymatique préalable

Notre objectif était de déterminer si l'enzyme collagénase utilisée pour l'isolation des fractions enrichies affectait la détection des protéines dans les échantillons de STf et d'ITf. A cette fin, nous avons analysé par Western blot les taux protéiniques de Cx43 et de SR-BI dans les STf qui avait été préalablement exposées à la collagénase que nous avons comparée à ceux provenant de STf qui n'avaient pas été exposées aux enzymes digestives. Nous avons utilisé un anticorps anti-Cx43 qui identifie les formes phosphorylées et non-phosphorylées de la Cx43 et un autre anticorps qui identifie la forme glycosylée de SR-BI. Nous avons obtenu quatre bandes immunoréactives de 42-, 43-44- et 45- kDa de Cx43 dans les STf isolées sans enzyme (Annexe 2, fig. 3A). Dans les STf isolées avec des enzymes,

seulement deux bandes immunoréactives de 42- et 43 kDa de Cx43 furent détectées, avec une intensité plus faible que celle obtenue dans les STf isolées sans enzyme (Annexe 2, fig. 3A). Il en était de même pour la bande immunoréactive de la forme glycosylée de 85 kDa de SR-BI (Annexe 2, fig. 3B). Par contre, l'intensité de la bande immunoréactive de la chaîne légère de la myosine II non-musculaire (MLC) n'était pas significativement différente dans les STf isolées avec ou sans enzymes (Annexe 2, fig. 3 A et B).

4.2 Études des transporteurs sélectifs de cholestérol au cours du développement postnatal chez la souris normale

L'objectif de cette étude était de déterminer la corrélation temporelle dans l'expression de la protéine et de l'ARNm des transporteurs sélectifs SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1 et la variation du taux de CL et CE dans les ITf et les STf. Les mesures furent effectuées à tous les sept jours durant le développement postnatal, depuis le 14^{ième} jour après la naissance jusqu'au 60^{ième} (âge adulte).

4.2.1 SR-BI et SR-BII

4.2.1.1 Validation des analyses de Western blot et de PCR

4.2.1.1.1 Western blot

Nous avons détecté une bande immunoréactive de forte intensité de 85 kDa correspondant à la forme glycosylée de SR-BI dans les ITf et les STf de souris SR-BI+/+ mais pas dans les échantillons de souris SR-BI/- (fig. 1A). Par contre, les bandes d'intensité plus faible de 110- et 240 kDa étaient détectées à la fois dans les échantillons de

souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-} (fig. 1A). Aucune autre bande immunoréactive, pouvant correspondre à la forme non-glycosylée (52 kDa) ou à des oligomères de SR-BI, n'a été détectée (fig. 1A).

SR-BII: Plusieurs bandes immunoréactives de forte intensité de SR-BII étaient détectées dans les ITf et les STf de souris SR-BI^{+/+} (fig. 1B). Cependant, seule une bande de 85 kDa apparaissait avec une intensité plus faible dans les échantillons d'ITf et de STf de souris SR-BI^{-/-} que dans ceux de souris SR-BI^{+/+} (fig. 1B). Cette bande correspond à la forme glycosylée de SR-BII de 85 kDa. Toutes les bandes immunoréactives détectées dans les échantillons de souris SR-BI^{+/+} en utilisant l'anticorps anti-SR-BII étaient aussi détectée dans ceux de souris SR-BI^{-/-} (fig. 1B).

MLC: Pour quantifier les analyses de Western blot, nous avons cherché une protéine de référence dont le taux d'expression n'était pas affecté par les conditions expérimentales. Nous avons testé la β -actine, la β -tubuline, la vimentine et la MLC sur des échantillons d'ITf et de STf de souris SR-BI^{-/-}, CD36^{-/-} et HSL^{-/-} et leurs contrôles sauvages respectifs. Seule l'intensité de la bande immunoréactive de MLC n'était pas affectée par la suppression génétique de SR-BI (fig. 1C). Les résultats indiqués dans la figure 1C sont semblables à ceux obtenus à partir des échantillons de souris CD36^{-/-} et HSL^{-/-} et de leurs contrôles sauvages respectifs.

4.2.1.1.2 PCR en temps réel et digestion limitée de SR-BII

Par la technique de PCR en temps réel, nous avons détecté l'ARNm de SR-BI dans les STf de souris SR-BI^{+/+} mais pas dans les STf de souris SR-BI^{-/-} (fig. 1D). L'ARNm de SR-BII a été détecté non seulement dans les échantillons de STf de souris SR-BI^{+/+} mais

également dans celles de souris SR-BI^{-/-} (fig. 1D). Toutefois, nous avons observé une baisse significative ($P < 0.02$) de l'ARNm de SR-BII dans les STf de souris SR-BI^{-/-} comparativement aux souris SR-BI^{+/+} (fig. 1D).

Afin de vérifier la spécificité du produit de PCR de SR-BII, nous avons effectué une digestion limitée de ce produit en utilisant une enzyme digestive, la Pst1, qui clive spécifiquement le transcrite de SR-BII de 93 paires de bases (bp) en deux sous-produits de 44- et 49 bp (Fodor, 1978). Après digestion, le produit initial de 93 bp de SR-BII fut substitué par un produit d'environ 49 bp correspondant aux produits de clivage (fig. 1E). Ce résultat confirme que le transcrite mesuré par le PCR en temps réel correspondait à SR-BII.

4.2.1.2 Expression de SR-BI et SR-BII dans différents tissus de souris normales

L'intensité de la bande immunoréactive de 85 kDa de SR-BI était plus forte dans le foie puis dans les ITf, les STf et l'hypophyse antérieure (fig. 2). Le cœur, le rein et le cerveau ne contenaient que des traces de la protéine SR-BI (fig. 2).

L'intensité de la bande immunoréactive de 85 kDa de SR-BII était plus élevée dans les ITf puis dans les STf, le foie, le cerveau, l'hypophyse antérieure et le cœur (fig. 2). Le rein ne contenait que des traces de la protéine SR-BII (fig. 2).

4.2.1.3 SR-BI et SR-BII dans les ITf et STf de souris normales durant le développement

4.2.1.3.1 ITf

Le niveau d'expression de l'ARNm de SR-BI était bas du 14^{ième} jour au 28^{ième} jour puis augmentait de façon significative ($P < 0,05$) au 35^{ième} jour (fig. 3Aa). Ce niveau élevé était maintenu jusqu'à l'âge l'adulte (fig. 3Aa).

Le profil du taux de variation de la protéine SR-BI durant le développement était semblable à celui de l'ARNm excepté que l'augmentation significative de la protéine ($P < 0,05$) précédait celle de l'ARNm à 28 jours (fig. 3Ba).

Les taux de l'ARNm (fig. 3Ab) et de la protéine de SR-BII (fig. 3Bb) ne variaient pas de façon significative durant le développement.

4.2.1.3.2 *STf*

L'ARNm de SR-BI était bas du 14^{ième} jour au 28^{ième} jour, puis augmentait ($P < 0,001$) avec la complétion de la spermatogenèse au 35^{ième} jour avant de diminuer de façon significative ($P < 0,05$) au 42^{ième} jour (fig. 3Ca).

Le taux de la protéine SR-BI augmentait de façon significative ($P < 0,05$) à 28 jours, demeurait élevé à 35 jours et 42 jours mais diminuait significativement ($P < 0,005$) chez l'adulte à un niveau inférieur à celui de souris âgées de 21 jours (fig. 3Da).

Les taux de l'ARNm (fig. 3Cb) et de la protéine de SR-BII (fig. 3Db) ne variaient pas de façon significative durant le développement.

4.2.1.4 Immuno-histochimie chez la souris adulte

SR-BI: La protéine SR-BI était localisée dans la membrane plasmique et le cytoplasme des cellules de Sertoli (fig. 4A), l'acrosome des spermatides (fig. 4B) et dans la

membrane plasmique des cellules de Leydig (fig. 4C). Les cellules germinales en apoptose étaient fortement marquées (fig. 4B).

SR-BII: La protéine SR-BII était essentiellement localisée dans le cytoplasme des cellules de Sertoli (fig. 4D) et l'acrosome des spermatides arrondies (fig. 4E).

4.2.2 CD36

4.2.2.1 Analyses de Western blot et de PCR

4.2.2.1.1 *Western blot*

Nous avons analysé l'expression de la protéine CD36 dans les STf et les ITf en utilisant le poumon (Guthmann et coll., 1999) comme contrôle positif. Aucun des cinq anticorps commerciaux que nous avons testés n'a révélé de bande spécifique de CD36 dans les échantillons. A l'opposé, l'anticorps anti-CD36 du Dr Febbraio détectait une bande immunoréactive unique de 88 kDa dans l'échantillon de poumon, d'ITf et de STf de souris CD36^{+/+} qui était absente dans les échantillons de souris CD36^{-/-} (fig. 5A). Aucune autre bande immunoréactive correspondant à la forme non-glycosylée (53 kDa) ou à des oligomères (120-, 170 kDa) de CD36 n'était identifiée (fig. 5A).

A la lumière de ces résultats, nous avons décidé d'utiliser l'anticorps anti-CD36 du Dr Febbraio pour toutes les analyses de Western blot et d'immuno-histochimie de CD36. Seule la bande immunoréactive de 88 kDa de CD36 fut prise en compte dans nos résultats de Western blot.

4.2.2.1.2 PCR semi-quantitative et PCR en temps réel

Nos analyses de PCR semi-quantitatif (fig. 5B) et de PCR en temps réel (fig. 5C) ont détecté le transcrit du gène CD36 dans les STf de souris CD36+/+ mais pas dans les STf de souris CD36-/. Ceci est une confirmation des résultats que nous avons obtenus par les analyses de Western blot.

4.2.2.2 CD36 dans les ITf et STf de souris normales durant le développement

4.2.2.2.1 ITf

Les variations du taux d'expression de l'ARNm et de la protéine CD36 étaient semblables (fig. 6A): elles augmentaient du 14^{ième} au 42^{ième} jour et diminuaient de façon significative ($P<0,05$) chez l'adulte pour atteindre des niveaux comparables à ceux obtenus chez les souris de 14 jours (fig. 6A).

4.2.2.2.2 STf

Le taux d'expression de l'ARNm et de la protéine de CD36 était faible du 14^{ième} au 35^{ième} jour (fig. 6B). Ensuite, l'ARNm ($P<0,02$) et la protéine ($P<0,005$) de CD36 augmentaient de façon significative une première fois à 42 jours puis une seconde fois chez l'adulte (fig. 6B).

4.2.2.3 Immuno-histochimie chez la souris adulte

La protéine CD36 était localisée dans le cytoplasme et à la membrane des cellules de Sertoli et des cellules du tissu interstitiel (fig. 7).

4.2.3 ABCA1

4.2.3.1 ABCA1 dans les ITf et STf de souris normales durant le développement

4.2.3.1.1 ITf

Les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine ABCA1 ne variaient pas de façon significative (fig. 8A).

4.2.3.1.2 STf

Les niveaux de l'ARNm et de la protéine d'ABCA1 tendaient à augmenter du 14^{ième} jour au 42^{ième} jour (fig. 8B). Chez l'adulte en revanche, l'ARNm d'ABCA1 augmentait de façon significative ($P < 0,05$) alors que le taux de la protéine diminuait de façon significative ($P < 0,005$) (fig. 8B).

4.2.3.2 Immuno-histochimie chez la souris adulte

La protéine ABCA1 était localisée dans la région basale des cellules de Sertoli, dans le cytoplasme et à la membrane plasmique. L'acrosome des cellules germinales et le cytoplasme des cellules du tissu interstitiel étaient aussi marqués (fig. 9).

4.2.4 Cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum durant le développement

ITf: Les taux de CL et de CE ne variaient pas de façon significative (fig. 10A).

STf: Le taux de CL variait peu tandis que celui du CE augmentait de façon significative ($P<0,05$) à 35 jours puis diminuait significativement ($P<0,01$) à 42 jours (fig. 10B).

Sérum: Le taux de CL variait peu du 14^{ième} au 42^{ième} jour mais il baissait significativement ($P<0,05$) chez l'adulte (fig. 10C).

Le taux de CE augmentait significativement ($P<0,05$) à 21 jours puis à nouveau à 35 jours ($P<0,01$) avant de tendre à la baisse à 42 jours et chez l'adulte (fig. 10C).

4.3 Étude chez les souris génétiquement déficientes en SR-BI, CD36 et HSL

Cette étude avait pour but de déterminer si la suppression du gène d'une enzyme (HSL) ou de celui d'un transporteur sélectif de cholestérol (SR-BI ou CD36) était compensée et comment cette suppression affectait le taux de CL et de CE dans les ITf et les STf. Pour cela, nous avons mesuré l'expression de l'ARNm et de la protéine des transporteurs sélectifs de cholestérol (SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1) et l'expression de la protéine des enzymes du métabolisme de cholestérol (HSL, HMG-CoA réd., ACAT1 et ACAT2) dans les ITf et les STf de souris SR-BI^{-/-}, de souris CD36^{-/-} et de souris HSL^{-/-} que nous avons comparée à leurs contrôles sauvages respectifs. Les mesures de l'ARNm des enzymes du métabolisme du cholestérol ont été réalisées par une étudiante graduée dans un autre projet et ne seront pas présentées ici.

4.3.1 Souris génétiquement déficientes en transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BI et CD36

4.3.1.1 Souris SR-BI^{-/-}

4.3.1.1.1 Expression de SR-BII, CD36 et ABCA1 dans les ITf et les STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-}

4.3.1.1.1.1 ITf

Le niveau d'expression de l'ARNm de SR-BII ($P < 0,01$) et de celui de CD36 ($P < 0,02$) étaient significativement plus bas chez les souris SR-BI^{-/-} que chez les souris SR-BI^{+/+} (fig. 11Aa). Par contre, celui d'ABCA1 était significativement augmenté ($P < 0,005$) chez les souris SR-BI^{-/-} par rapport aux souris SR-BI^{+/+} (fig. 11Aa).

Les taux d'expression des protéines SR-BII ($P < 0,05$) et ABCA1 ($P < 0,01$) étaient plus bas chez les souris SR-BI^{-/-} que chez les souris SR-BI^{+/+} (fig. 11Ab). A l'opposée, le taux d'expression de CD36 ($P < 0,05$) était plus élevé chez les souris SR-BI^{-/-} que chez les souris SR-BI^{+/+} (fig. 11Ab).

4.3.1.1.1.2 STf

Les niveaux d'expression de l'ARNm de SR-BII ($P < 0,02$) et de CD36 ($P < 0,005$) étaient significativement plus bas chez les souris SR-BI^{-/-} comparé à les souris SR-BI^{+/+} alors que celui de l'ABCA1 plus élevé ($P < 0,0005$) (fig. 11Ba).

Les niveaux d'expression de la protéine SR-BII ($P < 0,05$) et de l'ABCA1 ($P < 0,01$) étaient significativement plus bas chez les souris SR-BI^{-/-} comparés aux souris SR-BI^{+/+}

(fig. 11Bb). Les niveaux d'expression de la protéine CD36 étaient semblables dans les deux groupes de souris (fig. 11Bb).

4.3.1.1.2 Expression de la HSL, HMR-CoA réd., ACAT1 et ACAT2 dans les ITf et STf de souris SR-BI +/+ et SR-BI -/-

4.3.1.1.2.1 ITf

Le niveau d'expression protéinique de la HSL était significativement plus élevé ($P < 0,005$) chez les souris SR-BI^{-/-} comparé aux souris SR-BI^{+/+} tandis que celui de l'ACAT1 était significativement plus bas ($P < 0,001$) (fig. 12A). Les niveaux d'expression de la protéine HMG-CoA réd. et ACAT2 chez les souris SR-BI^{-/-} étaient comparables à ceux mesurés chez les souris SR-BI^{+/+} (fig. 12A).

4.3.1.1.2.2 STf

L'expression de la protéine HSL était significativement plus élevée ($P < 0,005$) chez les souris SR-BI^{-/-} que les souris SR-BI^{+/+} (fig. 12B). En revanche, l'expression de l'ACAT1 ($P < 0,001$) et celle de l'ACAT2 ($P < 0,01$) étaient significativement plus basses chez les souris SR-BI^{-/-} que chez les souris SR-BI^{+/+} (fig. 12B). L'expression de la HMG-CoA réd. chez les souris SR-BI^{-/-} était comparable à celle mesurée chez les souris SR-BI^{+/+} (fig. 12B).

4.3.1.1.3 Cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum de souris SR-BI +/+ et SR-BI -/-

Dans les ITf, le taux de CL chez les souris SR-BI^{-/-} était comparable à celui mesuré chez les souris SR-BI^{+/+} tandis que celui du CE était significativement plus bas ($P < 0,0005$) chez les souris SR-BI^{-/-} comparé aux souris SR-BI^{+/+} (fig. 13A).

Les taux de CL et de CE étaient comparables dans les STf de souris SR-BI^{-/-} et SR-BI^{+/+} (fig. 13B).

Dans le sérum, le taux de CL était significativement plus haut ($P < 0,0001$) et celui du CE plus bas ($P < 0,02$) chez les souris SR-BI^{-/-} comparées aux souris SR-BI^{+/+} (fig. 13C).

4.3.1.2 Souris CD36^{-/-}

4.3.1.2.1 Expression de SR-BI, SR-BII et ABCA1 dans les ITf et STf de souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-}

4.3.1.2.1.1 ITf

Seul le niveau d'expression de l'ARNm de SR-BI était significativement plus bas ($P < 0,02$) chez les souris CD36^{-/-} comparé aux souris CD36^{+/+} (fig. 14Aa). Les taux de l'ARNm de SR-BII et ceux de l'ABCA1 ne différaient pas significativement dans les deux groupes de souris (fig. 14Aa).

Le niveau d'expression des protéines SR-BI ($P < 0,05$) et SR-BII ($P < 0,05$) était significativement plus élevé chez les souris CD36^{-/-} que chez les souris CD36^{+/+} alors celui de l'ABCA1 n'était pas significativement différent chez les deux groupes de souris (fig. 14Ab).

4.3.1.2.1.2 *STf*

Le niveau d'expression de l'ARNm de SR-BI ($P < 0,002$) et de l'ABCA1 ($P < 0,05$) était plus bas chez les souris CD36^{-/-} que chez les souris CD36^{+/+} (fig. 14Ba). Le taux d'expression de l'ARNm de SR-BII n'était pas significativement différent dans les deux groupes de souris (fig. 14Ba).

Les taux d'expression des protéines SR-BI ($P < 0,0001$), SR-BII ($P < 0,05$) et ABCA1 ($P < 0,02$) étaient significativement plus élevés chez les souris CD36^{-/-} que chez les souris CD36^{+/+} (fig. 14Bb).

4.3.1.2.2 *Expression de la HSL, HMR-CoA réductase, ACAT1 et ACAT2 dans les ITf et STf de souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-}*

4.3.1.2.2.1 *ITf*

Seule l'expression de la protéine ACAT1 était significativement plus élevée ($P < 0,005$) chez les souris CD36^{-/-} comparée aux souris CD36^{+/+} (fig. 15A). Les taux d'expression des protéines HSL, HMG-CoA réd. et ACAT2 n'étaient pas significativement différents dans les deux groupes de souris (fig. 15A).

4.3.1.2.2.2 *STf*

Le niveau d'expression de la protéine HSL était significativement plus bas ($P < 0,02$) tandis que celui de l'ACAT1 était significativement plus élevé ($P < 0,05$) chez les souris CD36^{-/-} que chez les souris CD36^{+/+} (fig. 15B). Par contre, les niveaux

d'expression de la HMG-CoA réd. et d'ACAT2 n'étaient pas significativement différents dans les deux groupes (fig. 15B)

4.3.1.2.3 Cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum de souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-}

Les taux de CL et de CE n'étaient pas significativement différents dans les ITf (16), les STf (16B) et le sérum (16C) de souris CD36^{-/-} comparés aux souris CD36^{+/+}.

4.3.2 Souris génétiquement déficientes en HSL

4.3.2.1 Expression de SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1 dans les ITf et STf de souris HSL^{+/+} et HSL^{-/-}

4.3.2.1.1 ITf

L'ARNm de SR-BI ($P < 0,05$) et de CD36 ($P < 0,005$) étaient significativement plus bas chez les souris HSL^{-/-} que chez les souris HSL^{+/+} (fig. 17Aa). Par contre, le taux d'ARNm de SR-BII et celui de l'ABCA1 n'étaient pas significativement différents dans les deux groupes de souris (fig. 17Aa).

Les taux de protéine de SR-BI ($P < 0,05$) et de l'ABCA1 ($P < 0,0005$) étaient significativement plus élevés chez les souris HSL^{-/-} que chez les souris HSL^{+/+} (fig. 17 Ab). Le taux de CD36 était significativement plus bas ($P < 0,05$) chez les souris HSL^{-/-} comparé à ceux HSL^{+/+} alors que celui de SR-BII n'était pas significativement différent dans les deux groupes (fig. 17Ab).

4.3.2.1.2 STf

Le taux d'ARNm de SR-BII était deux fois plus élevé ($P < 0,0005$) tandis que celui de CD36 deux fois moindre ($P < 0,05$) chez les souris HSL^{-/-} que chez les souris HSL^{+/+} (fig. 17Ba). Les taux d'ARNm de SR-BI et d'ABCA1 ne différaient pas de façon significative chez les souris HSL^{-/-} et HSL^{+/+} (fig. 17Ba).

Les taux de protéine de SR-BI ($P < 0,05$) et de l'ABCA1 ($P < 0,001$) étaient significativement plus élevés chez les souris HSL^{-/-} que chez les souris HSL^{+/+} (fig. 17Bb). En revanche, les taux de SR-BII et de CD36 n'étaient pas significativement différents dans les deux groupes (fig. 17Bb).

4.3.2.2 Expression de la HMG-CoA réd., ACAT1 et ACAT2 dans les ITf et STf de souris HSL^{+/+} et HSL^{-/-}

4.3.2.2.1 ITf

Les taux protéiniques de la HMG-CoA réd. et d'ACAT1 étaient significativement plus élevés ($P < 0,005$) chez les souris HSL^{-/-} que chez les souris HSL^{+/+} (fig. 18A). Cependant, le taux d'ACAT2 n'était pas significativement différent dans les deux groupes (fig. 18A).

4.3.2.2.2 STf

Le niveau d'expression de la protéine HMG-CoA réd. ($P < 0,01$) et de l'ACAT1 ($P < 0,005$) était significativement plus élevé dans les STf HSL^{-/-} comparé aux STf HSL^{+/+}. A l'opposé, le niveau d'expression de la protéine ACAT2 était significativement plus bas ($P < 0,005$) dans les STf de souris HSL^{-/-} comparé à celles de souris HSL^{+/+} (fig. 18B).

4.3.2.3 Taux de cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum de souris HSL+/+ et HSL-/-

Le taux de CL n'était pas significativement différent dans les ITf de souris HSL-/- et HSL+/+ alors qu'il était significativement plus élevé ($P < 0,05$) dans les STf de souris HSL-/- que chez les souris HSL+/+ (fig. 19A). Le taux de CE était significativement plus élevé dans les ITf ($P < 0,01$) et les STf ($P < 0,005$) de souris HSL-/- comparés aux souris HSL+/+ (fig. 19B). Les niveaux de CL ($P < 0,001$) et CE ($P < 0,02$) étaient significativement plus élevés dans le sérum de souris HSL-/- que dans celui de souris HSL+/+ (fig. 19C).

4.4 Étude des transporteurs sélectifs de cholestérol chez les visons et mesure du taux de cholestérol

Nous avons publié en 2006 un article dans la revue «Journal of Lipid Research» (Akpovi et coll., 2006) sur les résultats des travaux que j'ai réalisés durant mes études de maîtrise et sur certains résultats générés dans le cadre de mes études de doctorat. Voici ces résultats:

4.4.1 Mesure du taux protéinique des transporteurs sélectifs de cholestérol dans les STf

SR-BI: Le taux protéinique de SR-BI était significativement plus élevé ($P < 0,02$) chez les visons atteints d'orchite autoimmune (AIO) spontanée que chez les visons normaux du mois de février (Annexe 1, fig. 8). En revanche, les niveaux d'expression de

SR-BI ne différaient pas de façon significative chez les visons orchitiques et les visons normaux en mars et juillet (Annexe 1, fig. 8).

SR-BII: Les taux d'expression de SR-BII n'étaient pas significativement différents chez les visons orchitiques et les visons normaux en février (Annexe 1, fig. 8). En revanche, SR-BII était significativement plus bas ($P < 0,02$) en mars mais significativement plus élevé ($P < 0,05$) en juillet chez les visons orchitiques que chez les visons normaux (Annexe 1, fig. 8).

CD36: Le niveau d'expression de CD36 n'était pas significativement différent chez les visons orchitiques et les visons normaux en février (fig. 20A). Par contre, CD36 était significativement plus bas ($P < 0,02$) en mars alors qu'il était significativement plus élevé ($P < 0,05$) en juillet chez les visons orchitiques que chez les visons normaux (fig. 20A).

ABCA1: Le niveau protéinique d'ABCA1 n'était pas significativement différent chez les visons orchitiques et les visons normaux en février (fig. 20B). En revanche, ABCA1 était significativement plus élevé ($P < 0,05$) chez les visons orchitiques que chez les visons normaux en mars. En juillet, ABCA1 était significativement plus bas ($P < 0,005$) chez les visons orchitiques que chez les visons normaux (fig. 20B).

4.4.2 Cholestérol libre et estérifié chez les visons normaux et orchitiques

4.4.2.1 Visons normaux

4.4.2.1.1 *ITf*

Développement: Le taux de CE augmentait du 60^{ième} jour au 150^{ième} avant de baisser significativement ($P < 0,05$) à 180 jours alors que le taux de CL ne variait pas de façon significative (Annexe 1, fig. 7).

Cycle reproductif saisonnier: Les taux de CL et de CE étaient plus bas de décembre à mars que durant le reste du cycle reproductif annuel (Article1, fig. 7).

4.4.2.1.2 STf

Développement: Les taux de CL et de CE ne variaient pas de façon significative (Article1, fig. 7).

Cycle reproductif saisonnier: Le taux de CE était élevé d'août à novembre avant de baisser significativement ($P < 0,05$) en décembre puis demeurait bas jusqu'en mars. Il augmentait ensuite significativement ($P < 0,02$) en avril au niveau atteint en août avant de baisser significativement ($P < 0,01$) en mai (Article1, fig. 7). Le taux de CL ne variait pas de façon significative durant le cycle reproductif annuel (Annexe 1, fig. 7).

4.4.2.2 Visons orchitiques

Le taux de CL n'était pas significativement différent dans les STf de visons orchitiques et de visons normaux de février, mars et juillet (Article1, fig. 8). De même, le taux de CE n'était pas significativement différents entre les deux groupes de visons en février et juillet mais il était significativement plus élevé chez les visons orchitiques que chez les visons normaux en mars ($P < 0,05$) (Annexe 1, fig. 9).

4.5 Étude des transporteurs sélectifs et des enzymes du métabolisme du cholestérol dans les STf de souris NPC1^{+/+} et NPC1^{-/-}

Le Niemann-Pick type C1 (NPC1) effectue le transport intracellulaire du cholestérol des compartiments endosome/lysosome vers d'autres organites qui utilisent le cholestérol (Ko et coll., 2001). La déficience en NPC1 provoque une accumulation du cholestérol dans les lysosomes (Ko et coll., 2001) et il a été rapporté que les souris mâles et femelles NPC1^{-/-} étaient infertiles (Erickson et coll., 2002; Fan et coll., 2006). Dans notre étude, nous avons examiné si les causes de l'infertilité rapportée chez les souris mâles NPC1^{-/-} entraînaient un dérèglement du métabolisme du cholestérol testiculaire et des changements dans l'expression de la protéine des facteurs enzymatiques (HSL, HMG-CoA Réd., ACAT1 et ACAT2) et non-enzymatiques (SR-BI, SR-BII, ABCA1 et CD36) et dans les taux de CL et de CE dans les STf des souris NPC1^{-/-}.

Les taux protéiniques de SR-BI ($P < 0,02$) et d'ABCA1 ($P < 0,05$) étaient significativement plus élevés chez les souris NPC1^{-/-} que chez les souris NPC1^{+/+} (fig. 21A). En revanche, les taux protéiniques de SR-BII n'étaient pas significativement différents chez les souris NPC1^{-/-} et NPC1^{+/+} (fig. 21A).

Les niveaux d'expression des protéines HMG-CoA réd. ($P < 0,05$), ACAT1 ($P < 0,01$) et ACAT2 ($P < 0,02$) étaient significativement plus élevés chez les souris NPC1^{-/-} que chez les souris NPC1^{+/+} (fig. 21B). Par contre, les taux protéiniques de la HSL n'étaient pas significativement différents chez les souris NPC1^{-/-} et les souris NPC1^{+/+} (fig. 21B).

Le taux de CL était deux fois plus élevé ($P < 0,01$) chez les souris NPC1^{-/-} que chez les souris NPC1^{+/+} (fig. 21C). Le taux de CE quant à lui était environ 10 fois plus élevé ($P < 0,005$) chez les souris NPC1^{-/-} que chez les souris NPC1^{+/+} (fig. 21C).

4.6 Étude de protéines de jonctions lacunaires chez la souris

La protéine SR-BI est exprimée dans la membrane plasmique où elle médie l'influx et l'efflux du cholestérol (Yancey et coll., 2000). Cette fonction est rendue possible par la localisation de la protéine dans des microdomaines de la membrane plasmique riches en cholestérol tels que les radeaux lipidiques «rafts» et les cavéoles (Peng et coll., 2004). Nous avons testé l'hypothèse que la suppression génétique de SR-BI entraînerait un changement dans l'expression des protéines de jonctions lacunaires entre cellules de Sertoli et entre cellules de Sertoli et cellules germinales. Nous avons basé notre hypothèse sur le fait qu'un changement du taux de cholestérol membranaire, causé par la suppression génétique de SR-BI, pourrait entraîner des changements dans l'expression des protéines constituant ces jonctions lacunaires. Nous avons mesuré l'expression de Cx26, Cx30.2, Cx32, Cx43, Cx46 et Cx50, ainsi que la flotilline-1 et la cavéoline-1, qui sont associées aux radeaux lipidiques, dans les STf de souris normales et de souris génétiquement déficientes en SR-BI.

4.6.1 Quantification des taux protéiniques de différentes connexines dans les STf de souris normales durant le développement

Cx26: L'expression de la Cx26 était faible à 14 jour puis augmentait de façon significative ($P<0,02$) au 21^{ième} jour (fig. 22) mais diminuait significativement ($P<0,05$) chez l'adulte (fig. 22).

Cx30.2: Nous n'avons détecté que des traces de Cx30.2 dans les STf du 14^{ième} jour et du 21^{ième} jour (fig. 22). Le niveau de Cx30.2 augmentait ensuite de façon significative d'abord à 28 jours ($P<0,01$) puis une seconde fois à 35 jours ($P<0,05$) avant de baisser significativement ($P<0,005$) chez l'adulte (fig. 22).

Cx31: Le taux protéinique de la Cx31 était bas durant la période pré-puberte mais augmentait au cours du développement pour atteindre son niveau maximal chez l'adulte (fig. 22).

Cx32: Le taux protéinique de la Cx32 ne variait pas de façon significative durant le développement (fig. 22).

Cx46: Le niveau d'expression de la Cx46 était le plus bas à 14 jours puis augmentait progressivement au cours du développement (fig. 22).

Cx50: Le taux d'expression de la Cx50 augmentait progressivement au cours du développement et ce de façon significative ($P<0,01$) à 42 jours avant de baisser significativement ($P<0,002$) chez l'adulte (fig. 22).

Pan Cx43: Le niveau d'expression de la Pan Cx43 était le plus élevé à 14 jours puis diminuait progressivement jusqu'à l'âge adulte où il atteignait son niveau le plus bas (fig. 22). Cette baisse était significative ($P<0,05$) à 28 jours (fig. 22).

Cx43 phosphorylée en sérine 368: Le taux protéinique de la Cx43 phosphorylée en sérine 368 était le plus élevé à 14 jours puis baissait significativement à 21 jours ($P<0,002$),

à 28 jours ($P<0,02$) et à 35 jours ($P<0,05$) où le taux le plus bas était atteint (fig. 22). Ce niveau bas était maintenu à 42 jours et chez l'adulte (fig. 22).

Cx43 non-phosphorylée en sérine 368: Le taux d'expression de la Cx43 non-phosphorylée en sérine 368 était le plus élevé à 14 jours et 21 jours avant de baisser significativement ($P<0,005$) à 35 jours (fig. 22) puis demeurait inchangé durant le reste du développement et chez l'adulte (fig. 22).

4.6.2 Quantification des taux protéiniques de différentes connexines dans les STf de souris SR-BI+/+ et SR-BI/-

Le niveau d'expression de la Cx-26, -30.2, -46 et Pan Cx43 n'était pas significativement différent chez les souris SR-BI/- et les souris SR-BI+/+ (fig. 23A). Cependant, le niveau d'expression de la Cx32 était significativement plus élevé ($P<0,02$) tandis que celui de la Cx50 était significativement plus bas ($P<0,05$) chez les souris SR-BI/- que chez les souris SR-BI+/+ (fig. 23A). Bien que le niveau d'expression de la Pan Cx43 ne différait pas de façon significative chez les souris SR-BI/- et les souris SR-BI+/+, le taux de la Cx43 non-phosphorylée en sérine 368 était significativement plus élevé ($P<0,005$) tandis que celui de la Cx43 phosphorylée en sérine 368 était significativement plus bas ($P<0,02$) chez les souris SR-BI/- que chez les souris SR-BI+/+ (fig. 23B).

4.6.3 Quantification des taux protéiniques de cavéoline-1 et de flotilline-1 dans les STf de souris SR-BI+/+ et SR-BI-/-

Le niveau d'expression de la cavéoline-1 était significativement plus élevé ($P < 0,005$) chez les souris SR-BI-/- que les souris SR-BI+/+ tandis que celui de la flotilline-1 était significativement plus bas ($P < 0,05$) dans le premier groupe de souris que dans le second (fig. 24).

Tableau 3: Résumé des analyses de l'ARNm, de la protéine et du cholestérol libre et estérifié dans les **ITf** de souris SR-BI^{-/-}, CD36^{-/-} et HSL^{-/-} comparées aux souris normales

Paramètres mesurés	Observations [ARNm (↑)/Protéines (↑)]		
	SR-BI ^{-/-}	CD36 ^{-/-}	HSL ^{-/-}
SR-BI	—	↓ ↑	↓ ↑
SR-BII	↓ ↓	→ ↑	→ →
CD36	↓ ↑	—	↓ ↓
ABCA1	↑ ↓	→ →	→ ↑
HSL	↑	→	—
HMG-CoA Réd.	→	→	↑
ACAT1	↓	↑	↑
ACAT2	→	→	→
CL	→	→	→
CE	↓	→	↑

→ : Paramètre invariable dans les échantillons de souris knockout comparé au Wild type

↑ : Paramètre augmenté dans les échantillons de souris knockout comparé au Wild type

↓ : Paramètre diminué dans les échantillons de souris knockout comparé au Wild type

— : Paramètre non mesuré

CL: cholestérol libre; CE: cholestérol estérifié.

Tableau 4: Résumé des analyses de l'ARNm, de la protéine et du cholestérol libre et estérifié dans les **STf** de souris SR-BI^{-/-}, CD36^{-/-} et HSL^{-/-} comparées aux souris normales

Paramètres mesurés	Observations [ARNm (↑)/Protéines (↑)]			
	SR-BI ^{-/-}	CD36 ^{-/-}	HSL ^{-/-}	NPC1 ^{-/-}
SR-BI	—	↓ ↑	→ ↑	↑
SR-BII	↓ ↓	→ ↑	↑ →	→
CD36	↓ →	—	↓ →	—
ABCA1	↑ ↓	↓ ↑	→ ↑	↑
HSL	↑	↓	—	→
HMG-CoA Réd.	→	→	↑	↑
ACAT1	↓	↑	↑	↑
ACAT2	↓	→	↓	↑
CL	→	→	↑	↑
CE	→	→	↑	↑

→ : Paramètre invariable dans les échantillons de souris knockout comparé au Wild type

↑ : Paramètre augmenté dans les échantillons de souris knockout comparé au Wild type

↓ : Paramètre diminué dans les échantillons de souris knockout comparé au Wild type

— : Paramètre non mesuré

CL: cholestérol libre; CE: cholestérol estérifié.

Figure 1: Étude de la spécificité des anticorps et sondes de SR-BI et SR-BII

Trente μ g de protéines d'homogénat d'ITf et de STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-} furent soumises à une analyse de Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre le SR-BI et un autre contre le SR-BII. Les résultats ont révélé une bande immunoréactive de 85 kDa de SR-BI dans les échantillons d'ITf et STf de souris SR-BI^{+/+} qui n'était pas détectée dans les échantillons de souris SR-BI^{-/-} (A). Les analyses de SR-BII ont révélé plusieurs bandes immunoréactives. Toutefois, l'intensité d'une seule bande immunoréactive de 85 kDa baissait significativement dans les échantillons de souris SR-BI^{-/-} comparée aux échantillons de souris SR-BI^{+/+} (B). L'intensité de la bande immunoréactive de la chaîne légère de la myosine II non-musculaire (MLC) n'était pas affectée par la suppression génétique de SR-BI (C). Les analyses de PCR en temps réel ont détecté l'ARNm de SR-BI dans les échantillons de STf de souris SR-BI^{+/+} mais pas dans ceux de souris SR-BI^{-/-}. Par contre, l'ARNm de SR-BII fut détecté dans les échantillons de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-} (D). L'ARNm de SR-BII détectée dans les STf de souris SR-BI^{-/-} fut soumise à la digestion enzymatique limitée et le résultat a montré que le produit était spécifique à SR-BII (E).

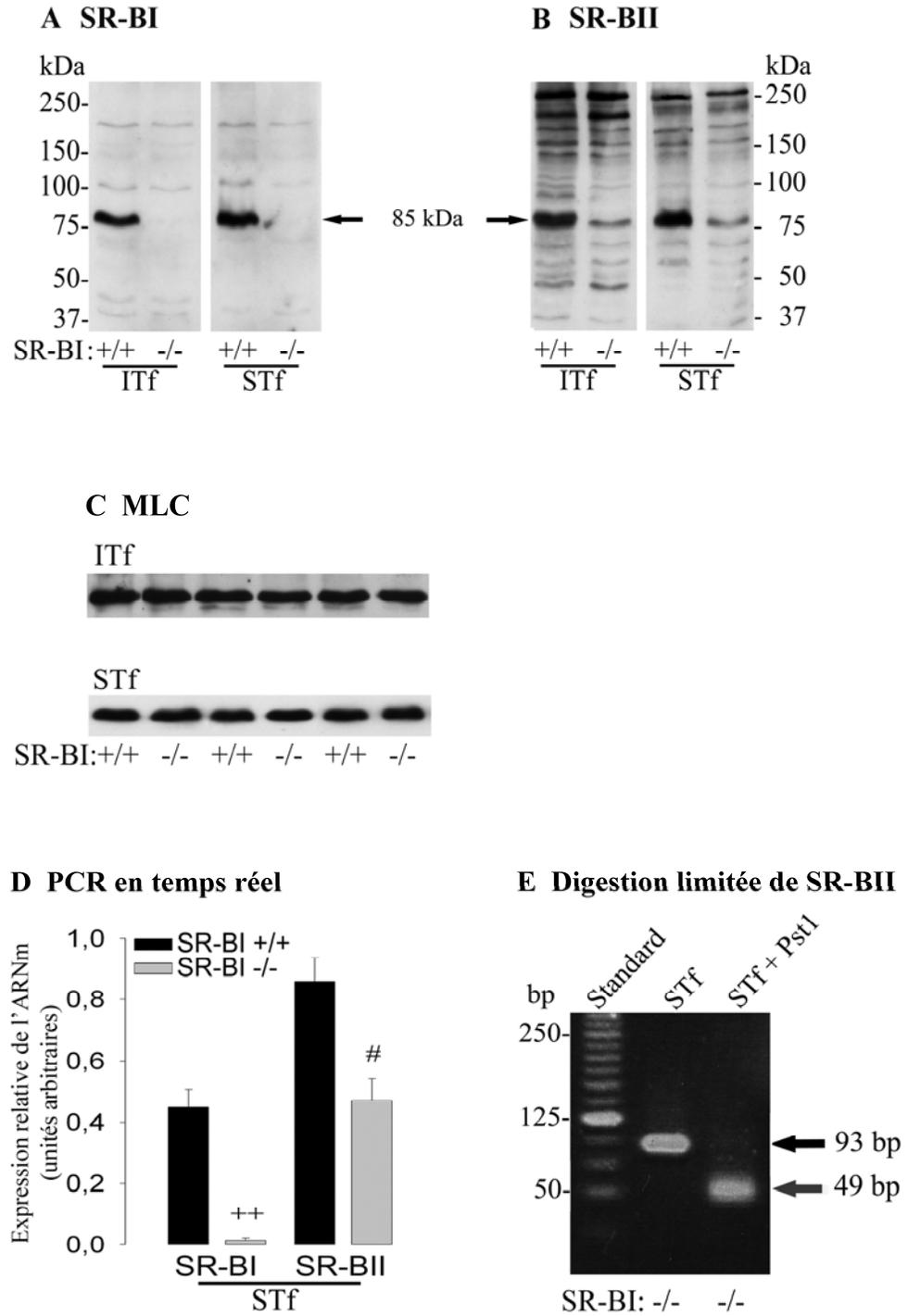


Figure 1

Figure 2: Quantification des taux protéiniques de SR-BI et SR-BII dans différents tissus de souris

Trente μg de protéines de l'homogénat de chaque tissu, prélevé chez des souris adultes âgées de 60 jours, furent analysées par Western blot en utilisant un anticorps spécifique pour SR-BI et un autre pour SR-BII. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme et représentent l'intensité de la bande immunoréactive de la protéine SR-BI et SR-BII en unités arbitraires. (Liv = foie; Kid = rein; Br = cerveau; Hrt = cœur; Pit = hypophyse antérieure).

Expression de la protéine SR-BI et SR-BII dans différents tissus de souris

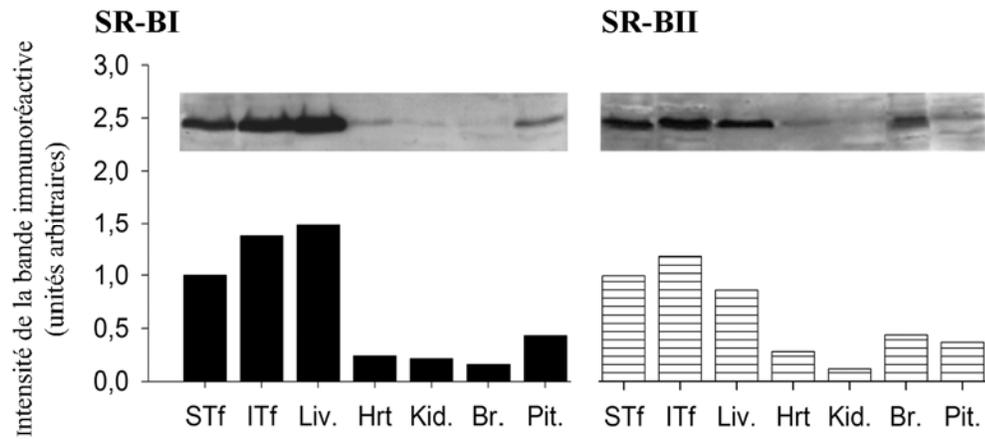


Figure 2

Figure 3: Quantification de l'ARNm et de la protéine de SR-BI et SR-BII dans les ITf et STf de souris normales durant le développement

Le taux de l'ARNm de SR-BI dans les ITf (Aa) et les STf (Ca) et de SR-BII dans les ITf (Ab) et les STf (Cb) furent quantifiés par la technique de PCR en temps réel et les résultats sont exprimés en unités arbitraires sous forme de moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes réalisées à partir d'échantillons différents. Les taux de la protéine SR-BI dans les ITf (Ba) et les STf (Da) et de la protéine SR-BII dans les ITf (Bb) et les STf furent mesurés par Western blot et l'intensité des bandes immunoréactives obtenues fut quantifiée. Les résultats, exprimés unités arbitraires, représentent la moyenne \pm erreur standard de cinq expériences indépendantes. Les analyses de SR-BI et SR-BII furent réalisées dans les mêmes échantillons d'ITf et de STf. (++P<0.001; *P<0.05; **P<0.005).

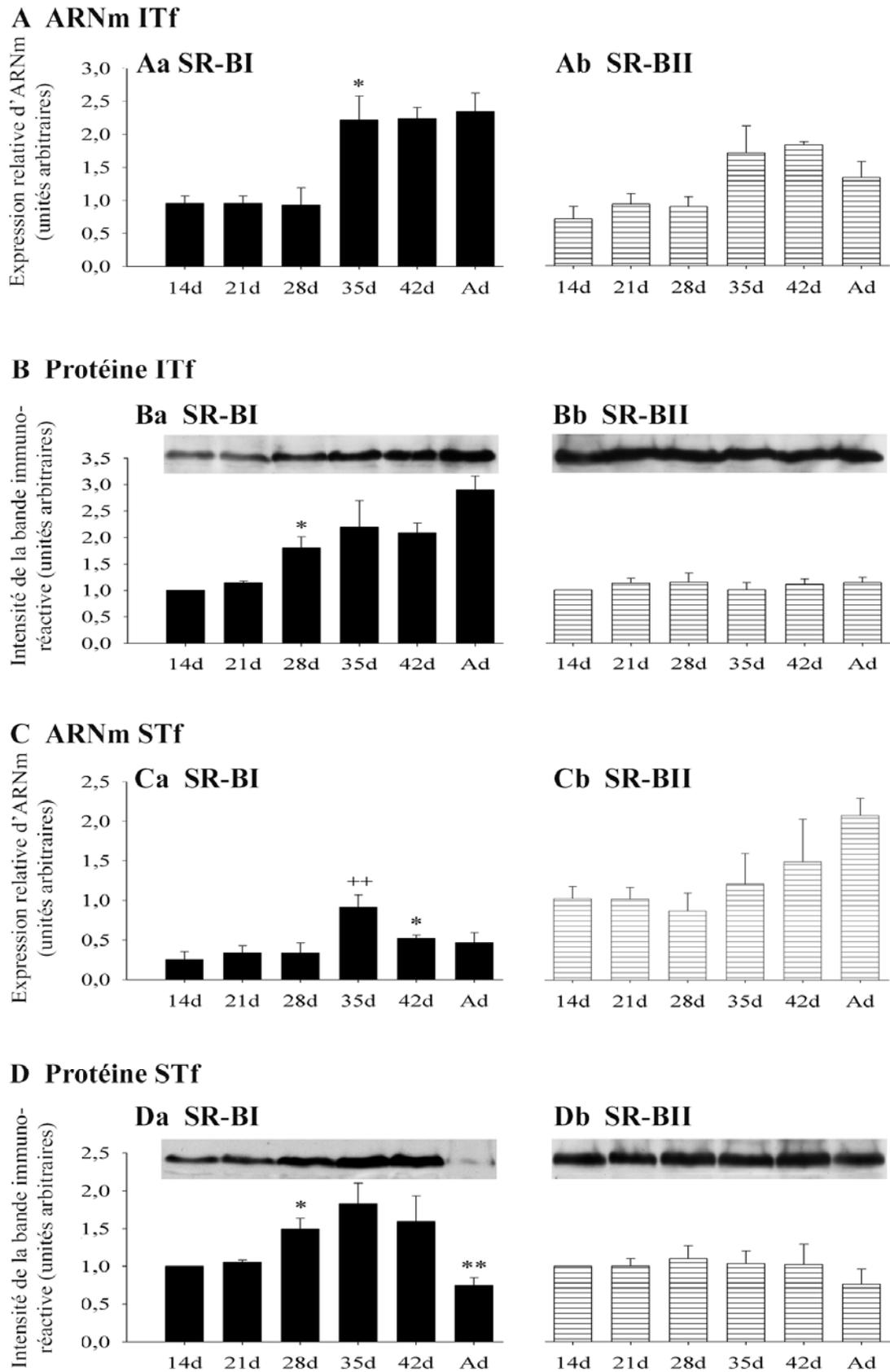


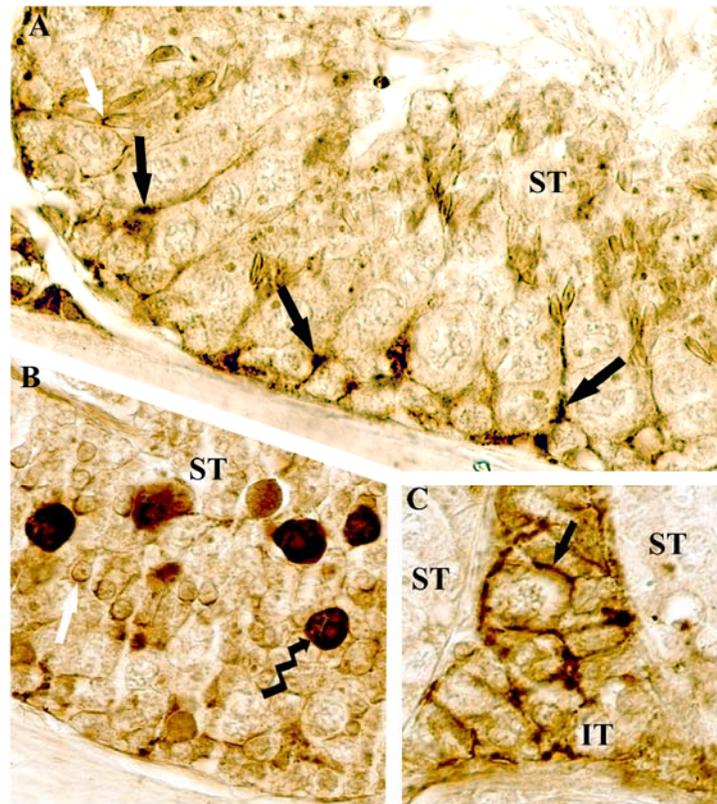
Figure 3

Figure 4: Immuno-histochimie de SR-BI et SR-BII dans le testicule de souris adultes

(A) Dans les tubules séminifères, SR-BI est localisé dans les cellules de Sertoli (flèche noire), les spermatides arrondies (B, flèche blanche) et les cellules germinales en apoptose (B, flèche zigzag). (C) Dans le tissu interstitiel, SR-BI était localisé dans la membrane des cellules de Leydig.

SR-BII était localisé dans les cellules de Sertoli (D, flèches noires) et dans l'acrosome des spermatides arrondies (E, flèche blanche). (IT: Tissu interstitiel; ST: Tubule séminifère)

SR-BI



SR-BII

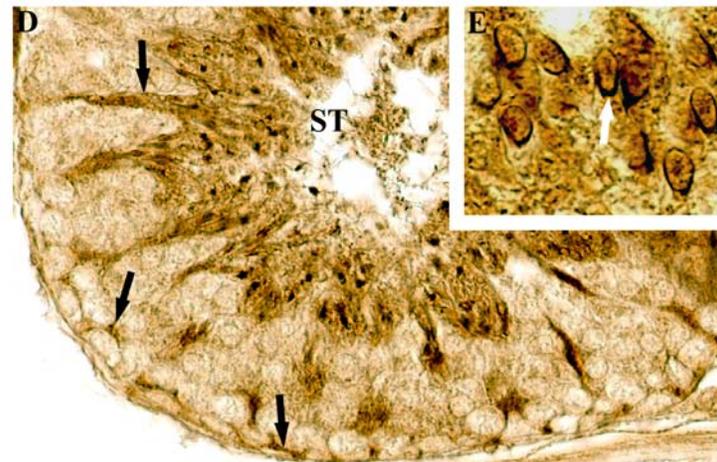


Figure 4

Figure 5: Étude de la spécificité des anticorps et sondes de CD36

A) Les analyses de Western blot de CD36 furent effectuées à partir de cinquante μg de protéines d'homogénat de poumon, d'ITf et de STf de souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-}. Les résultats ont révélé une bande immunoréactive de 88 kDa dans le poumon de souris CD36^{+/+} qui n'était pas détectée dans le poumon de souris CD36^{-/-}. Dans les ITf et les STf, nous avons détecté plusieurs bandes immunoréactives. Cependant, une bande immunoréactive de 88 kDa, correspondant à celle détectée dans le poumon de souris CD36^{+/+}, n'était pas détectée dans les ITf et STf de souris CD36^{-/-}. L'ARNm de CD36 était détecté dans les STf de souris CD36^{+/+} par les analyses de PCR semi-quantitatif (B) et de PCR en temps réel (C) mais pas dans celles de souris CD36^{-/-}.

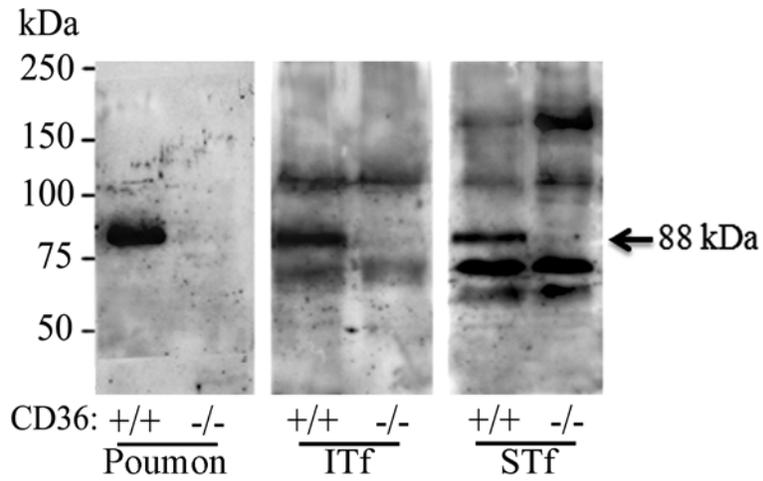
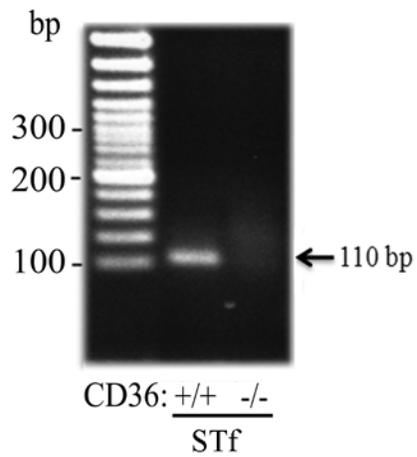
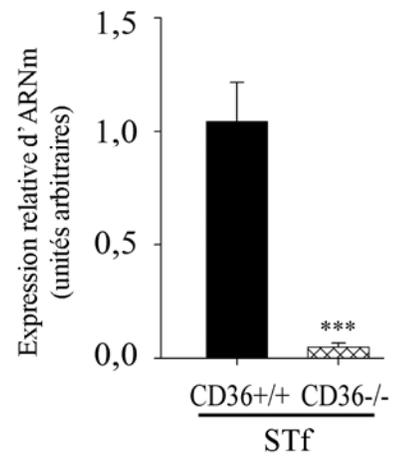
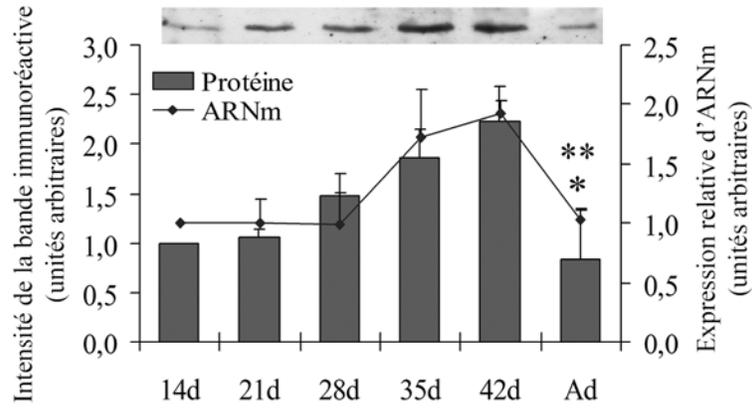
A Western blot**B PCR semi-quantitative****C PCR en temps réel****Figure 5**

Figure 6: Quantification de l'ARNm et de la protéine de CD36 dans les ITf et STf de souris normales durant le développement

Les taux d'expression de l'ARNm (courbe) et de la protéine (histogramme) de CD36 furent mesurés par PCR en temps réel et par Western blot dans les ITf (A) et dans les STf (B) et les résultats montrés correspondent à la moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes réalisées. Les analyses de Western blot furent réalisées à partir de cinquante μ g de protéines d'homogénat de chaque échantillon. (*P<0.05; **P<0.005; #P<0.02; ##P<0.002).

A CD36 dans les ITf



B CD36 dans les STf

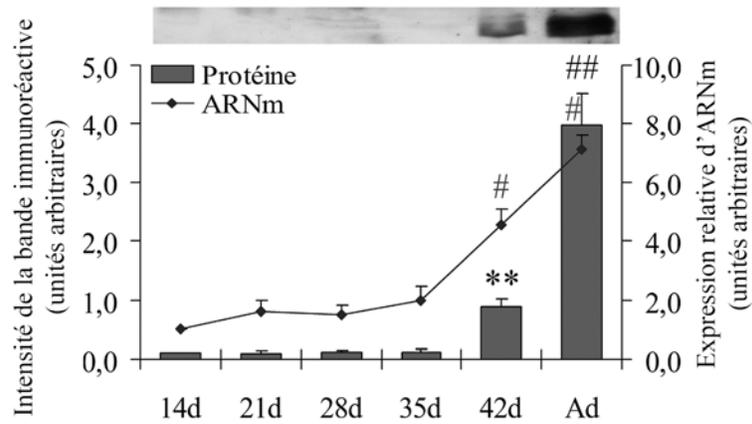


Figure 6

Figure 7: Immuno-histochimie de CD36 dans le testicule de souris adultes

La protéine CD36 était localisée dans le cytoplasme et à la membrane des cellules de Sertoli et des cellules du tissu interstitiel. (IT: Tissu interstitiel; ST: Tubule séminifère; V: Vaisseau sanguin)

CD36

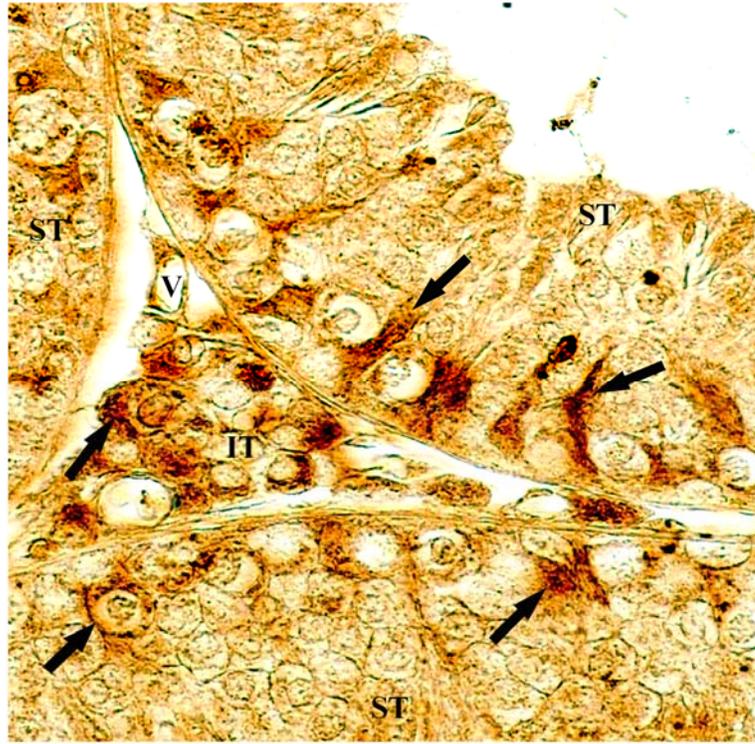
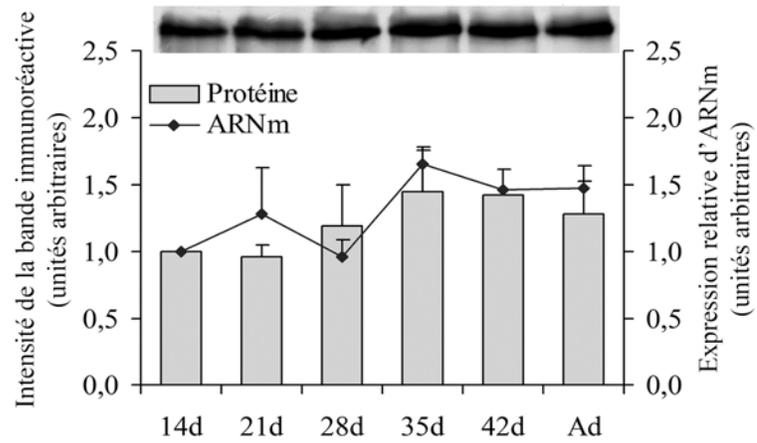


Figure 7

Figure 8: Quantification de l'ARNm et de la protéine d'ABCA1 dans les ITf et les STf de souris normales durant le développement

Les taux d'expression de l'ARNm (courbe) et de la protéine (histogramme) d'ABCA1 furent mesurés par PCR en temps réel et par Western blot dans les ITf (A) et les STf (B). Les analyses de Western blot furent réalisées à partir de trente µg de protéines de chaque échantillon. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (*P<0.05; **P<0.005).

A ABCA1 dans les ITf



B ABCA1 dans les STF

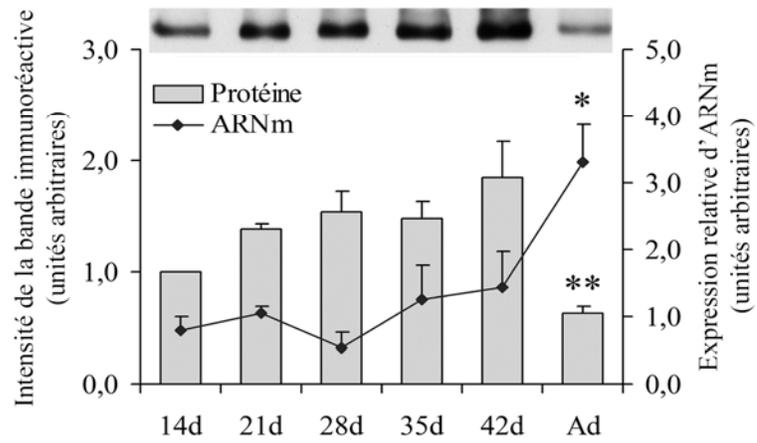


Figure 8

Figure 9: Immuno-histochimie d'ABCA1 dans le testicule de souris adultes

La protéine ABCA1 était essentiellement localisée dans le cytoplasme des cellules de Sertoli et faiblement à la membrane plasmique (A, flèches noires). L'acrosome des cellules germinales (A, flèche blanche) et le cytoplasme des cellules du tissu interstitiel (B) étaient aussi marqués (flèche noire). (IT: Tissu interstitiel; ST: Tubule séminifère)

ABCA1

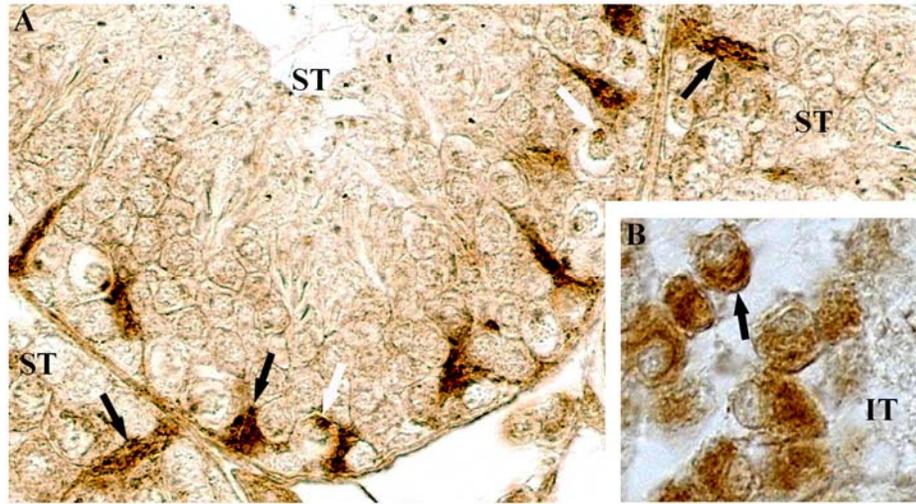
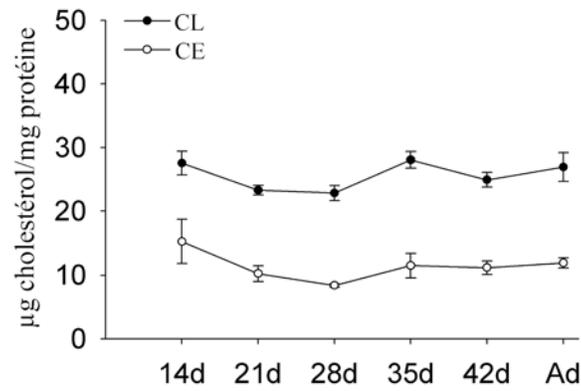


Figure 9

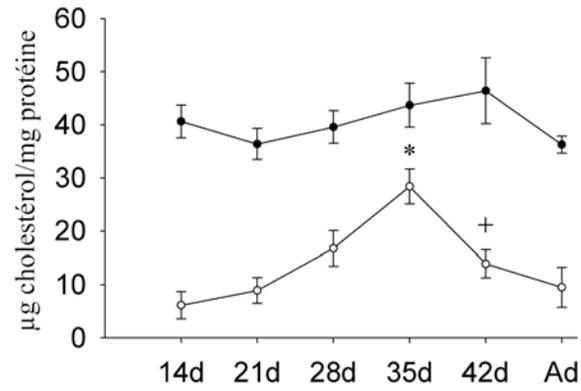
Figure 10: Taux de CL et de CE dans les ITf, les STf et le sérum de souris normales durant le développement

Les lipides contenus dans les échantillons d'ITf, de STf et de sérum furent extraits dans l'hexane/isopropanol (3:2). Le taux de CT et CL contenus dans les extraits furent dosés par la technique enzymatique (Wako). La concentration en CE est obtenue en soustrayant la valeur du taux de CL de celle de CT à l'intérieur de chaque échantillon. Les taux de CL et de CE sont exprimés en μg de cholestérol/mg de protéines d'ITf et STf, et en mg de cholestérol/dl de sérum. Les résultats représentent la moyenne \pm erreur standard de six expériences indépendantes pour les STf et de quatre expériences indépendantes pour les ITf et le sérum. (+P<0.01; *P<0.05).

A Cholestérol dans les ITf



B Cholestérol dans les STf



C Cholestérol dans le sérum

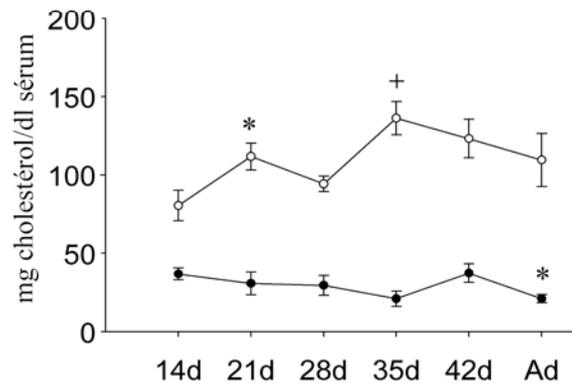
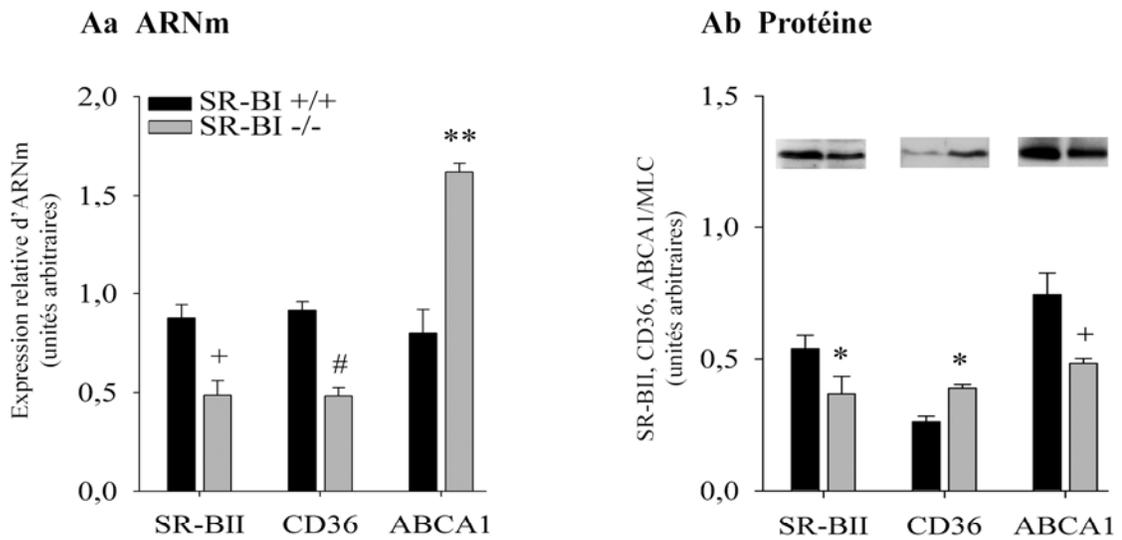


Figure 10

Figure 11: Quantification de l'ARNm et de la protéine des transporteurs sélectifs de cholestérol dans les ITf et STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-}

Les taux d'expression de l'ARNm de SR-BII, de CD36 et de l'ABCA1 furent mesurés dans les ITf (Aa) et les STf (Ba) de souris SR-BI^{+/+} et de souris SR-BI^{-/-} par le PCR en temps réel. L'expression de la protéine SR-BII, CD36 et ABCA1 fut analysée par Western blot dans les ITf (Ab) et les STf (Bb). Trente µg de protéines d'homogénat de chaque échantillon furent analysées dans le cas de SR-BII et ABCA1 et cinquante µg de protéines dans le cas de CD36. Les bandes immunoréactives obtenues furent ensuite quantifiées et rapportés aux taux de MLC correspondant à chaque analyse de Western blot tel que décrit dans la section méthodes. Cinq expériences indépendantes de Western blot furent réalisées pour chaque protéine. Les mesures de l'ARNm et la protéine des trois récepteurs furent effectuées dans les mêmes échantillons. (+P<0.01; *P<0.05; **P<0.005; ***P<0.0005; #P<0.02).

A ITf



B STf

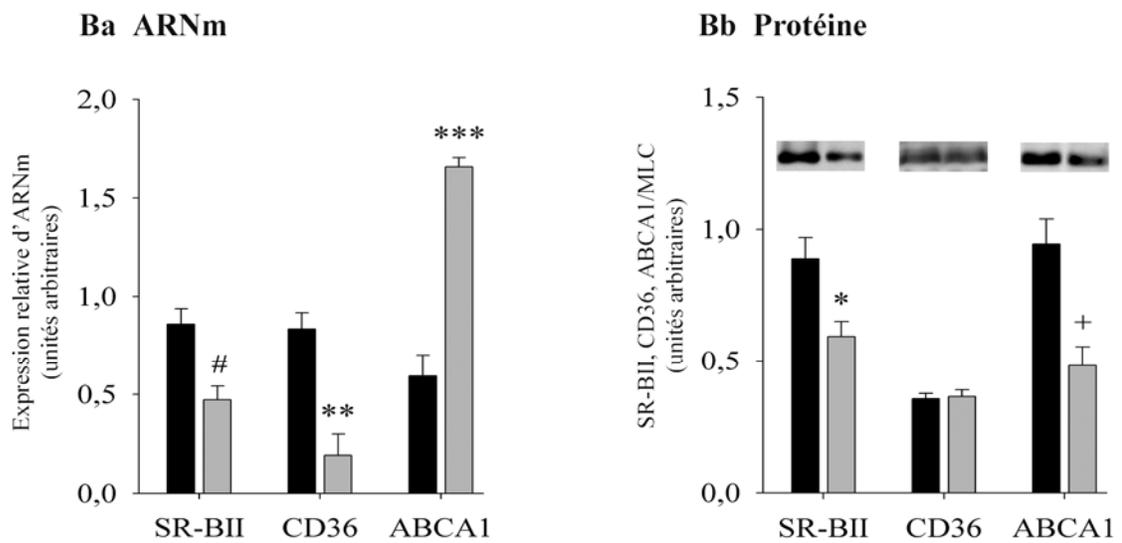


Figure 11

Figure 12: Quantification des taux protéiniques des enzymes dans les ITf et les STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-}

Le taux d'expression protéinique des enzymes HSL, HMG-CoA réd. (HMGR), ACAT1 et ACAT2 fut mesuré par Western blot. Trente µg de protéines d'homogénat d'ITf (A) et de STf (B) de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-} furent analysées. Les bandes immunoréactives obtenues furent numérisées et leur intensité quantifiée par densitométrie. Les valeurs densitométriques obtenues furent ensuite rapportées à celles de MLC correspondantes à chaque analyse. Les résultats représentent la moyenne ± erreur standard de cinq expériences indépendantes. (+P<0.01; ++P<0.001; **P<0.005).

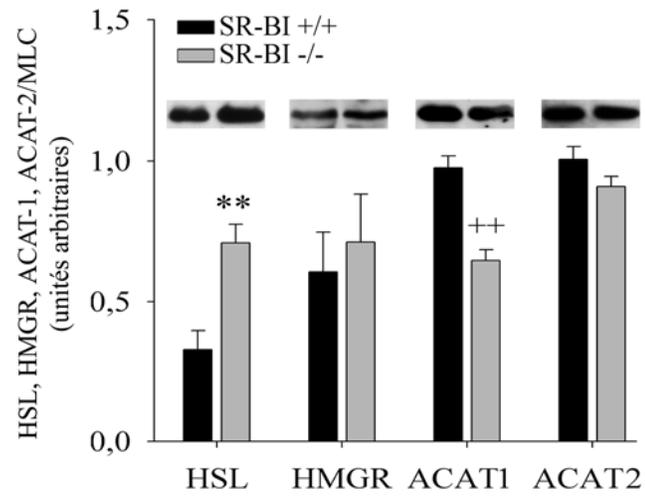
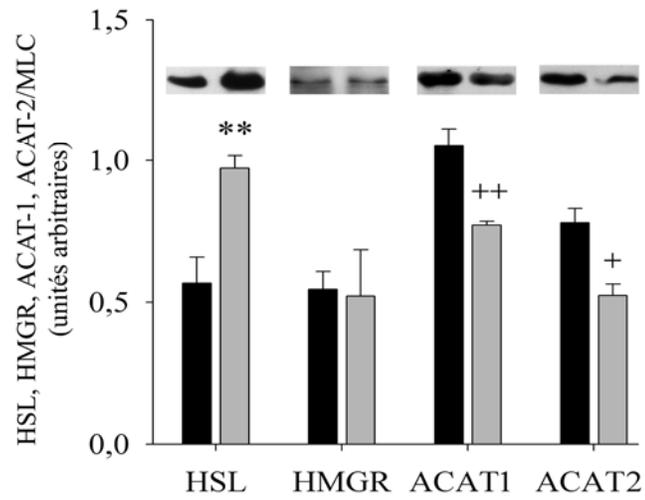
A ITf**B STf****Figure 12**

Figure 13: Cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum de souris SR-BI+/+ et SR-BI/-

Les taux de CL et CE furent mesurés dans les échantillons d'ITf (A), de STf (B) et dans le sérum (C) de souris SR-BI+/+ et SR-BI/-. Les résultats sont exprimés en μg de cholestérol/mg de protéines d'ITf et de STf et en mg de cholestérol/dl de sérum. Six expériences indépendantes furent réalisées dans le cas des STf et quatre dans le cas des ITf et le sérum. (+++P<0.0001; ***P<0.0005; #P<0.02).

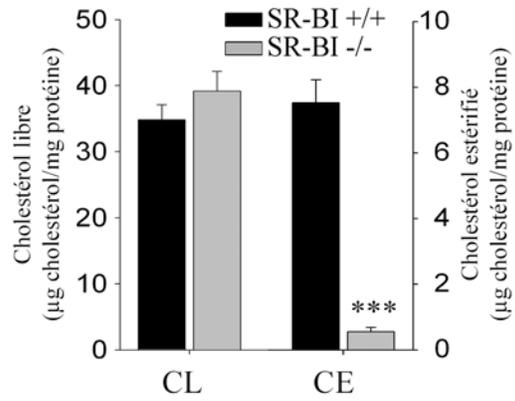
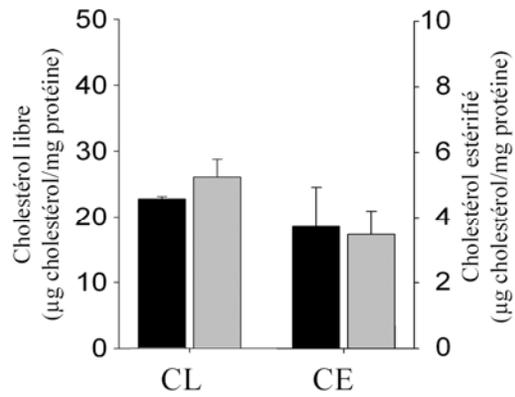
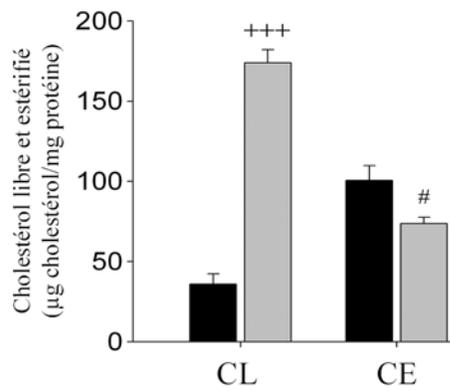
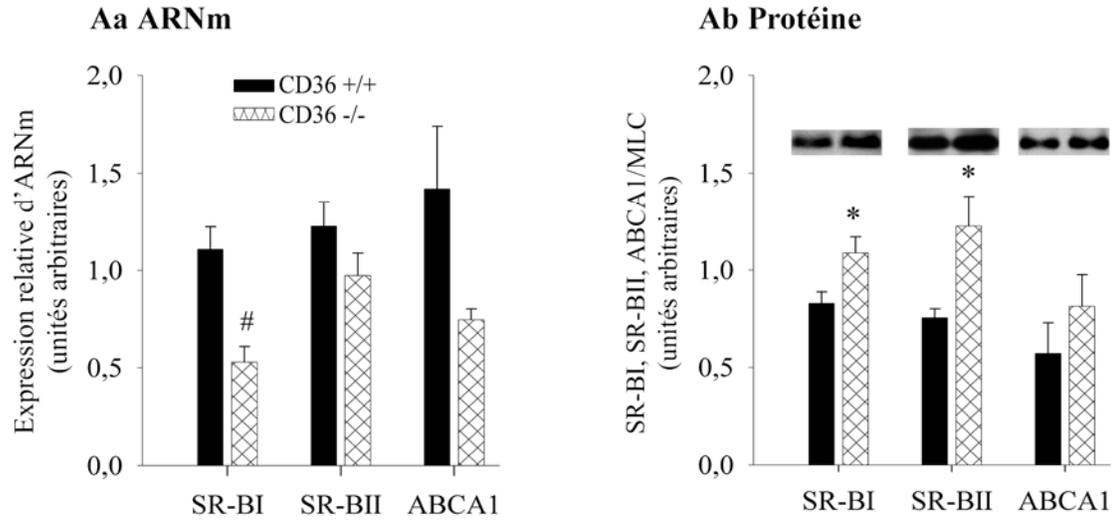
A ITf**B STf****C Sérum****Figure 13**

Figure 14: Quantification de l'ARNm et de la protéine des transporteurs sélectifs de cholestérol dans les ITf et STf de souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-}

Les taux d'expression de l'ARNm de SR-BI, SR-BII et ABCA1, furent mesurés dans les ITf (Aa) et STf (Ba) de souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-} par le PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires sous forme de moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes réalisées à partir d'échantillons différents. L'expression de la protéine de SR-BI, SR-BII et ABCA1 fut quant à elle mesurée par Western blot dans les ITf (Ab) et les STf (Bb). Trente μ g de protéines d'homogénat d'ITf et de STf furent analysées dans chaque cas. Les bandes immunoréactives obtenues furent quantifiées et rapportées au taux de MLC correspondant à chaque analyse de Western blot tel que décrit dans la section méthode. Cinq expériences indépendantes furent réalisées pour chaque protéine et les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard. Les mesures de l'ARNm et la protéine furent effectuées dans les mêmes échantillons. (+P<0.01; +++P<0.0001; *P<0.05; #P<0.02; ##P<0.002).

A ITf



B STf

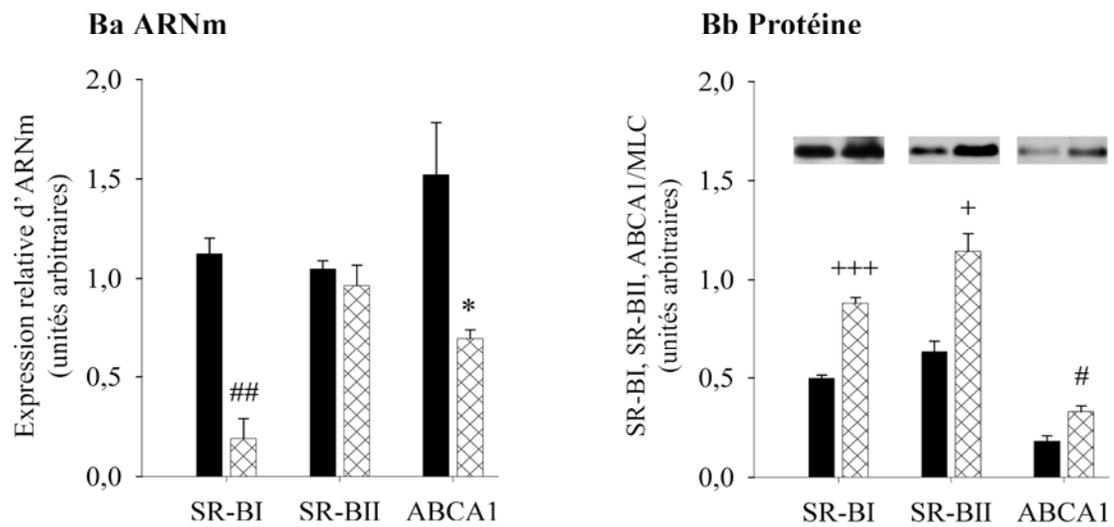
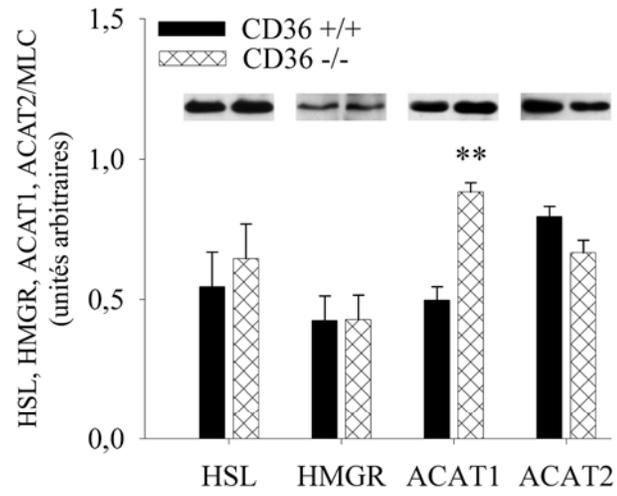


Figure 14

Figure 15: Quantification des taux protéiniques des enzymes dans les ITf et STf de souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-}

Les taux d'expression de la protéine HSL, HMG-CoA réd. (HMGR), ACAT1 et ACAT2 furent mesurés par analyse de Western blot. Trente μ g de protéines totales d'homogénat d'ITf (A) et STf (B) de souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-} furent analysées dans chaque cas. Les bandes immunoréactives furent rapportées à celles de MLC correspondantes à chaque analyse. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires sous forme de moyenne \pm erreur standard de cinq expériences indépendantes. (*P<0.05; **P<0.005; #P<0.02).

A ITf



B STf

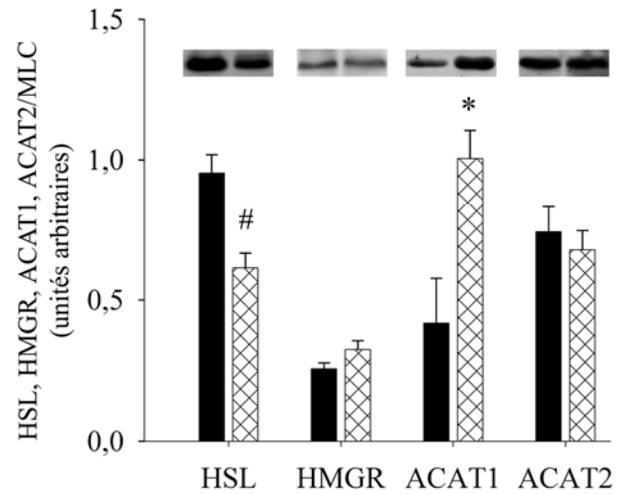


Figure 15

Figure 16: Cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum de souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-}

Le CL et de CE CE contenus dans les échantillons d'ITf (A), de STf (B) et dans le sérum (C) furent mesurés dans les échantillons de cinq groupes différents de souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-}. Les résultats sont exprimés en μg de cholestérol/mg de protéines d'ITf et STf et en mg de cholestérol/dl de sérum sous forme de moyenne \pm erreur standard.

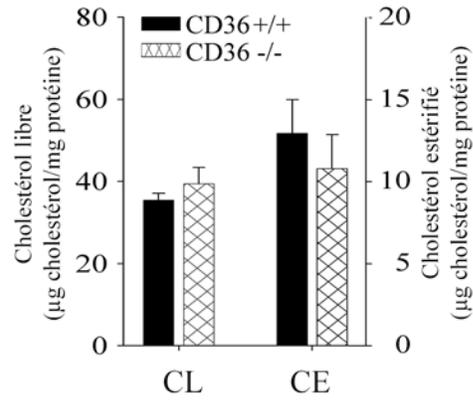
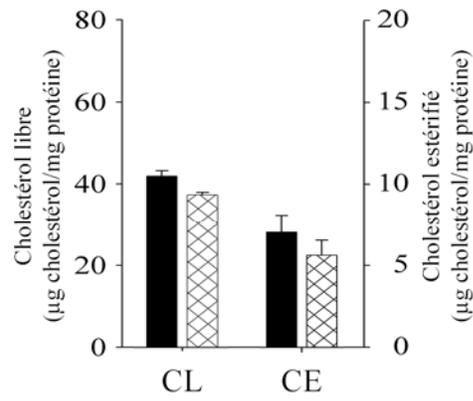
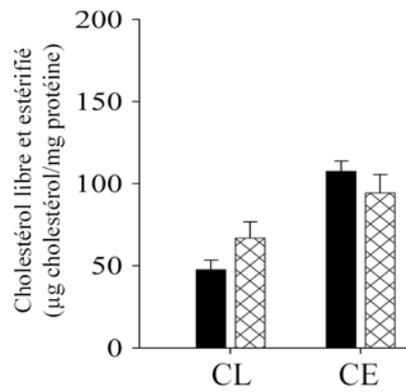
A ITf**B STf****C Sérum****Figure 16**

Figure 17: Quantification de l'ARNm et de la protéine des transporteurs sélectifs de cholestérol dans les ITf et STf de souris HSL+/+ et HSL-/-

Les taux d'expressions de l'ARNm de SR-BI, SR-BII et ABCA1 furent mesurés par le PCR en temps réel dans les ITf (Aa) et STf (Ba) de souris HSL+/+ et HSL-/- . Les résultats montrés sont la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées à partir de trois groupes d'échantillons différents et exprimés en unités arbitraires. La mesure par Western blot du taux d'expression de la protéine SR-BI, SR-BII et ABCA1 fut réalisée dans les mêmes échantillons d'ITf (Ab) et STf (Bb) que ceux utilisés pour la mesure de l'ARNm. L'intensité de la bande immunoréactive de chaque protéine fut rapportée à celle de la MLC correspondante. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes. (++P<0.001; *P<0.05; ***P<0.0005).

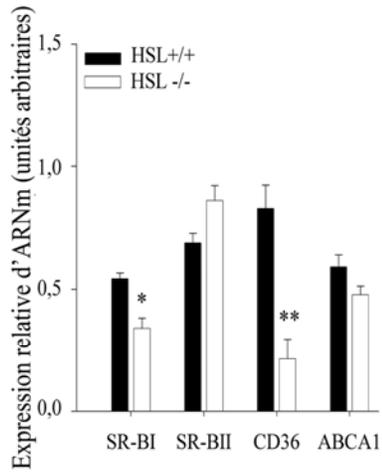
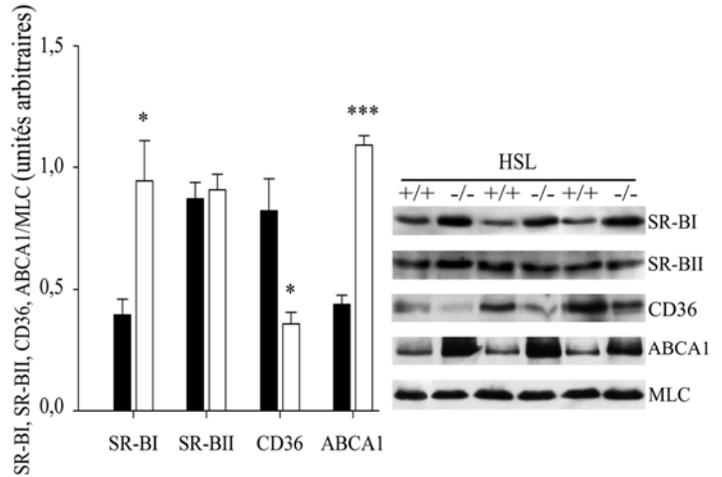
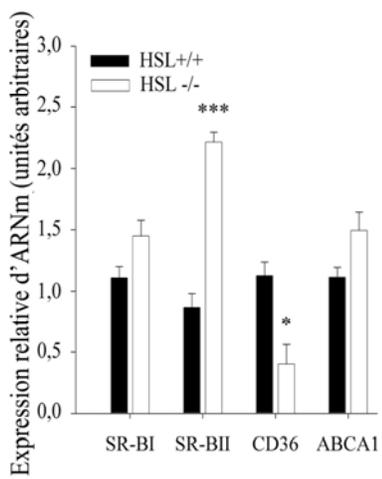
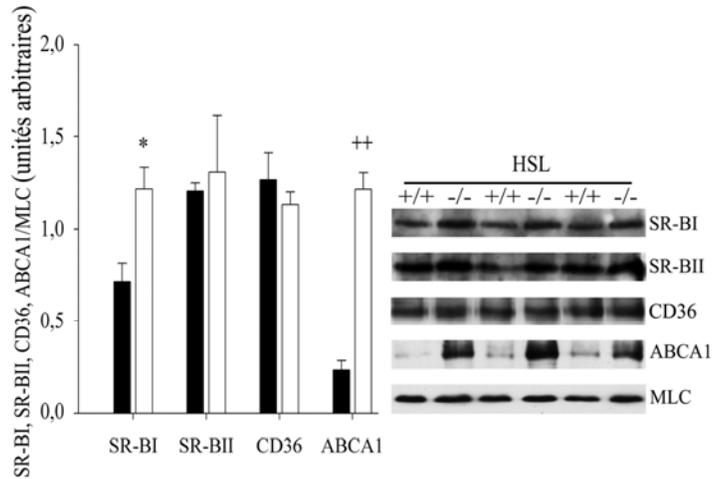
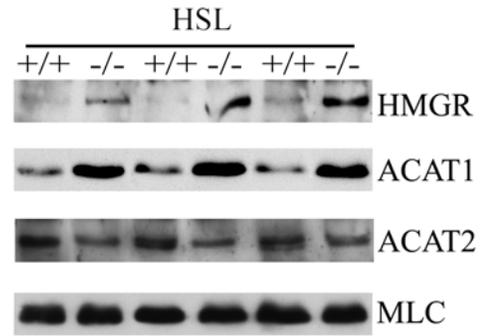
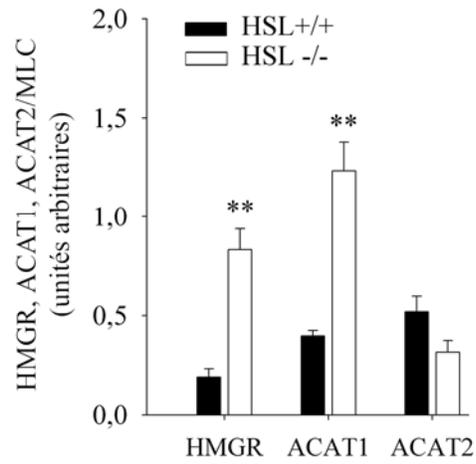
A ITf**Aa ARNm****Ab Protéine****B STF****Ba ARNm****Bb Protéine****Figure 17**

Figure 18: Quantification des taux protéiniques des enzymes dans les ITf et les STf de souris HSL+/+ et HSL-/-

Le taux d'expression de la protéine de la HMG-CoA réd. (HMGR), ACAT1 et ACAT2 fut mesuré par Western blot dans les échantillons d'ITf (A) et STf (B) de souris HSL+/+ et HSL-/. L'intensité de la bande immunoréactive de chaque protéine fut quantifiée et rapportée à celle de la MLC correspondante. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes réalisées à partir d'échantillons différents. (+P<0.01; **P<0.005).

A ITf



B STf

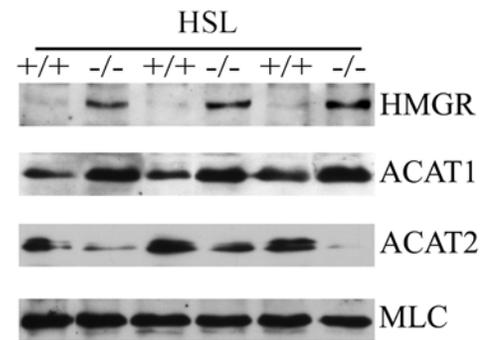
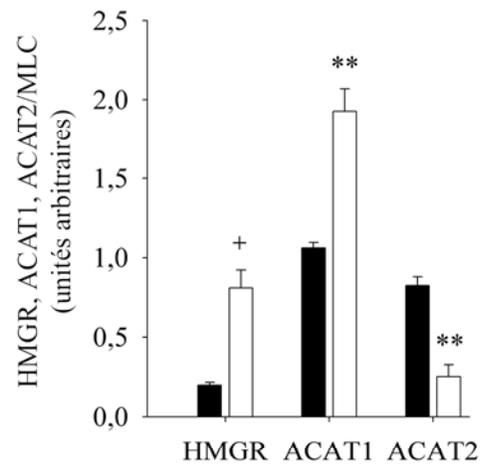


Figure 18

Figure 19: Cholestérol libre et estérifié dans les ITf, les STf et le sérum de souris HSL^{+/+} et HSL^{-/-}

Les taux de CL et CE furent mesurés dans les échantillons d'ITf (A), de STf (B) et dans le sérum (C). Les mesures furent effectuées sur 4 groupes différents de souris HSL^{+/+} et HSL^{-/-}. Les résultats sont exprimés en μg de cholestérol/mg de protéines d'ITf et STf et en mg de cholestérol/dl de sérum. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard. (+P<0.01; ++P<0.001; *P<0.05; **P<0.005; #P<0.02).

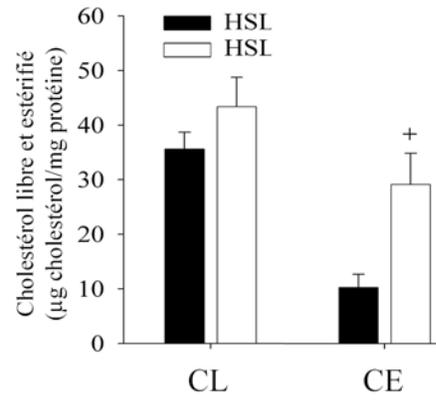
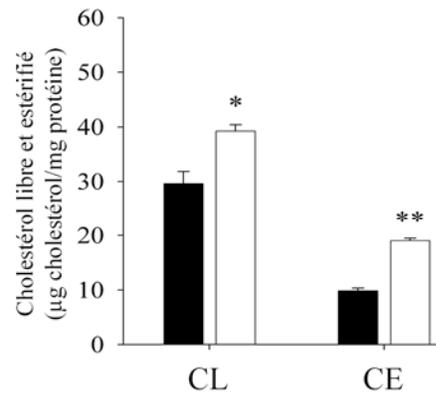
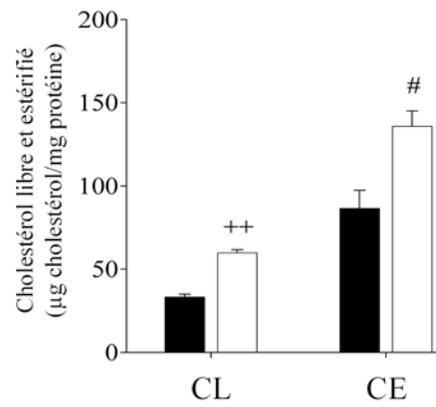
A ITf**B STf****C Sérum****Figure 19**

Figure 20: Quantification des taux protéiniques de CD36 et d'ABCA1 dans les STf de vison normal et orchitique

Les niveaux d'expression de la protéine de CD36 (A) et d'ABCA1 (B) furent mesurés par Western blot à partir de trente μg de protéines d'homogénat de STf de visons normaux et de visons atteints d'orchite autoimmune (AIO) spontané pendant les mois de février (Fév.), mars et juillet (Juil.). Les résultats représentent la moyenne \pm erreur standard de l'intensité des bandes immunoréactives de trois expériences indépendantes effectuées à partir d'échantillons différents. (# $P < 0.02$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$).

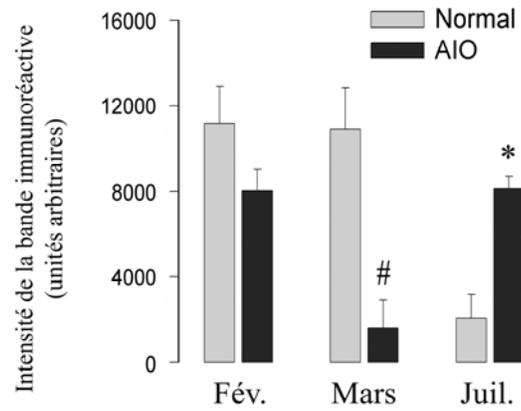
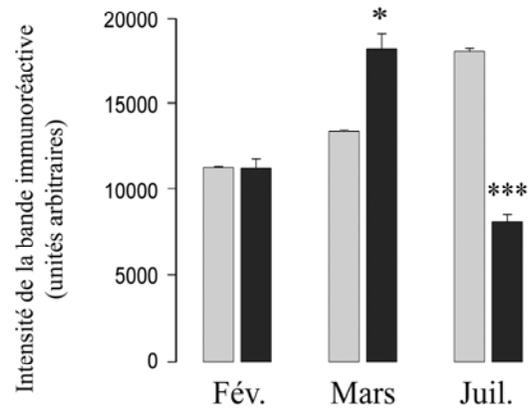
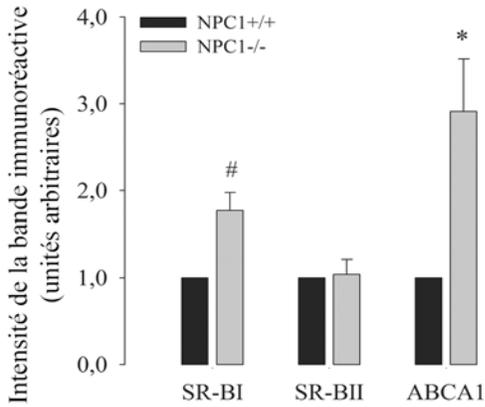
A CD36 dans les STf de visons orchitiques**B ABCA1 dans les STf de visons orchitiques****Figure 20**

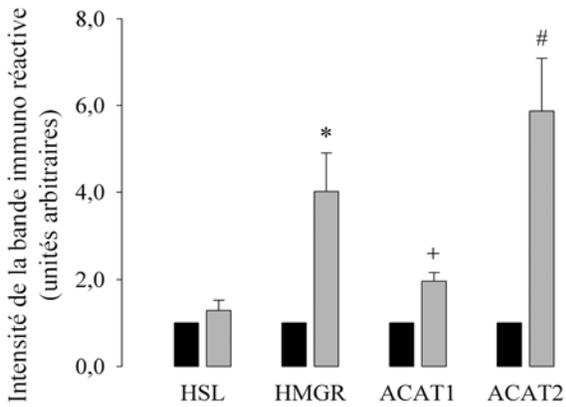
Figure 21: Quantification des taux de protéines des transporteurs sélectifs du cholestérol, des enzymes et de cholestérol libre et estérifié dans les STf de souris NPC1^{+/+} et NPC1^{-/-}

Les taux protéiniques de SR-BI, SR-BII et ABCA1 (A), de la HSL, HMG-CoA réduct. (HGMR), ACAT1 et ACAT2 (B) furent mesurés par Western blot à partir de trente μ g de protéine d'homogénat de STf de souris NPC1^{+/+} et NPC1^{-/-}. La valeur de l'intensité de la bande immunoréactive de chaque protéine mesurée dans les STf de souris NPC1^{-/-} fut divisée par celle mesurée dans les STf de souris NPC1^{+/+}. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires sous forme de moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes effectuées à partir d'échantillons différents. Le taux de CL et CE fut mesuré dans les STf de souris NPC1^{+/+} et NPC1^{-/-} par la technique enzymatique (Wako). Les résultats sont exprimés en μ g de cholestérol/mg de protéines de STf sous forme de moyenne \pm erreur standard de trois mesures indépendantes. (+P<0.01; #P<0.02; *P<0.05; **P<0.005).

A Transporteurs sélectifs dans les STf



B Enzymes dans les STf



C Cholestérol libre et estérifié dans les STf

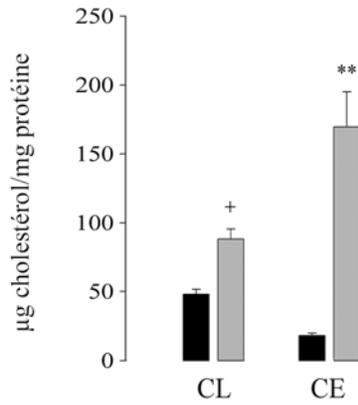


Figure 21

Figure 22: Quantification des taux protéiniques des connexines dans les STf de souris normales durant le développement

Les taux de variation de l'expression de la protéine Cx26, Cx30.2, Cx32, Cx46, Cx50, Pan Cx43, Cx43 phosphorylée en sérine 368 et Cx43 non-phosphorylée en sérine 368 furent mesurés par Western blot à partir vingt μ g de protéines d'homogénat de STf. La valeur de l'intensité de la bande immunoréactive obtenue à chacun des âges fut rapportée à celle de 14 jours au sein de chaque analyse de Western blot. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires sous forme de moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes. (+P<0.01; *P<0.05, **P<0.005, #P<0.02, ##P<0.002).

STf de souris normales

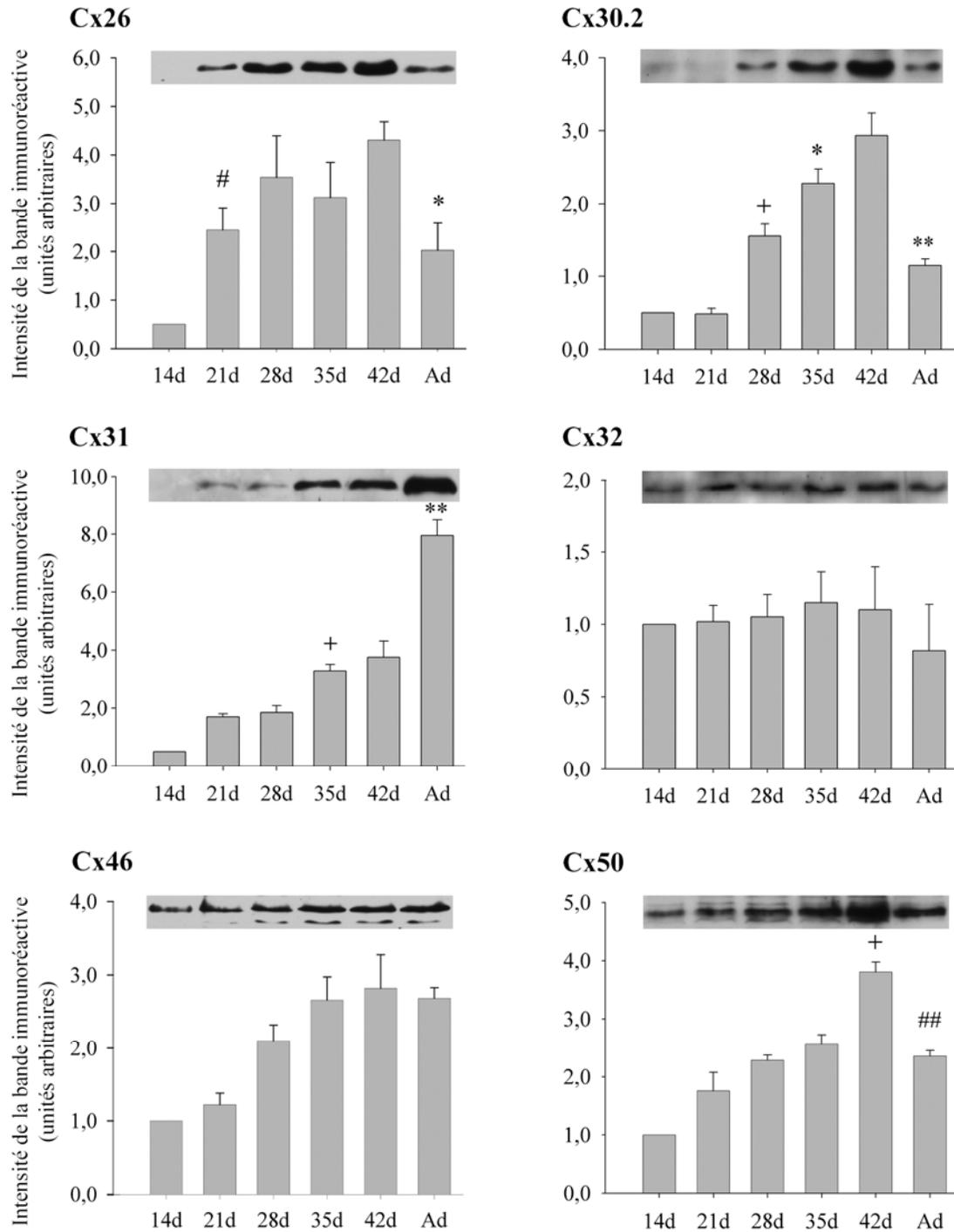


Figure 22

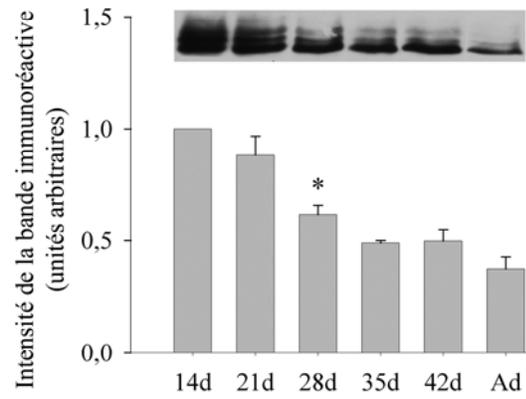
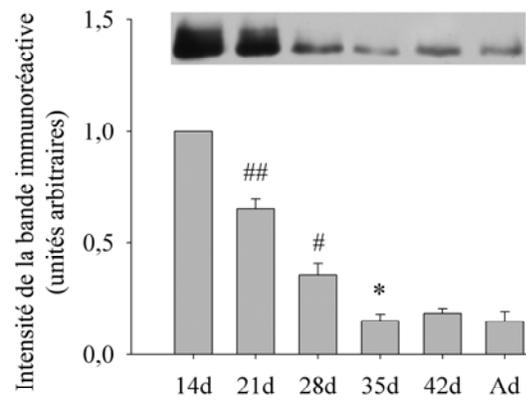
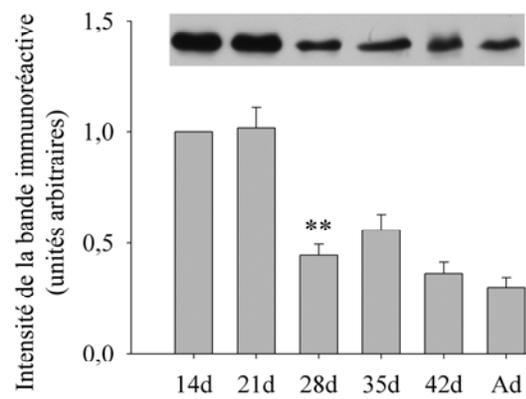
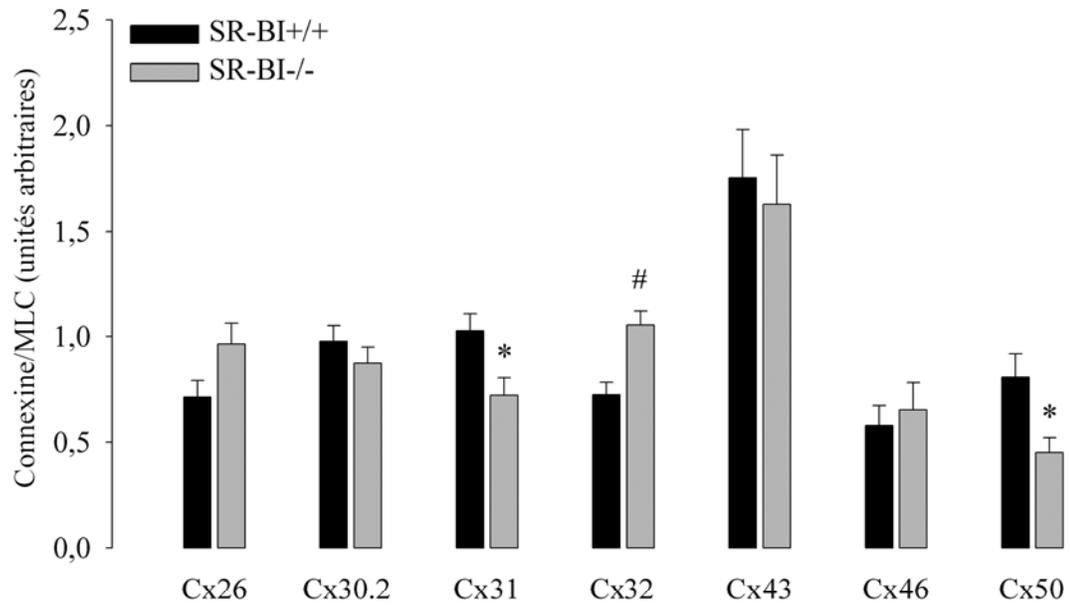
Pan Cx43**Cx43 phosphorylée en sérine 368****Cx43 non-phosphorylée en sérine 368****Figure 22 (suite)**

Figure 23: Quantification des taux protéiniques des connexines dans les STf de souris SR-BI+/+ et SR-BI/-

A) Les taux d'expression protéinique de Cx26, Cx30.2, Cx32, Cx43, Cx46 et Cx50 furent mesurés par Western blot dans les STf de souris SR-BI+/+ et SR-BI/-. Trente μg de protéines d'homogénat de STf furent analysées dans le cas de chaque protéine à l'exception de la Cx43 pour laquelle vingt μg de protéines furent analysées. B) Les taux d'expression de la Cx43 non-phosphorylée en sérine 368 (Cx43 NP) et la de Cx43 phosphorylée en sérine 368 (Cx43 P) furent analysés à partir de vingt μg de protéines d'homogénat de STf. Les résultats sont la moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes exprimée en unités arbitraires. (#P<0.02; *P<0.001; **P<0.005).

A Protéine de connexines dans les STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-}



B Protéine de Cx43 non-phosphorylée en sérine 368 et phosphorylée en sérine 368 dans les STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-}

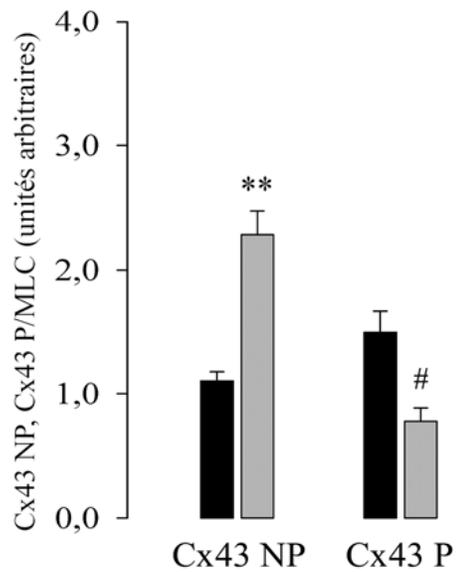
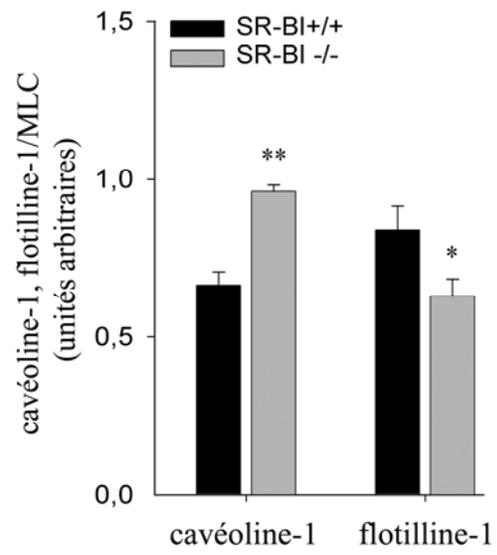


Figure 23

Figure 24: Quantification des taux protéiniques de cavéoline-1 et de flotilline-1 dans les STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-}

Le taux d'expression des protéines cavéoline-1 et flotilline-1 fut mesuré par analyses de Western blot dans les échantillons de STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-}. Les résultats montrés sont la moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes. (*P<0.05; **P<0.005).

Protéine cavéoline-1 et flotilline-1**Figure 24**

5. DISCUSSION

5.1 Caractérisation des fractions enrichies en tissu interstitiel (ITf) et en tubules séminifères (STf)

Pour mettre le métabolisme du cholestérol en relation avec les fonctions propres à chaque compartiment du testicule, nous avons séparé les tubules séminifères du tissu interstitiel. Christensen et Mason (1965) avaient développé une technique d'isolation de fractions de tissu interstitiel et de tubules séminifères de grande pureté (Christensen et Mason, 1965). Cependant, leur approche requiert des temps considérables et fournit trop peu de matériel pour satisfaire à nos besoins. C'est pourquoi notre laboratoire avait développé une autre technique basée sur l'utilisation d'enzymes digestives (Pelletier et coll., 1999b) dont le rendement était bon. Cependant, cette approche avait le désavantage de mal préserver l'intégrité des protéines dans les échantillons (Akpovi et Pelletier, 2009). Pour palier à ce problème, nous avons mis au point une nouvelle approche qui représente une amélioration de la technique de Christensen et Mason (1965) et de celle de Pelletier et collègues (1999) et qui fournit un rendement quantitatif supérieur et une meilleure préservation de l'intégrité des protéines (Akpovi et Pelletier, 2009). La caractérisation microscopique des fractions enrichies en tubules séminifères (STf) que nous avons générées a montré que celles-ci étaient d'une pureté comparable à celle rapportée par Christensen et Mason (1965). Nous avons montré que l'utilisation d'enzymes digestives durant la préparation des fractions tissulaires altérait l'intégrité des protéines et ne permettait pas la détection par Western blot de toutes les formes phosphorylées de la Cx43 (Akpovi et Pelletier, 2009).

5.2 Étude des transporteurs sélectifs de cholestérol chez les souris normales durant le développement postnatal

5.2.1 SR-BI et SR-BII

5.2.1.1 Validation des analyses de Western blot et de PCR

Acton et collègues (1994) avaient rapporté que SR-BI et SR-BII étaient deux glycoprotéines transmembranaires isoformes provenant de l'épissage alternatif d'un même ARN natif. Ils avaient aussi rapporté que SR-BI et SR-BII ont un poids moléculaire non glycosylé de 57 kDa et sont exprimés dans la membrane plasmique sous forme glycosylée de 82-85 kDa (Acton et coll., 1996) ou de dimère de 164 kDa (Reaven et coll., 2004). Nous avons montré par PCR en temps réel que l'ARNm de SR-BI était exprimé dans les fractions enrichies en tissu interstitiel et en tubules de souris sauvages mais qu'il était absent chez les souris SR-BI^{-/-}. Par analyse de Western blot, nous avons détecté cinq bandes immunoréactives de 40-, 45-, 85-, 104- et 225- kDa de SR-BI dans les fractions de tissu interstitiel et de tubules de souris sauvages. Cependant, à l'exception de la bande immunoréactive de 85 kDa, toutes les autres bandes étaient aussi détectées chez les souris SR-BI^{-/-}. Ce résultat contraste avec les travaux de Reaven et collègues (2004) qui avaient rapporté la présence de dimères de SR-BI de 164 kDa dans le testicule de souris.

Nous avons détecté l'ARNm de SR-BII chez les souris SR-BI^{+/+} et les souris SR-BI^{-/-}. Par contre, le taux d'expression de l'ARNm de SR-BII était significativement plus faible dans les échantillons de souris SR-BI^{-/-} comparé aux souris SR-BI^{+/+}. Toutes les bandes immunoréactives de SR-BII que nous avons détectées dans les fractions tissulaires de souris SR-BI^{+/+} l'étaient aussi chez les souris SR-BI^{-/-}. Cependant, l'intensité de la

bande immunoréactive de 85 kDa de SR-BII était significativement réduite chez les souris SR-BI^{-/-} comparée aux souris SR-BI^{+/+}. Webb et collègues (1998) avaient rapporté que l'insertion du gène de SR-BII dans le génome des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) induisait l'expression de la forme glycosylée de 85 kDa de SR-BII. C'est pourquoi nous avons conclu que la bande de 85 kDa correspondait à la protéine de SR-BII et que seule la forme monomère glycosylée de SR-BII était détectée par Western blot dans les fractions tissulaires de souris.

En montrant que l'ARNm et la protéine de SR-BII étaient exprimés dans les fractions tissulaires de souris SR-BI^{-/-}, nos résultats remettent en question la notion généralement admise que SR-BI et SR-BII sont des produits de l'épissage alternatif d'un même gène (Webb et coll., 1997; Zhang et coll., 2007). Nos résultats suggèrent au contraire que SR-BI et SR-BII sont des produits de deux gènes différents. C'est pourquoi nous prévoyons de faire le séquençage génétique du produit de SR-BII afin de clarifier cette question.

5.2.1.2 Expression tissulaire de SR-BI et SR-BII

L'expression des protéines SR-BI et SR-BII étaient significativement plus élevée dans les fractions de tissu interstitiel et de tubules séminifères et dans le foie que dans le rein, le cerveau, le cœur et l'hypophyse antérieure. Le testicule et le foie effectuent la captation sélective de cholestérol dérivé des HDL (Glass et coll., 1983; Glass et coll., 1985) et nos résultats supportent la notion que SR-BI et SR-BII sont impliqués dans ce processus dans le testicule (Acton et coll., 1996; Trigatti et coll., 2000a; Eckhardt et coll., 2004).

5.2.1.3 Expression de SR-BI et SR-BII et variation du taux de cholestérol dans les ITf et les STf au cours du développement postnatal

Nous avons mesuré l'expression (ARNm et protéine) de SR-BI et SR-BII que nous avons comparée aux taux de variation du CL et de CE dans les fractions de tissu interstitiel et de tubules séminifères durant le développement postnatal. Nos résultats ont montré que l'expression de l'ARNm de SR-BI augmentait à 35 jours après la naissance jusqu'à l'âge adulte et la protéine augmentait au 28^{ième} jour dans les fractions enrichies en tissu interstitiel (ITf). Dans les fractions tubulaires (STf), l'expression de l'ARNm de SR-BI augmentait à 35 jours après la naissance puis diminuait à 42 jours jusqu'à l'âge adulte; la protéine SR-BI augmentait à 28 jours et diminuait chez l'adulte. Cette différence entre les ITf et les STf de souris adultes démontre que nos fractions enrichies étaient bien représentatives des deux compartiments cellulaires et que l'ARNm et la protéine de SR-BI variaient de façon différente dans les deux compartiments suggérant une action différente.

Jeyaraj et collègues (2005) avaient rapporté que le taux intratesticulaire de testostérone augmentait au cours du développement chez la souris et atteignait son niveau maximal à 30 jours. Environ 40% du cholestérol utilisé pour la synthèse de la testostérone dans le tissu interstitiel est importé du sang à partir des HDL et des LDL (Gwynne et Strauss, 1982; Benahmed et coll., 1983). En montrant que le taux protéinique de SR-BI était maximal à 28 jours et en tenant compte du fait que SR-BI est le récepteur préférentiel des HDL (Acton et coll., 1996; Xu et coll., 1997), nos résultats suggèrent que SR-BI contribue à la prise du cholestérol sanguin dans le tissu interstitiel. Cette interprétation concorde avec nos résultats d'immuno-histochimie qui révélaient une forte expression de SR-BI dans la membrane plasmique des cellules du tissu interstitiel. Reaven et collègues

(2000) ont rapporté que les cellules de Leydig ont la capacité de convertir directement le cholestérol importé par l'entremise de SR-BI en testostérone au lieu de le mettre en réserve. Ceci pourrait expliquer pourquoi nos résultats ont montré que le taux de CL et CE ne variait pas de façon significative dans les fractions de tissu interstitiel malgré l'augmentation de l'expression de SR-BI au cours du développement.

Les cellules de Sertoli pourraient dépendre du cholestérol sanguin (Fofana et coll., 2000) et de celui obtenu de la phagocytose des cellules germinales apoptotique et des corps résiduels. Nous avons examiné la possibilité que SR-BI et/ou SR-BII fussent associés au transport sélectif de cholestérol sanguin dans les tubules séminifères au-delà de la barrière hémato-testiculaire. Nous avons montré que l'augmentation du taux protéinique de SR-BI à 28 jours puis à 35 jours coïncidait avec l'élévation du taux de CE dans les fractions tubulaires. Considérant que le cholestérol sanguin entre dans les tubules séminifères sous forme de HDL (Maboundou et coll., 1995; Fofana et coll., 2000) et que SR-BI est le récepteur préférentiel des ces lipoprotéines (Krieger, 1999), nos résultats suggèrent que SR-BI contribue au processus d'importation du cholestérol dans les tubules séminifères.

Durant le développement chez la souris, la première vague de la spermatogenèse est complétée aux environs de 35 jours au moment où le taux le plus élevé de cellules germinales en apoptose a été rapporté (Jeyaraj et coll., 2003). SR-BI a été associé à la phagocytose des cellules germinales apoptotiques par la cellule de Sertoli (Shiratsuchi et coll., 1997; Nakagawa et coll., 2005). Ceci suggère que l'augmentation du taux de CE que nous avons mesurée à 35 jours est le résultat de la captation par SR-BI de cholestérol sanguin dans les tubules et/ou de la phagocytose des cellules germinales en apoptose par les cellules de Sertoli.

Contrairement à SR-BI, le taux d'expression de l'ARNm et la protéine de SR-BII ne variaient pas de façon significative durant le développement dans les deux compartiments cellulaires du testicule. Cela contraste avec les résultats que nous avons rapportés chez les visons chez lesquels l'expression maximale de la protéine SR-BII coïncidait avec la complétion du développement dans les fractions de tissu interstitiel et de tubules séminifères (Akpovi et coll., 2006) et suggère que SR-BII est peu associé au transport du cholestérol dans le testicule de souris normales.

5.2.2 CD36

5.2.2.1 Validation des analyses de Western blot et de PCR

Nous avons montré, par le PCR en temps réel et le PCR semi-quantitatif, que l'ARNm de CD36 était exprimé dans les fractions de tubules séminifères de souris CD36^{+/+} mais pas chez les souris CD36^{-/-}. Ce résultat confirme que les souris CD36^{-/-} que nous avons utilisées étaient effectivement déficientes en CD36. Nos résultats montrent que seul le monomère glycosylé de CD36 était détecté par Western blot dans les fractions de tissu interstitiel et de tubules séminifères de souris. Cela contraste avec le rapport de quatre à cinq bandes immunoréactives de 52- à 121 kDa de CD36 dans le testicule (Arenas et coll., 2004; Gillot et coll., 2005). Contrairement à nous, les études précitées n'ont pas fait de contrôles négatifs. En utilisant les échantillons de souris CD36^{-/-}, nous avons montré que les bandes immunoréactives que ces auteurs avaient attribuées à CD36 étaient détectées chez les souris CD36^{-/-} qui n'exprimaient pas l'ARNm de CD36.

5.2.2.2 Expression de CD36 et variation du taux de cholestérol dans les ITf et les STf au cours du développement postnatal

L'ARNm et la protéine de CD36 chutait chez l'adulte après avoir atteint leur maximum à 42 jours dans les fractions de tissu interstitiel alors que dans les fractions tubulaires, le niveau d'expression de l'ARNm et la protéine de CD36 était bas durant le développement mais augmentait chez l'adulte. Cette différence n'aurait pu être observée si les analyses étaient réalisées dans des homogénats de testicules entiers comme c'était fait ailleurs (Zibara et coll., 2002; Arenas et coll., 2004). Nos résultats suggèrent que CD36 est associé à deux fonctions différentes dans les deux compartiments cellulaires du testicule.

L'expression de CD36 a été rapportée dans les macrophages (Nicholson et coll., 1995; Han et coll., 1997) où il médie l'endocytose des LDL d'origine sanguine (Endemann et coll., 1993). Nous avons localisé CD36 dans les cellules du tissu interstitiel par immunohistochimie et nos résultats de Western blot et de PCR en temps réel ont montré que l'expression de l'ARNm et la protéine de CD36 augmentaient de façon concomitante durant le développement. Le profil de variation de l'expression de CD36 est semblable à celui de la testostérone (Jeyaraj et coll., 2005). C'est pourquoi nous suggérons que CD36 contribue à la captation du cholestérol sanguin utilisé pour la synthèse de la testostérone dans le tissu interstitiel.

Dans les fractions tubulaires, l'augmentation de CD36 (ARNm et protéine) à 42 jours et chez l'adulte coïncidait avec la période où les spermatides allongées étaient en plus grand nombre dans les tubules. Cela suggère que CD36 était abondant dans les spermatides allongées et/ou que son expression dépendait à la présence des spermatides dans les tubules séminifères. Nos analyses immuno-histochimiques ont révélé des traces de CD36 dans les

spermatides contrairement aux cellules de Sertoli dans lesquelles le produit de réaction était abondant. Gillot et collègues (2005) avaient rapporté que les cellules germinales induisaient l'expression de CD36 à la surface des cellules de Sertoli. Nos résultats ne supportent pas cette hypothèse parce que bien qu'il existe de cellules germinales dans les tubules de souris de 14-, 21-, 28- et 35 jours, nous n'avons détecté que des traces de la protéine de CD36 dans les fractions tubulaires. Nos résultats ont montré que le maximum de l'expression de CD36 coïncidait avec la période où la proportion des corps résiduels était le plus élevé dans les tubules séminifères au cours du développement postnatal. Cela suggère que ce sont les corps qui induisent l'expression de CD36 dans les cellules de Sertoli et non les cellules germinales. Cette interprétation soutient la notion que CD36 médie la phagocytose par la cellule de Sertoli des corps résiduels (Gillot et coll., 2005).

5.2.3 ABCA1

5.2.3.1 Validation des analyses de Western blot et de PCR

Nous avons détecté l'ARNm et une bande immunoréactive de 240 kDa de l'ABCA1 dans les fractions de tissu interstitiel et de tubules séminifères de souris. Wellington et collègues (2002) ont rapporté l'expression de l'ARNm et la protéine de l'ABCA1 dans le testicule de souris, mais contrairement à nous, leurs travaux avaient été réalisés sur des homogénats de testicule entier.

Nous n'avons pu valider les analyses de Western de l'ABCA1 parce que nos efforts pour l'obtention de souris génétiquement déficientes en ABCA1 n'ont pu encore aboutir. Toutefois, à l'opposé de SR-BI et CD36, l'anticorps anti-ABCA1 que nous avons

utilisé a détecté une bande immunoréactive unique de 240 kDa dans les fractions enrichies. En attendant de confirmer ce résultat, nous avons considéré cette bande dans nos quantifications.

5.2.3.2 Expression de l'ABCA1 et variation du taux de cholestérol dans les ITf et les STf au cours du développement postnatal

L'ABCA1 effectue l'efflux de l'excès du CL intracellulaire (Selva et coll., 2004; Cavelier et coll., 2006) qui est ensuite acheminé au foie par transport inverse et une augmentation intracellulaire du cholestérol accroît l'expression de l'ABCA1 (Costet et coll., 2000). Nous avons montré que le CL et de CE tout comme l'ARNm et la protéine de l'ABCA1 ne variaient pas de façon significative dans les fractions de tissu interstitiel au cours du développement. Cela suggère que les cellules du tissu interstitiel exportent moins de cholestérol vers le sang au cours du développement postnatal.

Dans les fractions tubulaires, l'expression de l'ARNm de l'ABCA1 variait peu tandis que celle de la protéine tendaient à l'augmentation au cours du développement. Chez l'adulte, le niveau de l'ARNm piquait alors que celui de la protéine baissait significativement. Nos résultats concordent avec les travaux de Willington et collègues (2002) qui ont rapporté que le taux protéinique de l'ABCA1 était bas tandis que celui de l'ARNm était élevé dans les homogénats de testicules entiers de souris adultes.

Selva et collègues (2004) ont démontré 1) que les cellules de Sertoli de souris ABCA1^{-/-} effectuaient moins d'efflux du CL vers l'Apo AI que celles de souris ABCA1^{+/+}, 2) que l'induction de l'expression de l'ABCA1 exogène restaurait l'efflux du CL et 3) que le taux de gouttelettes lipidiques était anormalement élevé dans les tubules

séminifères de souris ABCA1^{-/-} (Selva et coll., 2004). Nous avons montré que le taux d'expression de la protéine ABCA1 dans les fractions tubulaires était élevé au moment où le taux de CE était élevé et bas au moment où le taux de CE était bas. Nos résultats soutiennent les travaux de Selva et collègues (2004) et suggèrent que l'ABCA1 était associé à l'efflux du cholestérol dans les tubules séminifères.

5.3 Étude de compensation chez les souris génétiquement déficientes en SR-BI, CD36 et HSL

5.3.1 Souris SR-BI^{-/-}

5.3.1.1 ITf

Nous avons montré que la suppression génétique de SR-BI était accompagnée d'une réduction significative du taux de CE dans les fractions de tissu interstitiel. De plus, nos résultats ont montré que la suppression génétique de SR-BI était compensée par les transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BII, CD36 et ABCA1: 1) l'ARNm et la protéine de SR-BII étaient réduits chez les souris SR-BI^{-/-} que chez les souris SR-BI^{+/+}, 2) le niveau de l'ARNm de CD36 était réduit tandis que celui de la protéine était augmenté chez les souris SR-BI^{-/-} comparé aux souris SR-BI^{+/+} et 3) l'ARNm de l'ABCA1 était augmenté tandis que la protéine baissait chez les souris SR-BI^{-/-} comparé aux souris SR-BI^{+/+}. Ces résultats supportent notre hypothèse que SR-BI contribue au transport du cholestérol dans le tissu interstitiel.

SR-BII (Mulcahy et coll., 2004) et ABCA1 (Wang et coll., 2007) effectuent l'efflux du cholestérol alors que CD36 médie l'influx du cholestérol dérivé des LDL

sanguines (Nicholson et coll., 1995; Podrez et coll., 2000) dans les macrophages. Les macrophages représentent la deuxième plus importante population de cellules dans le tissu interstitiel chez les rongeurs adultes (Niemi et coll., 1986; Vergouwen et coll., 1991). Les macrophages testiculaires synthétisent le 25-hydroxy-cholestérol à partir du CL qui est transformé en testostérone par les cellules de Leydig (Lukyanenko et coll., 2001) et l'élimination expérimentale ou génétique des macrophages dans le testicule causait une baisse de la production de la testostérone et une hypofertilité (Bergh et coll., 1993; Cohen et coll., 1996). La réduction du taux protéinique de SR-BII et ABCA1 et l'augmentation de celui de CD36 dans les fractions de tissu interstitiel de souris SR-BI^{-/-} reflètent respectivement une baisse de l'efflux du CL intracellulaire et un accroissement de la captation du cholestérol dérivé des LDL sanguines dans les macrophages (Nakata et coll., 1999; Mulcahy et coll., 2004; Wang et coll., 2007). Cette interprétation est soutenue par les travaux de Luangrath et collègues (2008) qui ont rapporté que la captation sélective de cholestérol dérivé des LDL sanguines par le CD36 était augmentée dans les macrophages de souris SR-BI^{-/-} (Luangrath et coll., 2008). Nos résultats suggèrent que la suppression génétique de SR-BI limitait l'entrée du cholestérol dérivé des HDL sanguines dans les cellules du tissu interstitiel, notamment les macrophages, d'où la chute du taux intra-interstitiel du CE. Cette baisse du taux de cholestérol entraînait une réduction de l'efflux du cholestérol et une augmentation de la captation de cholestérol dérivé des LDL sanguines d'où respectivement la baisse des taux protéiniques de SR-BII et ABCA1 et l'augmentation du taux protéinique de CD36.

Nous avons aussi montré que la suppression génétique de SR-BI induisait une surexpression de la protéine HSL qui hydrolyse le CE (Yeaman, 1990; Kabbaj et coll.,

2003) et une réduction de celle de l'ACAT1 qui estérifie le CL (Chang et coll., 1997). L'augmentation du taux protéinique de la HSL et la baisse du celui de l'ACAT1 reflétaient la baisse du niveau de CE que nous avons observée dans les fractions de tissu interstitiel.

Ensemble, nos résultats montrent que la suppression génétique de SR-BI résulte en un ajustement des niveaux d'expression (ARNm et protéine) des transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BII, CD36 et ABCA1 et des enzymes HSL et ACAT1 qui pourrait constituer un mécanisme de compensation servant à maintenir le taux de CL dans le tissu interstitiel aux mêmes niveaux que chez les souris SR-BI+/+.

5.3.1.1 STf

Le fait que les souris mâles SR-BI/- soient fertiles, suggère l'existence de mécanismes compensatoires dans les tubules séminifères, car nos résultats ont montré que les taux de CL et de CE n'étaient pas modifiés chez les souris SR-BI/-. A notre connaissance, aucune étude n'a examiné jusqu'à ce jour l'existence de tels mécanismes de compensation.

Les tubules séminifères importent du cholestérol dérivé des HDL du sang (Maboundou et coll., 1995; Fofana et coll., 2000). Nous avons montré que la suppression génétique de SR-BI était accompagnée 1) d'une réduction de l'ARNm et la protéine de SR-BII, 2) d'une augmentation de l'ARNm et une baisse du taux protéinique de l'ABCA1 et 3) d'une réduction de l'ARNm et le maintien du taux protéinique de CD36 comparé aux souris SR-BI+/+.

SR-BII et ABCA1 effectuent l'efflux du CL intracellulaire (Mulcahy et coll., 2004; Selva et coll., 2004). Le fait que le taux protéinique des deux récepteurs était diminué dans les fractions tubulaires de souris SR-BI^{-/-} comparé aux souris SR-BI^{+/+} suggère que l'efflux du cholestérol était réduit dans les tubules séminifères de souris SR-BI^{-/-}. Nos résultats ont aussi montré que le taux protéinique de l'ACAT1 et l'ACAT2 était réduit chez les souris SR-BI^{-/-} tandis que celui de la HSL était augmenté. Cela signifie une réduction de l'estérification du CL et une augmentation de l'hydrolyse de CE. Nos résultats suggèrent que la suppression génétique de SR-BI limitait l'entrée du cholestérol d'origine sanguine dans les tubules. Cependant, ces résultats n'ont pu être corroborés par les résultats du dosage du cholestérol dans les fractions tubulaires. En effet, le taux de CL et de CE étaient semblables dans les STf de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-}.

5.3.2 Souris CD36^{-/-}

5.3.2.1 ITf

Nous avons montré que la suppression génétique de CD36 était accompagnée par une diminution de l'ARNm et par une augmentation du taux protéinique de SR-BI et SR-BII dans les fractions de tissu interstitiel. Ces résultats suggèrent que 1) la suppression génétique de CD36 favorise la stabilisation des protéines SR-BI et SR-BII et 2) que SR-BI et SR-BII compensent la suppression de CD36 dans le tissu interstitiel. SR-BI et SR-BII sont des récepteurs des lipoprotéines riches en Apo A et en Apo E comme les HDL (Acton et coll., 1996; Li et coll., 2002; Eckhardt et coll., 2004). Cela suggère que la suppression génétique de CD36 favorise l'entrée sélective du cholestérol sanguin dérivé des HDL dans

le tissu interstitiel. Zibara et collègues (2002) ont rapporté que CD36 contribuait au transport du cholestérol dans le testicule parce que la suppression génétique de l'Apo E entraînait une augmentation de l'expression de l'ARNm de la protéine de CD36 dans le testicule. Nos résultats soutiennent ceux de Zibara et collègues (2002) et suggèrent que CD36, SR-BI et SR-BII contribuent au transport sélectif du cholestérol sanguin dans le tissu interstitiel.

5.3.2.2 STf

Gillot et collègues (2005) ont conclu que CD36 servait de récepteur pour la phagocytose des corps résiduels par la cellule de Sertoli. Cependant, les souris mâles CD36^{-/-} sont fertiles (Febbraio et coll., 1999). Nos résultats montrent que le taux de CL et de CE dans les fractions de tubules séminifères n'était pas significativement modifiés chez les souris CD36^{-/-}. Cela suggère qu'il existe d'autres récepteurs capables de compenser la suppression de CD36. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré l'expression de l'ARNm et la protéine de SR-BI, SR-BII et ABCA1 qui sont des multiligands également impliqués dans la phagocytose de cellules apoptotiques (Kawasaki et coll., 2002; Grau et Chimini, 2005). Nos résultats ont montré que le taux protéinique des trois récepteurs était augmenté chez les souris CD36^{-/-} bien que l'expression d'ARNm de SR-BI et ABCA1 était abaissée et celle de SR-BII était inchangée. Cela suggère que la suppression de CD36 était compensée par une surexpression de SR-BI, SR-BII et ABCA1 dans les tubules séminifères.

5.3.3 Souris HSL^{-/-}

5.3.3.1 ITf

Osuga et collègues (2000) ont rapporté que le taux de la testostérone sérique était inchangé chez les souris mâles HSL^{-/-} malgré le fait qu'elles étaient stériles.

Nous avons montré le taux de CL et de CE étaient augmentés dans le sérum de souris HSL^{-/-}. Fernandez et collègues (2008) ont rapporté des résultats semblables dans le sérum de souris femelles HSL^{-/-}. La suppression génétique de la HSL baisse le taux sanguin des VLDL et augmente le taux du CE dans les HDL sanguines (Haemmerle et coll., 2002; Fernandez et coll., 2008). A la lumière de cette information et sachant que le cholestérol utilisé pour la synthèse de la testostérone dans le tissu interstitiel provient en partie du sang (Gwynne et Strauss, 1982; Benahmed et coll., 1983), il était prévisible que le métabolisme du cholestérol serait affecté dans le tissu interstitiel de souris HSL^{-/-}.

Nous avons montré que les niveaux d'ARNm de SR-BI et ABCA1 étaient plus faibles dans le tissu interstitiel de souris HSL^{-/-} comparé à celui de souris HSL^{+/+} tandis que leur taux protéinique était augmenté. Ces résultats suggèrent que la HSL affecte la régulation post-traductionnelle de SR-BI et ABCA1 en favorisant la stabilité des protéines contrairement à SR-BII dont le taux protéinique n'était pas affecté par la suppression génétique de la HSL. SR-BI et ABCA1 effectuent l'efflux de l'excès du cholestérol intracellulaire (Panzenboeck et coll., 2002; Yancey et coll., 2004). L'augmentation du taux protéinique de SR-BI et ABCA1 combinée au taux élevé du CE dans les ITf de souris HSL^{-/-} suggère un accroissement de l'efflux du cholestérol au niveau des cellules du tissu interstitiel. Cette interprétation est compatible avec la baisse du niveau d'expression de

l'ARNm et la protéine de CD36 qui effectue essentiellement l'influx du cholestérol dérivé des LDL sanguines (Febbraio et coll., 1999; Podrez et coll., 2000).

L'augmentation du taux protéinique de l'ACAT1 dans les ITf de souris HSL^{-/-} reflète le taux élevé du CE que nous avons mesuré dans les mêmes échantillons. Le fait que le taux protéinique de la HMG-CoA réductase était élevé dans les fractions de tissu interstitiel de souris HSL^{-/-} suggère que la synthèse du cholestérol était augmentée dans le tissu interstitiel malgré l'excès de CE. Environ 60 % du cholestérol utilisé pour la production de la testostérone est synthétisé *de novo* dans les cellules de Leydig (Morris et Chaikoff, 1959). Les macrophages résidents du tissu interstitiel synthétisent le 25-hydroxy-cholestérol qui est ensuite transformé en testostérone par les cellules de Leydig (Lukyanenko et coll., 2001).

Nos résultats ont montré que la suppression génétique de la HSL chez les souris mâles était accompagnée d'un ensemble de mécanisme de compensation impliquant les enzymes du métabolisme du cholestérol et les transporteurs sélectifs de cholestérol dans le tissu interstitiel.

5.3.3.1 STf

Les souris mâles HSL^{-/-} sont infertiles à cause d'une oligospermie (Osuga et coll., 2000; Chung et coll., 2001). Des études ont rapporté que le taux de CE, et non celui de CL, était augmenté dans le testicule de souris HSL^{-/-} (Osuga et coll., 2000; Vallet-Erdtmann et coll., 2004). Nos résultats ont montré qu'en plus du CE, le taux du CL était significativement plus élevé dans les fractions tubulaires de souris HSL^{-/-} comparé aux

souris HSL^{+/+}. La différence entre nos résultats et ceux des autres est due au fait que nos mesures furent réalisées sur des fractions de tubules et non sur des homogénat de testicules entiers. Le fait que le taux de CL soit élevé dans les tubules de souris HSL^{-/-} confirme la notion que la HSL n'est pas la seule hydrolase de CE dans l'épithélium séminifère (Durham et Grogan, 1984).

Nous avons montré que la suppression génétique de la HSL augmentait l'expression de l'ARNm de SR-BII et baissait celui de CD36 alors que le taux protéinique des deux récepteurs était inchangé. L'expression de l'ARNm de SR-BI et ABCA1 était semblable chez les souris HSL^{+/+} et HSL^{-/-} tandis que leur taux protéinique était significativement augmenté chez les souris HSL^{-/-}. L'augmentation du taux protéinique de SR-BI et ABCA1 combinée aux taux élevés de CL et de CE dans les tubules suggèrent une élévation du niveau d'efflux du cholestérol dans les tubules de souris HSL^{-/-}. Cette interprétation est en accord avec les travaux de Selva et collègues (2004) qui avaient rapporté que la suppression génétique de l'ABCA1 chez la souris était accompagnée d'une accumulation de cholestérol dans les tubules séminifères.

Le taux protéinique de la HMG-CoA réductase était augmenté dans les fractions tubulaires de souris HSL^{-/-} malgré les taux élevés de CL et de CE. Il faudrait examiner si le transport intracellulaire du cholestérol est affecté dans les tubules de souris HSL^{-/-}. Car, si le cholestérol était séquestré dans les lysosomes de souris HSL^{-/-} comme c'est le cas chez les souris NPC1^{-/-} (Ko et coll., 2001), alors on comprendrait pourquoi le taux protéinique de la HMG-CoA réductase était augmenté dans les tubules de souris HSL^{-/-}.

L'augmentation du niveau d'expression de l'ACAT1 peut s'expliquer par la nécessité de réduire l'excès du CL intracellulaire qui est toxique (Warner et coll., 1995).

Contrairement à l'ACAT1, le taux protéinique de l'ACAT2 était réduit dans les fractions tubulaires de souris HSL^{-/-}. Cela suggère que les deux enzymes sont associées à des fonctions différentes dans les tubules séminifères chez la souris. Dans le foie et l'intestin, l'ACAT2 estérifie le CL en CE qui est incorporé dans les lipoprotéines (Lee et coll., 2005; Temel et coll., 2007) alors que l'ACAT1 génère du CE qui est mis en réserve dans les gouttelettes lipidiques (Goodman, 1965).

5.4 Étude chez les visons orchitiques

L'orchite autoimmune spontanée aboutit à une aspermatogénèse (Voisin et Toullet, 1968) et il a été suggéré qu'elle résultait en partie d'une mauvaise élimination des cellules germinales en apoptose (Akpovi et coll., 2006). Nous avons examiné les conséquences de l'arrêt de la spermatogénèse au cours de l'orchite autoimmune sur l'expression protéinique des transporteurs sélectifs SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1 et leurs effets sur le taux de cholestérol intratubulaire.

Chez les visons normaux au cours du cycle reproductif saisonnier, nous avons rapporté que les périodes montrant de basses concentrations de CE étaient accompagnées des taux élevés des protéines SR-BI et SR-BII alors que les périodes montrant de hautes concentrations coïncidaient avec l'augmentation de l'un seulement des deux récepteurs (Akpovi et coll., 2006). Chez le vison orchitique du mois de mars, la baisse du niveau d'expression de SR-BI et SR-BII était accompagnée d'une accumulation de CE dans les tubules séminifères (Akpovi et coll., 2006). Cela suggère que l'expression maximale des deux récepteurs était requise pour le maintien des bas taux de cholestérol intratubulaire

durant la spermatogenèse. L'expression de CD36 baissait dans les fractions tubulaires de visons orchitiques de février et mars comparé aux visons normaux. Comme chez les souris normales de 35 jours d'âge ou les souris HSL^{-/-}, nos résultats ont montré que l'accumulation du cholestérol dans les tubules de visons orchitiques était accompagnée d'une augmentation de l'expression de la protéine ABCA1. Cela appuie l'hypothèse que l'ABCA1 effectue l'efflux du cholestérol dans les cellules de Sertoli (Selva et coll., 2004).

Ensemble, nos résultats montrent que l'expression des transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1 était étroitement liée de la spermatogenèse et au taux de cholestérol intratesticulaire. Les résultats que nous avons obtenus chez les visons supportent ceux que nous avons présentés chez les souris chez lesquelles le taux d'expression (ARNm et protéine) intratubulaire des transporteurs sélectifs SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1 et le taux de CL et de CE variaient en fonction de la spermatogenèse. Cela suggère l'implication de ces récepteurs dans le métabolisme du cholestérol dans le testicule.

5.5 Souris NPC1^{-/-}

Pour déterminer comment les transporteurs sélectifs contribuent au cholestérol dans le tissu interstitiel et dans les tubules séminifères, nous avons analysé les relations qui existent entre la spermatogenèse, le taux de cholestérol et les niveaux d'expression protéinique de ces récepteurs. Les souris génétiquement déficientes en NPC1 sont infertiles à cause d'une oligospermie (Fan et coll., 2006) et constituent un autre modèle pour

examiner la contribution de SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1 dans le métabolisme du cholestérol dans le testicule.

Ko et collègues (2001) ont rapporté que la suppression génétique de NPC1 causait la séquestration du cholestérol dans les lysosomes (Ko et coll., 2001). Dans les tubules séminifères, les cellules de Sertoli phagocytent les cellules germinales en apoptose et les corps résiduels qui en sont partie dégradés dans les lysosomes (Chemes, 1986; Clermont et coll., 1987) et le cholestérol récupéré est réutilisé pour la spermatogenèse (Kerr et De Kretser, 1975). Le blocage de cette source de cholestérol intratubulaire pourrait déréguler l'ensemble des facteurs du métabolisme du cholestérol. Nos résultats sont les premiers à montrer que la suppression génétique de NPC1 cause une augmentation significative des taux de CL et de CE dans les tubules séminifères de souris adultes. Ils montrent aussi que la suppression génétique de NPC1 entraînait une surexpression des protéines SR-BI et ABCA1 mais pas SR-BII. Lorsque le taux intracellulaire du cholestérol est élevé, SR-BI et ABCA1 peuvent contribuer synergiquement à effectuer l'efflux du cholestérol vers le sang (Panzenboeck et coll., 2002; Yancey et coll., 2004). Cela suggère que la suppression génétique de NPC1 favorisait l'efflux du cholestérol intratubulaire comme dans le foie (Kulinski et Vance, 2007). Nous avons aussi montré que les taux protéiniques de l'ACAT1 et l'ACAT2, qui estérifient le CL en CE (Goodman, 1965), étaient significativement plus élevés dans les fractions tubulaires de souris NPC1^{-/-} que dans celles de souris NPC1^{+/+}. Nos résultats suggèrent que l'accumulation du CL et de CE dans les fractions tubulaires de souris NPC1^{-/-} a provoqué une augmentation de l'expression protéinique des récepteurs et des enzymes impliqués dans l'efflux et l'estérification du CL dont l'excès est toxique.

Ensemble, nos résultats montrent que le niveau d'expression des transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1 dépend des taux intra-testiculaires du cholestérol qui est relié à l'état de la spermatogenèse.

5.6 Étude de protéines de jonctions lacunaires chez la souris

5.6.1 Variation du taux protéinique de connexines dans les STf durant le développement chez les souris normales

Les jonctions lacunaires permettent le transfert de matériel de taille inférieure à 1 kDa entre deux cellules adjacentes (Loewenstein et Rose, 1992). Elles existent entre cellules de Sertoli et entre cellules de Sertoli et cellules germinales (McGinley et coll., 1979; Pelletier et Friend, 1983). L'ARNm d'une douzaine de connexines (Cx-26, -30, -30.2, -31, -32, -33, -37, -43, -45, -46, -50 et -57) a été détecté dans le testicule de rat et de souris (Juneja, 2003). Nous avons montré que l'expression des protéines Cx-26, -30.2, -32 et -50 augmentait dans les fractions tubulaires au cours du développement postnatal mais diminuait chez l'adulte. L'expression protéinique de la Cx43 diminuait au cours du développement et chez l'adulte. Seule l'expression de la Cx46 était élevée chez l'adulte. Il est documenté que l'expression de la Cx43 dans les tubules séminifères est dépendante de l'âge et du stage de l'épithélium séminifères (Pelletier, 1995; Risley, 2000). Nous avons montré que l'expression protéinique de la Pan Cx43 ainsi que la forme phosphorylée en sérine 368 diminuaient chez l'adulte. La diminution de la phosphorylation de la Cx43 en sérine 368 est souvent associée à une baisse de la perméabilité des jonctions lacunaires impliquées (Bao et coll., 2004). Nos résultats suggèrent que les communications

intercellulaires à travers les jonctions lacunaires impliquant les Cx43 sont perméables au moment où la spermatogenèse est maximale comme l'avait suggéré Pelletier (1995). Le fait que l'expression de la Cx43 baissait au cours du développement alors que celle des Cx-26, -30.2, -31, -32 et -50 augmentait suggère que certaines connexines sont substituées à d'autres au cours du développement.

5.6.2 Expression de protéines de jonctions dans les tubules séminifères de souris SR-BI^{+/+} et SR-BI^{-/-}

SR-BI a été localisé dans les microdomaines membranaires riches en cholestérol (Babitt et coll., 1997) où on a rapporté qu'il médiait l'influx et l'efflux du cholestérol (Graf et coll., 1999; Yancey et coll., 2000). On a de plus rapporté que SR-BI participait à la formation de ces microdomaines (Kellner-Weibel et coll., 2000) en y favorisant la séquestration du cholestérol (Silver et Tall, 2001). Considérant ce rôle de SR-BI dans la distribution du cholestérol dans la membrane plasmique, nous avons examiné l'hypothèse que la suppression génétique de SR-BI compromettrait l'expression des protéines des jonctions intercellulaires entre cellules de Sertoli et entre cellules de Sertoli et cellules germinales.

Nous avons d'abord examiné si la suppression génétique de SR-BI affectait l'expression de protéines associées aux radeaux lipidiques. Nos résultats ont montré que la suppression génétique de SR-BI induisait la surexpression de la protéine cavéoline-1 et la réduction de flotilline-1 dans les tubules séminifères. La cavéoline-1 et la flotilline-1 sont deux protéines contenues dans les radeaux lipidiques (Harder et Simons, 1997; Evans et coll., 2003). La cavéoline-1 est exprimée dans les cellules germinales (Travis et coll., 2001)

mais pas dans les cellules de Sertoli (Evans et coll., 2003). L'expression de flotilline-1 a été rapportée dans les deux types cellulaires (Evans et coll., 2003). La cavéoline-1 et le SR-BI sont co-localisés dans les microdomaines riches en cholestérol (Babitt et coll., 1997) et sont impliquées dans l'influx et l'efflux du CL à travers la membrane plasmique (Graf et coll., 1999). La hausse du taux d'expression de cavéoline-1 dans les fractions tubulaires de souris SR-BI^{-/-} suggère que celle-ci compensait la suppression génétique de SR-BI dans les tubules séminifères. En tenant compte du rapport selon lequel la cavéoline-1 était absente des cellules de Sertoli (Evans et coll., 2003), nos résultats suggèrent que la cavéoline-1 avec le SR-BI sont impliqués dans le transport du cholestérol dans les cellules germinales.

En accord avec notre hypothèse, nos résultats ont montré que la suppression génétique de SR-BI était accompagnée une surexpression de la protéine Cx32 et une réduction de celle de Cx31 et Cx50 dans les tubules séminifères. Par contre, la suppression génétique de SR-BI n'était pas accompagnée d'un changement dans l'expression de Cx26, Cx30.2, Cx43 et Cx46. Le taux de cholestérol contenu dans la membrane plasmique influence non seulement la formation les microdomaines membranaires comme les cavéoles et les rafts (Harder et Simons, 1997; Fielding et Fielding, 2000), mais également l'assemblage des jonctions lacunaires (Malewicz et coll., 1990). Certaines connexines (Cx43, Cx32, Cx36 et Cx46) sont préférentiellement associées aux radeaux lipidiques cavéole et rafts et elles co-immunoprécipitent avec la cavéoline-1 alors que d'autres (Cx26 et Cx50) en sont exclus (Schubert et coll., 2002). Bien que la suppression génétique de SR-BI ne fût pas accompagnée de changements dans l'expression de toutes les connexines testées, le fait qu'elle était accompagnée d'une surexpression de Cx32 et de la cavéoline-1 (qui co-localisent dans les rafts) suggère que SR-BI interagit avec les radeaux lipidiques et

les jonctions lacunaires. La suppression génétique de SR-BI n'avait pas d'impact sur l'expression de la Pan Cx43 dans les tubules séminifères. Cependant, elle était accompagnée d'une diminution du niveau de phosphorylation de la Cx43 en sérine 368. La phosphorylation joue un rôle déterminant dans la régulation de la fonction des jonctions lacunaires (Lampe et Lau, 2004) et elle est favorisée par la présence ou la proximité des microdomaines riches en cholestérol (Martens et coll., 2004). Par exemple, la kinase c-Src qui est localisée dans les radeaux lipidiques, est capable de phosphoryler la Cx43 en thyrosine (Giepmans et coll., 2001) et de moduler la fonction des jonctions lacunaires impliquées (Bao et coll., 2004). Ensemble, nos résultats suggèrent que SR-BI participe à la formation et à la régulation des jonctions lacunaires dans les tubules séminifères et par conséquent à l'homéostasie de la spermatogenèse.

6. CONCLUSION ET SUGGESTIONS

L'objectif principal de cette thèse était d'examiner si les transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1 contribuent à l'homéostasie du cholestérol intratesticulaire. Nous avons montré que 1) l'expression maximale de SR-BI coïncidait avec l'activité spermatogénétique maximale et l'augmentation du taux intratesticulaire du cholestérol; 2) le taux d'expression de l'ABCA1 était élevé au moment où le taux intratesticulaire de cholestérol estérifié était élevé et bas au moment le taux de cholestérol estérifié était bas; 3) le niveau d'expression maximale de CD36 coïncidait avec la période où le taux de corps résiduels était le plus élevé. Nous avons aussi montré que la suppression génétique de NPC1 et de HSL qui causent une oligospermie et une infertilité chez les souris

mâles était accompagnée d'une accumulation du cholestérol dans les tubules séminifères alors que la suppression génétique de SR-BI et de CD36 qui ne cause pas d'infertilité affectaient peu le taux de cholestérol intratubulaire. L'orchite autoimmune spontanée chez le vison, qui cause une azoospermie, était elle aussi accompagnée d'une accumulation du cholestérol dans les tubules séminifères. Dans toutes les conditions que nous avons examinées, l'augmentation le taux du CL et/ou CE dans les fractions de tissu interstitiel et de tubules séminifères était accompagnée de 1) une augmentation de l'expression des transporteurs sélectifs qui effectuent l'efflux du cholestérol comme SR-BI, SR-BII et ABCA1; 2) une baisse de l'expression des récepteurs médiant l'influx du cholestérol comme CD36; 3) une réduction de l'expression de la HSL qui hydrolyse le CE et 4) une augmentation de l'expression de l'ACAT1 et/ou l'ACAT2 qui estérifient le CL. Nos résultats soutiennent notre hypothèse et suggèrent que le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans les deux compartiments cellulaires du testicule passe par une étroite régulation de l'expression des transporteurs sélectifs de cholestérol SR-BI, SR-BII, CD36 et ABCA1.

Il était admis que SR-BI et SR-BII sont issus d'un même gène. Mais nos résultats ne supportent pas cette notion. C'est pourquoi nous suggérons de faire le séquençage génétique du produit de SR-BII afin de mieux justifier notre point de vue.

SR-BI participe à la formation des radeaux lipidiques en y favorisant la séquestration du cholestérol. Nous avons montré que la suppression génétique de SR-BI affectait l'expression des protéines des radeaux lipidiques comme la cavéoline-1 et la flotilline-1 et certaines connexines qui sont préférentiellement associées aux radeaux lipidiques (Schubert, et coll., 2002) dans les tubules séminifères. Les résultats que nous

avons présentés dans cette thèse au sujet de l'impact de la suppression génétique de SR-BI sur la dynamique des microdomaines membranaires et des jonctions lacunaires sont préliminaires. Nous suggérons que la question soit examinée de façon plus extensive en procédant à l'extraction et à l'étude détaillée des radeaux lipidiques dans les tubules séminifères de souris SR-BI^{-/-}.

7. BIBLIOGRAPHIE

- Abumrad, N., C. Harmon, and A. Ibrahimi. (1998). Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J Lipid Res.* **39** (12): 2309-2318.
- Abumrad, N. A., M. R. el-Maghrabi, E. Z. Amri, E. Lopez, and P. A. Grimaldi. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem.* **268** (24): 17665-17668.
- Accad, M., S. J. Smith, D. L. Newland, D. A. Sanan, L. E. King, Jr., M. F. Linton, S. Fazio, and R. V. Farese, Jr. (2000). Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA:cholesterol acyltransferase 1. *J Clin Invest.* **105** (6): 711-719.
- Acton, S., A. Rigotti, K. T. Landschulz, S. Xu, H. H. Hobbs, and M. Krieger. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* **271** (5248): 518-520.
- Acton, S., P. E. Scherer, H. F. Lodish, and M. Krieger. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem.* **269** (33): 21003-21009.
- Agrawal, P., S. F. Magargee, and R. H. Hammerstedt. (1988). Isolation and characterization of the plasma membrane of rat cauda epididymal spermatozoa. *J Androl.* **9** (3): 178-189.
- Akpovi, C. D., and R. M. Pelletier. (2009). A revised and improved method for the isolation of seminiferous tubule-enriched fractions that preserves the phosphorylated and glycosylated forms of proteins. In: *Human embryogenesis: methods and protocols*. (Lafond J., and Vaillancourt, C. Eds) Humana Press, N.J (In press).
- Akpovi, C. D., S. R. Yoon, M. L. Vitale, and R. M. Pelletier. (2006). The predominance of one of the SR-BI isoforms is associated with increased esterified cholesterol levels not apoptosis in mink testis. *J Lipid Res.* **47** (10): 2233-2247.

- Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, and N. Bhardwaj. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* **188** (7): 1359-1368.
- Andersen, J. M., and J. M. Dietschy. (1978). Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary, and testis of the rat. *J Biol Chem.* **253** (24): 9024-9032.
- Aoki, A., and E. M. Massa. (1975). Subcellular compartmentation of free and esterified cholesterol in the interstitial cells of the mouse testis. *Cell Tissue Res.* **165** (1): 49-62.
- Arenas, M. I., M. V. Lobo, E. Caso, L. Huerta, R. Paniagua, and M. A. Martin-Hidalgo. (2004). Normal and pathological human testes express hormone-sensitive lipase and the lipid receptors CLA-1/SR-BI and CD36. *Hum Pathol.* **35** (1): 34-42.
- Asch, A. S., J. Barnwell, R. L. Silverstein, and R. L. Nachman. (1987). Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest.* **79** (4): 1054-1061.
- Awano, M., A. Kawaguchi, M. Morisaki, and H. Mohri. (1989). Identification of cholesta-7,24-dien-3 beta-ol and desmosterol in hamster cauda epididymal spermatozoa. *Lipids.* **24** (7): 662-664.
- Azhar, S., Y. Luo, S. Medicherla, and E. Reaven. (1999). Upregulation of selective cholesteryl ester uptake pathway in mice with deletion of low-density lipoprotein receptor function. *J Cell Physiol.* **180** (2): 190-202.
- Azhar, S., A. Nomoto, S. Leers-Sucheta, and E. Reaven. (1998). Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-BI) and the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model. *J Lipid Res.* **39** (8): 1616-1628.
- Azhar, S., and E. Reaven. (2002). Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* **195** (1-2): 1-26.
- Babitt, J., B. Trigatti, A. Rigotti, E. J. Smart, R. G. Anderson, S. Xu, and M. Krieger. (1997). Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-

- glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem.* **272** (20): 13242-13249.
- Bao, X., L. Reuss, and G. A. Altenberg. (2004). Regulation of purified and reconstituted connexin 43 hemichannels by protein kinase C-mediated phosphorylation of Serine 368. *J Biol Chem.* **279** (19): 20058-20066.
- Bared, S. M., C. Buechler, A. Boettcher, R. Dayoub, A. Siguener, M. Grandl, C. Rudolph, A. Dada, and G. Schmitz. (2004). Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in tangier cells. *Mol Biol Cell.* **15** (12): 5399-5407.
- Bartke, A. (1971a). Concentration of free and esterified cholesterol in the testes of immature and adult mice. *J Reprod Fertil.* **25** (1): 153-156.
- Bartke, A. (1971b). Effects of prolactin and luteinizing hormone on the cholesterol stores in the mouse testis. *J Endocrinol.* **49** (2): 317-324.
- Beglova, N., and S. C. Blacklow. (2005). The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem Sci.* **30** (6): 309-317.
- Bellve, A. R., J. C. Cavicchia, C. F. Millette, D. A. O'Brien, Y. M. Bhatnagar, and M. Dym. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol.* **74** (1): 68-85.
- Benahmed, M., J. Reventos, and J. M. Saez. (1983). Role of plasma lipoproteins in the function of steroidogenic tissues. *Ann Endocrinol (Paris).* **44** (1): 43-50.
- Bergh, A., J. E. Damber, and N. van Rooijen. (1993). Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages in the rat. *J Endocrinol.* **136** (3): 407-413.
- Blanco-Rodriguez, J. (1998). A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int J Androl.* **21** (5): 236-248.

- Blanco-Rodriguez, J., and C. Martinez-Garcia. (1996). Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif.* **29** (1): 13-31.
- Bodzioch, M., E. Orso, J. Klucken, T. Langmann, A. Bottcher, W. Diederich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Buchler, M. Porsch-Ozcurumez, W. E. Kaminski, H. W. Hahmann, K. Oette, G. Rothe, C. Aslanidis, K. J. Lackner, and G. Schmitz. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* **22** (4): 347-351.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
- Bravo, E., K. M. Botham, M. A. Mindham, P. A. Mayes, T. Marinelli, and A. Cantafora. (1994). Evaluation *in vivo* of the differential uptake and processing of high-density lipoprotein unesterified cholesterol and cholesteryl ester in the rat. *Biochim Biophys Acta.* **1215** (1-2): 93-102.
- Brooks-Wilson, A., M. Marcil, S. M. Clee, L. H. Zhang, K. Roomp, M. van Dam, L. Yu, C. Brewer, J. A. Collins, H. O. Molhuizen, O. Loubser, B. F. Ouelette, K. Fichter, K. J. Ashbourne-Excoffon, C. W. Sensen, S. Scherer, S. Mott, M. Denis, D. Martindale, J. Frohlich, K. Morgan, B. Koop, S. Pimstone, J. J. Kastelein, J. Genest, Jr., and M. R. Hayden. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* **22** (4): 336-345.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. (1980). Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res.* **21** (5): 505-517.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* **232** (4746): 34-47.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* **89** (3): 331-340.

- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96** (20): 11041-11048.
- Buechler, C., S. M. Bared, C. Aslanidis, M. Ritter, W. Drobnik, and G. Schmitz. (2002a). Molecular and functional interaction of the ATP-binding cassette transporter A1 with Fas-associated death domain protein. *J Biol Chem*. **277** (44): 41307-41310.
- Buechler, C., A. Boettcher, S. M. Bared, M. C. Probst, and G. Schmitz. (2002b). The carboxyterminus of the ATP-binding cassette transporter A1 interacts with a beta2-syntrophin/utrophin complex. *Biochem Biophys Res Commun*. **293** (2): 759-765.
- Buhman, K. K., M. Accad, S. Novak, R. S. Choi, J. S. Wong, R. L. Hamilton, S. Turley, and R. V. Farese, Jr. (2000). Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med*. **6** (12): 1341-1347.
- Burnett, A. L., D. D. Ricker, S. L. Chamness, M. P. Maguire, J. K. Crone, D. S. Bredt, S. H. Snyder, and T. S. Chang. (1995). Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biol Reprod*. **52** (1): 1-7.
- Calvo, D., J. Dopazo, and M. A. Vega. (1995). The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics*. **25** (1): 100-106.
- Calvo, D., D. Gomez-Coronado, Y. Suarez, M. A. Lasuncion, and M. A. Vega. (1998). Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res*. **39** (4): 777-788.
- Calvo, D., and M. A. Vega. (1993). Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem*. **268** (25): 18929-18935.
- Carreau, S., S. Bourguiba, S. Lambard, and I. Galeraud-Denis. (2002). Testicular aromatase. *J Soc Biol*. **196** (3): 241-244.
- Cavelier, C., I. Lorenzi, L. Rohrer, and A. von Eckardstein. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta*. **1761** (7): 655-666.

- Chang, T. Y., C. C. Chang, and D. Cheng. (1997). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu Rev Biochem.* **66**: 613-638.
- Chang, T. Y., P. C. Reid, S. Sugii, N. Ohgami, J. C. Cruz, and C. C. Chang. (2005). Niemann-Pick type C disease and intracellular cholesterol trafficking. *J Biol Chem.* **280** (22): 20917-20920.
- Chemes, H. (1986). The phagocytic function of Sertoli cells: a morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. *Endocrinology.* **119** (4): 1673-1681.
- Chinetti, G., F. G. Gbaguidi, S. Griglio, Z. Mallat, M. Antonucci, P. Poulain, J. Chapman, J. C. Fruchart, A. Tedgui, J. Najib-Fruchart, and B. Staels. (2000). CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation.* **101** (20): 2411-2417.
- Christensen, A. K. (1975). Leydig cells. In: Hamilton, D. M. a. G., R.O. (Ed.), *Handbook of Physiology* (Vol. 5, pp. 57-94). Baltimore.
- Christensen, A. K., and D. W. Fawcett. (1966). The fine structure of testicular interstitial cells in mice. *Am. J. Anat.*, **118** (2): 551-571.
- Christensen, A. K., and N. R. Mason. (1965). Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone-4-14c *in vitro*. *Endocrinology.* **76**: 646-656.
- Christiansen-Weber, T. A., J. R. Volland, Y. Wu, K. Ngo, B. L. Roland, S. Nguyen, P. A. Peterson, and W. P. Fung-Leung. (2000). Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency. *Am J Pathol.* **157** (3): 1017-1029.
- Chung, K. W., and J. B. Hamilton. (1975). Testicular lipids in mice with testicular feminization. *Cell Tissue Res.* **160** (1): 69-80.

- Chung, S., S. P. Wang, L. Pan, G. Mitchell, J. Trasler, and L. Hermo. (2001). Infertility and testicular defects in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Endocrinology*. **142** (10): 4272-4281.
- Clermont, Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*. **112**: 35-51.
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*. **52** (1): 198-236.
- Clermont, Y., C. Morales, and L. Hermo. (1987). Endocytic activities of Sertoli cells in the rat. *Ann NY Acad Sci*. **513**: 1-15.
- Cohen, P. E., O. Chisholm, R. J. Arceci, E. R. Stanley, and J. W. Pollard. (1996). Absence of colony-stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmop/csfmop) mice results in male fertility defects. *Biol Reprod*. **55** (2): 310-317.
- Connelly, M. A., S. M. Klein, S. Azhar, N. A. Abumrad, and D. L. Williams. (1999). Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J Biol Chem*. **274** (1): 41-47.
- Connelly, M. A., and D. L. Williams. (2004). Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr Opin Lipidol*. **15** (3): 287-295.
- Costet, P., Y. Luo, N. Wang, and A. R. Tall. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem*. **275** (36): 28240-28245.
- Cross, N. L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod*. **59** (1): 7-11.
- Davies, J. P., and Y. A. Ioannou. (2000). Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem*. **275** (32): 24367-24374.

- Davis, C. G., J. L. Goldstein, T. C. Sudhof, R. G. Anderson, D. W. Russell, and M. S. Brown. (1987). Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*. **326** (6115): 760-765.
- de Beer, M. C., L. W. Castellani, L. Cai, A. J. Stromberg, F. C. de Beer, and D. R. van der Westhuyzen. (2004). ApoA-II modulates the association of HDL with class B scavenger receptors SR-BI and CD36. *J Lipid Res*. **45** (4): 706-715.
- Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. **42** (7): 1007-1017.
- Dietschy, J. M., and S. D. Turley. (2002). Control of cholesterol turnover in the mouse. *J Biol Chem*. **277** (6): 3801-3804.
- Dietschy, J. M., S. D. Turley, and D. K. Spady. (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res*. **34** (10): 1637-1659.
- Dodt, G., N. Braverman, C. Wong, A. Moser, H. W. Moser, P. Watkins, D. Valle, and S. J. Gould. (1995). Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet*. **9** (2): 115-125.
- Dorrington, J. H., I. B. Fritz, and D. T. Armstrong. (1978). Control of testicular estrogen synthesis. *Biol Reprod*. **18** (1): 55-64.
- Durham, L. A., 3rd, and W. M. Grogan. (1984). Characterization of multiple forms of cholesteryl ester hydrolase in the rat testis. *J Biol Chem*. **259** (12): 7433-7438.
- Dym, M., and D. W. Fawcett. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod*. **3** (3): 308-326.
- Eckhardt, E. R., L. Cai, S. Shetty, Z. Zhao, A. Szanto, N. R. Webb, and D. R. Van der Westhuyzen. (2006). High density lipoprotein endocytosis by scavenger receptor SR-BII is clathrin-dependent and requires a carboxyl-terminal dileucine motif. *J Biol Chem*. **281** (7): 4348-4353.

- Eckhardt, E. R., L. Cai, B. Sun, N. R. Webb, and D. R. van der Westhuyzen. (2004). High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *J Biol Chem.* **279** (14): 14372-14381.
- Eik-Nes, K. B. (1971). Production and secretion of testicular steroids. *Recent Prog Horm Res.* **27**: 517-535.
- Endemann, G., L. W. Stanton, K. S. Madden, C. M. Bryant, R. T. White, and A. A. Protter. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* **268** (16): 11811-11816.
- Erickson, R. P., M. Kiela, P. J. Devine, P. B. Hoyer, and R. A. Heidenreich. (2002). *mdr1a* deficiency corrects sterility in Niemann-Pick C1 protein deficient female mice. *Mol Reprod Dev.* **62** (2): 167-173.
- Ericsson, J., S. M. Jackson, B. C. Lee, and P. A. Edwards. (1996). Sterol regulatory element binding protein binds to a cis element in the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93** (2): 945-950.
- Evans, W. E. t., R. L. Coyer, M. F. Sandusky, M. J. Van Fleet, J. G. Moore, and S. E. Nyquist. (2003). Characterization of membrane rafts isolated from rat sertoli cell cultures: caveolin and flotillin-1 content. *J Androl.* **24** (6): 812-821.
- Fan, J., H. Akabane, S. N. Graham, L. L. Richardson, and G. Z. Zhu. (2006). Sperm defects in mice lacking a functional Niemann-Pick C1 protein. *Mol Reprod Dev.* **73** (10): 1284-1291.
- Faust, J. R., J. L. Goldstein, and M. S. Brown. (1977). Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells. *J Biol Chem.* **252** (14): 4861-4871.
- Febbraio, M., N. A. Abumrad, D. P. Hajjar, K. Sharma, W. Cheng, S. F. Pearce, and R. L. Silverstein. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem.* **274** (27): 19055-19062.
- Febbraio, M., E. Guy, C. Coburn, F. F. Knapp, Jr., A. L. Beets, N. A. Abumrad, and R. L. Silverstein. (2002). The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (FAT)/CD36. *Mol Cell Biochem.* **239** (1-2): 193-197.

- Febbraio, M., E. A. Podrez, J. D. Smith, D. P. Hajjar, S. L. Hazen, H. F. Hoff, K. Sharma, and R. L. Silverstein. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest.* **105** (8): 1049-1056.
- Fernandez, C., M. Lindholm, M. Krogh, S. Lucas, S. Larsson, P. Osmark, K. Berger, J. Boren, B. A. Fielding, K. N. Frayn, and C. Holm. (2008). Disturbed cholesterol homeostasis in hormone-sensitive lipase null mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (In press).
- Fielding, C. J., and P. E. Fielding. (2000). Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta.* **1529** (1-3): 210-222.
- Fielding, P. E., and C. J. Fielding. (1995). Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry.* **34** (44): 14288-14292.
- Fodor, I. (1978). Location of the cleavage sites on the SV 40 DNA map produced by the restriction endonucleases Pst 1 and Bam 1. *Mol Biol Rep.* **4** (2): 73-77.
- Fofana, M., J. C. Maboundou, J. Bocquet, and D. Le Goff. (1996). Transfer of cholesterol between high density lipoproteins and cultured rat Sertoli cells. *Biochem Cell Biol.* **74** (5): 681-686.
- Fofana, M., C. Travert, S. Carreau, and D. Le Goff. (2000). Evaluation of cholesteryl ester transfer in the seminiferous tubule cells of immature rats *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil.* **118** (1): 79-83.
- Franceschini, G., P. Maderna, and C. R. Sirtori. (1991). Reverse cholesterol transport: physiology and pharmacology. *Atherosclerosis.* **88** (2-3): 99-107.
- Francis, G. A., R. H. Knopp, and J. F. Oram. (1995). Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest.* **96** (1): 78-87.
- Fransen, M., C. Brees, E. Baumgart, J. C. Vanhooren, M. Baes, G. P. Mannaerts, and P. P. Van Veldhoven. (1995). Identification and characterization of the putative human peroxisomal C-terminal targeting signal import receptor. *J Biol Chem.* **270** (13): 7731-7736.

- Garver, W. S., R. A. Heidenreich, R. P. Erickson, M. A. Thomas, and J. M. Wilson. (2000). Localization of the murine Niemann-Pick C1 protein to two distinct intracellular compartments. *J Lipid Res.* **41** (5): 673-687.
- Garver, W. S., K. Krishnan, J. R. Gallagos, M. Michikawa, G. A. Francis, and R. A. Heidenreich. (2002). Niemann-Pick C1 protein regulates cholesterol transport to the trans-Golgi network and plasma membrane caveolae. *J Lipid Res.* **43** (4): 579-589.
- Giepmans, B. N., T. Hengeveld, F. R. Postma, and W. H. Moolenaar. (2001). Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J Biol Chem.* **276** (11): 8544-8549.
- Gillot, I., C. Jehl-Pietri, P. Gounon, S. Luquet, M. Rassoulzadegan, P. Grimaldi, and F. Vidal. (2005). Germ cells and fatty acids induce translocation of CD36 scavenger receptor to the plasma membrane of Sertoli cells. *J Cell Sci.* **118** (Pt 14): 3027-3035.
- Glass, C., R. C. Pittman, M. Civen, and D. Steinberg. (1985). Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat *in vivo* and by adrenal cells and hepatocytes *in vitro*. *J Biol Chem.* **260** (2): 744-750.
- Glass, C., R. C. Pittman, D. B. Weinstein, and D. Steinberg. (1983). Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80** (17): 5435-5439.
- Goldstein, J. L., and M. S. Brown. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* **343** (6257): 425-430.
- Goodman, D. S. (1965). Cholesterol ester metabolism. *Physiol Rev.* **45** (4): 747-839.
- Graf, G. A., S. V. Matveev, and E. J. Smart. (1999). Class B scavenger receptors, caveolae and cholesterol homeostasis. *Trends Cardiovasc Med.* **9** (8): 221-225.
- Grau, G. E., and G. Chimini. (2005). Immunopathological consequences of the loss of engulfment genes: the case of ABCA1. *J Soc Biol.* **199** (3): 199-206.

- Gregory, C. W., and R. M. DePhilip. (1998). Detection of steroidogenic acute regulatory protein (stAR) in mitochondria of cultured rat Sertoli cells incubated with follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod.* **58** (2): 470-474.
- Griswold, M. D. (1988). Protein secretions of Sertoli cells. *Int Rev Cytol.* **110**: 133-156.
- Gu, X., B. Trigatti, S. Xu, S. Acton, J. Babitt, and M. Krieger. (1998). The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J Biol Chem.* **273** (41): 26338-26348.
- Gunasegaram, R., K. L. Peh, A. Loganath, P. C. T. Chew, and S. S. Ratnam. (1995). *In vitro* formation of [14C]-cholesterol from 2-[14C]-acetate in human spermatozoa. *Med Sci Res.* **23**: 315-316.
- Guthmann, F., R. Haupt, A. C. Looman, F. Spener, and B. Rustow. (1999). Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes. *Am J Physiol.* **277** (1 Pt 1): L191-196.
- Gwynne, J. T., and J. F. Strauss, 3rd. (1982). The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev.* **3** (3): 299-329.
- Haemmerle, G., R. Zimmermann, J. G. Strauss, D. Kratky, M. Riederer, G. Knipping, and R. Zechner. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice changes the plasma lipid profile by affecting the tissue-specific expression pattern of lipoprotein lipase in adipose tissue and muscle. *J Biol Chem.* **277** (15): 12946-12952.
- Hajri, T., and N. A. Abumrad. (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu Rev Nutr.* **22**: 383-415.
- Hall, J. C., J. Hadley, and T. Doman. (1991). Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *J Androl.* **12** (1): 76-87.

- Hall, P. F., D. C. Irby, and D. M. De Kretser. (1969). Conversion of cholesterol to androgens by rat testes: comparison of interstitial cells and seminiferous tubules. *Endocrinology*. **84** (3): 488-496.
- Halley, J. B. (1960). Relation of Leydig cells in the human testicle to the tubules and testicular function. *Nature*. **185**: 865-866.
- Hamilton, R. L. (1972). Synthesis and secretion of plasma lipoproteins. *Adv Exp Med Biol*. **26** (0): 7-24.
- Hamon, Y., O. Chambenoit, and G. Chimini. (2002). ABCA1 and the engulfment of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta*. **1585** (2-3): 64-71.
- Han, J., D. P. Hajjar, M. Febbraio, and A. C. Nicholson. (1997). Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem*. **272** (34): 21654-21659.
- Hara, H., and S. Yokoyama. (1991). Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J Biol Chem*. **266** (5): 3080-3086.
- Harder, T., and K. Simons. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*. **9** (4): 534-542.
- Havel, R. J. (1977). The origin and fate of chylomicrons and VLDL. *Adv Exp Med Biol*. **82**: 406-412.
- Heckert, L. L., and M. D. Griswold. (1991). Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Mol Endocrinol*. **5** (5): 670-677.
- Holst, L. S., A. M. Hoffmann, H. Mulder, F. Sundler, C. Holm, A. Bergh, and G. Fredrikson. (1994). Localization of hormone-sensitive lipase to rat Sertoli cells and its expression in developing and degenerating testes. *FEBS Lett*. **355** (2): 125-130.

- Holst, L. S., D. Langin, H. Mulder, H. Laurell, J. Grober, A. Bergh, H. W. Mohrenweiser, G. Edgren, and C. Holm. (1996). Molecular cloning, genomic organization, and expression of a testicular isoform of hormone-sensitive lipase. *Genomics*. **35** (3): 441-447.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein, and M. S. Brown. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. **109** (9): 1125-1131.
- Hou, J. W., D. C. Collins, and R. L. Schleicher. (1990). Sources of cholesterol for testosterone biosynthesis in murine Leydig cells. *Endocrinology*. **127** (5): 2047-2055.
- Hui, D. Y. (1996). Molecular biology of enzymes involved with cholesterol ester hydrolysis in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*. **1303** (1): 1-14.
- Hume, D. A., D. Halpin, H. Charlton, and S. Gordon. (1984). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **81** (13): 4174-4177.
- Hutson, J. C. (1992). Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell Tissue Res*. **267** (2): 385-389.
- Ichihara, I. (1969). Cholesterol changes in developing testicular interstitial cells of the mouse: histochemical and biochemical study. *Anat Rec*. **163** (4): 595-601.
- Ikemoto, M., H. Arai, D. Feng, K. Tanaka, J. Aoki, N. Dohmae, K. Takio, H. Adachi, M. Tsujimoto, and K. Inoue. (2000). Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97** (12): 6538-6543.
- Innerarity, T. L., and R. W. Mahley. (1978). Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry*. **17** (8): 1440-1447.
- Ioannou, Y. A. (2001). Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2** (9): 657-668.

- Ishikawa, T., Y. Kondo, K. Goda, and M. Fujisawa. (2005). Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in transgenic mice accelerates testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *J Androl.* **26** (2): 281-288.
- Jégou, B. (1993). The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int. Rev. Cytol.*, **147**: 25-96.
- Jeyaraj, D. A., G. Grossman, and P. Petrusz. (2003). Dynamics of testicular germ cell apoptosis in normal mice and transgenic mice overexpressing rat androgen-binding protein. *Reprod Biol Endocrinol.* **1**: 48-61.
- Jeyaraj, D. A., G. Grossman, and P. Petrusz. (2005). Altered bioavailability of testosterone in androgen-binding protein-transgenic mice. *Steroids.* **70** (10): 704-714.
- Ji, Y., B. Jian, N. Wang, Y. Sun, M. L. Moya, M. C. Phillips, G. H. Rothblat, J. B. Swaney, and A. R. Tall. (1997). Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem.* **272** (34): 20982-20985.
- Jian, B., M. de la Llera-Moya, Y. Ji, N. Wang, M. C. Phillips, J. B. Swaney, A. R. Tall, and G. H. Rothblat. (1998). Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J Biol Chem.* **273** (10): 5599-5606.
- Jochen, A., and J. Hays. (1993). Purification of the major substrate for palmitoylation in rat adipocytes: N-terminal homology with CD36 and evidence for cell surface acylation. *J Lipid Res.* **34** (10): 1783-1792.
- Johnson, M. S., P. A. Svensson, K. Helou, H. Billig, G. Levan, L. M. Carlsson, and B. Carlsson. (1998). Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a high density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence. *Endocrinology.* **139** (1): 72-80.
- Johnson, W. J., F. H. Mahlberg, G. H. Rothblat, and M. C. Phillips. (1991). Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* **1085** (3): 273-298.
- Juneja, S. C. (2003). mRNA expression pattern of multiple members of connexin gene family in normal and abnormal fetal gonads in mouse. *Indian J Physiol Pharmacol.* **47** (2): 147-156.

- Kabbaj, O., C. Holm, M. L. Vitale, and R. M. Pelletier. (2001). Expression, activity, and subcellular localization of testicular hormone-sensitive lipase during postnatal development in the Guinea pig. *Biol. Reprod.*, **65** (2): 601-612.
- Kabbaj, O., S. R. Yoon, C. Holm, J. Rose, M. L. Vitale, and R. M. Pelletier. (2003). Relationship of the hormone-sensitive lipase-mediated modulation of cholesterol metabolism in individual compartments of the testis to serum pituitary hormone and testosterone concentrations in a seasonal breeder, the mink (*Mustela vison*). *Biol Reprod.* **68** (3): 722-734.
- Kaplan, M. R., and R. D. Simoni. (1985). Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Cell Biol.* **101** (2): 446-453.
- Kastner, P., M. Mark, M. Leid, A. Gansmuller, W. Chin, J. M. Grondona, D. Decimo, W. Krezel, A. Dierich, and P. Chambon. (1996). Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev.* **10** (1): 80-92.
- Kawasaki, Y., A. Nakagawa, K. Nagaosa, A. Shiratsuchi, and Y. Nakanishi. (2002). Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular Sertoli cells. *J Biol Chem.* **277** (30): 27559-27566.
- Kellner-Weibel, G., M. de La Llera-Moya, M. A. Connelly, G. Stoudt, A. E. Christian, M. P. Haynes, D. L. Williams, and G. H. Rothblat. (2000). Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. *Biochemistry.* **39** (1): 221-229.
- Kerr, J. B., and D. M. De Kretser. (1975). Cyclic variations in Sertoli cell lipid content throughout the spermatogenic cycle in the rat. *J Reprod Fertil.* **43** (1): 1-8.
- Kielar, D., W. Dietmaier, T. Langmann, C. Aslanidis, M. Probst, M. Naruszewicz, and G. Schmitz. (2001). Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem.* **47** (12): 2089-2097.
- Kim, J. B., and B. M. Spiegelman. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* **10** (9): 1096-1107.
- Kluin, P. M., M. F. Kramer, and D. G. de Rooij. (1982). Spermatogenesis in the immature mouse proceeds faster than in the adult. *Int J Androl.* **5** (3): 282-294.

- Kluin, P. M., M. F. Kramer, and D. G. de Rooij. (1984). Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat Embryol (Berl)*. **169** (1): 73-78.
- Ko, D. C., J. Binkley, A. Sidow, and M. P. Scott. (2003). The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100** (5): 2518-2525.
- Ko, D. C., M. D. Gordon, J. Y. Jin, and M. P. Scott. (2001). Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events. *Mol Biol Cell*. **12** (3): 601-614.
- Kocher, O., N. Comella, K. Tognazzi, and L. F. Brown. (1998). Identification and partial characterization of PDZK1: a novel protein containing PDZ interaction domains. *Lab Invest*. **78** (1): 117-125.
- Kocher, O., A. Yesilaltay, C. Cirovic, R. Pal, A. Rigotti, and M. Krieger. (2003). Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*. **278** (52): 52820-52825.
- Kodama, T., M. Freeman, L. Rohrer, J. Zabrecky, P. Matsudaira, and M. Krieger. (1990). Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*. **343** (6258): 531-535.
- Kraemer, F. B., S. Patel, M. S. Saedi, and C. Sztalryd. (1993). Detection of hormone-sensitive lipase in various tissues. I. Expression of an HSL/bacterial fusion protein and generation of anti-HSL antibodies. *J Lipid Res*. **34** (4): 663-671.
- Kraemer, F. B., and W. J. Shen. (2002). Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res*. **43** (10): 1585-1594.
- Kraemer, F. B., K. Tavangar, and A. R. Hoffman. (1991). Developmental regulation of hormone-sensitive lipase mRNA in the rat: changes in steroidogenic tissues. *J Lipid Res*. **32** (8): 1303-1310.

- Krieger, M. (1999). Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem.* **68**: 523-558.
- Krieger, M. (2001). Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest.* **108** (6): 793-797.
- Krieger, M., S. Acton, J. Ashkenas, A. Pearson, M. Penman, and D. Resnick. (1993). Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem.* **268** (7): 4569-4572.
- Krieger, M., and J. Herz. (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem.* **63**: 601-637.
- Krieser, R. J., and K. White. (2002). Engulfment mechanism of apoptotic cells. *Curr Opin Cell Biol.* **14** (6): 734-738.
- Kulinski, A., and J. E. Vance. (2007). Lipid homeostasis and lipoprotein secretion in Niemann-Pick C1-deficient hepatocytes. *J Biol Chem.* **282** (3): 1627-1637.
- Lampe, P. D., and A. F. Lau. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol.* **36** (7): 1171-1186.
- Landschulz, K. T., R. K. Pathak, A. Rigotti, M. Krieger, and H. H. Hobbs. (1996). Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest.* **98** (4): 984-995.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, and S. L. McKnight. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* **240** (4860): 1759-1764.
- Lange, Y., and T. L. Steck. (1996). The role of intracellular cholesterol transport in cholesterol homeostasis. *Trends Cell Biol.* **6** (6): 205-208.

- Lange, Y., and T. L. Steck. (1997). Quantitation of the pool of cholesterol associated with acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in human fibroblasts. *J Biol Chem.* **272** (20): 13103-13108.
- Langer, C., B. Gansz, C. Goepfert, T. Engel, Y. Uehara, G. von Dehn, H. Jansen, G. Assmann, and A. von Eckardstein. (2002). Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* **296** (5): 1051-1057.
- Lawn, R. M., D. P. Wade, T. L. Couse, and J. N. Wilcox. (2001). Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **21** (3): 378-385.
- Leblond, C. P., and Y. Clermont. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. NY Acad. Sci.*, **55** (4): 548-573.
- Lee, R. G., R. Shah, J. K. Sawyer, R. L. Hamilton, J. S. Parks, and L. L. Rudel. (2005). ACAT2 contributes cholesteryl esters to newly secreted VLDL, whereas LCAT adds cholesteryl ester to LDL in mice. *J Lipid Res.* **46** (6): 1205-1212.
- Levesque-Sergerie, J. P., M. Duquette, C. Thibault, L. Delbecchi, and N. Bissonnette. (2007). Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol.* **8**: 93.
- Li, X., H. Y. Kan, S. Lavrentiadou, M. Krieger, and V. Zannis. (2002). Reconstituted discoidal ApoE-phospholipid particles are ligands for the scavenger receptor BI. The amino-terminal 1-165 domain of ApoE suffices for receptor binding. *J Biol Chem.* **277** (24): 21149-21157.
- Li, X. A., L. Guo, J. L. Dressman, R. Asmis, and E. J. Smart. (2005). A novel ligand-independent apoptotic pathway induced by scavenger receptor class B, type I and suppressed by endothelial nitric-oxide synthase and high density lipoprotein. *J Biol Chem.* **280** (19): 19087-19096.
- Liscum, L., and K. W. Underwood. (1995). Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem.* **270** (26): 15443-15446.

- Liu, B., and M. Krieger. (2002). Highly purified scavenger receptor class B, type I reconstituted into phosphatidylcholine/cholesterol liposomes mediates high affinity high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem.* **277** (37): 34125-34135.
- Liu, P., M. Rudick, and R. G. Anderson. (2002). Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem.* **277** (44): 41295-41298.
- Loewenstein, W. R., and B. Rose. (1992). The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell Biol.* **3** (1): 59-79.
- Lofts, B., and C. Boswell. (1960). Cyclical changes in the distribution of the testis lipids in the common frog, *Rana temporaria*. *Nature.* **187**: 708-709.
- Lopez, J. M., M. K. Bennett, H. B. Sanchez, J. M. Rosenfeld, and T. E. Osborne. (1996). Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93** (3): 1049-1053.
- Lopez, M. L., and W. de Souza. (1991). Distribution of filipin-sterol complexes in the plasma membrane of stallion spermatozoa during the epididymal maturation process. *Mol Reprod Dev.* **28** (2): 158-168.
- Luangrath, V., M. R. Brodeur, D. Rhains, and L. Brissette. (2008). Mouse CD36 has opposite effects on LDL and oxidized LDL metabolism *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **28** (7): 1290-1295.
- Luciani, M. F., and G. Chimini. (1996). The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death. *Embo J.* **15** (2): 226-235.
- Lue, Y., A. P. Sinha Hikim, C. Wang, A. Leung, and R. S. Swerdloff. (2003). Functional role of inducible nitric oxide synthase in the induction of male germ cell apoptosis, regulation of sperm number, and determination of testes size: evidence from null mutant mice. *Endocrinology.* **144** (7): 3092-3100.
- Luiken, J. J., D. P. Koonen, J. Willems, A. Zorzano, C. Becker, Y. Fischer, N. N. Tandon, G. J. Van Der Vusse, A. Bonen, and J. F. Glatz. (2002). Insulin stimulates long-chain fatty acid

- utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes*. **51** (10): 3113-3119.
- Lukyanenko, Y. O., J. J. Chen, and J. C. Hutson. (2001). Production of 25-hydroxycholesterol by testicular macrophages and its effects on Leydig cells. *Biol Reprod*. **64** (3): 790-796.
- Maboundou, J. C., M. Fofana, J. Fresnel, J. Bocquet, and D. Le Goff. (1995). Effect of lipoproteins on cholesterol synthesis in rat Sertoli cells. *Biochem Cell Biol*. **73** (1-2): 67-72.
- Mack, S. R., J. Everingham, and L. J. Zaneveld. (1986). Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa. *J Exp Zool*. **240** (1): 127-136.
- Malewicz, B., V. V. Kumar, R. G. Johnson, and W. J. Baumann. (1990). Lipids in gap junction assembly and function. *Lipids*. **25** (8): 419-427.
- Martens, J. R., K. O'Connell, and M. Tamkun. (2004). Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts. *Trends Pharmacol Sci*. **25** (1): 16-21.
- Martinez, L. O., B. Agerholm-Larsen, N. Wang, W. Chen, and A. R. Tall. (2003). Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. *J Biol Chem*. **278** (39): 37368-37374.
- Maxfield, F. R., and D. Wustner. (2002). Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest*. **110** (7): 891-898.
- McGinley, D. M., Z. Posalaky, M. Porvaznik, and L. Russell. (1979). Gap junctions between Sertoli and germ cells of rat seminiferous tubules. *Tissue Cell*. **11** (4): 741-754.
- McNeish, J., R. J. Aiello, D. Guyot, T. Turi, C. Gabel, C. Aldinger, K. L. Hoppe, M. L. Roach, L. J. Royer, J. de Wet, C. Broccardo, G. Chimini, and O. L. Francone. (2000). High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97** (8): 4245-4250.
- Meiner, V., C. Tam, M. D. Gunn, L. M. Dong, K. H. Weisgraber, S. Novak, H. M. Myers, S. K. Erickson, and R. V. Farese, Jr. (1997). Tissue expression studies on the mouse acyl-CoA:

- cholesterol acyltransferase gene (Acact): findings supporting the existence of multiple cholesterol esterification enzymes in mice. *J Lipid Res.* **38** (9): 1928-1933.
- Mendis-Handagama, S. M., P. A. Watkins, S. J. Gelber, and T. J. Scallen. (1992). Leydig cell peroxisomes and sterol carrier protein-2 in luteinizing hormone-deprived rats. *Endocrinology.* **131** (6): 2839-2845.
- Miething, A. (1992). Germ-cell death during prespermatogenesis in the testis of the golden hamster. *Cell Tissue Res.* **267** (3): 583-590.
- Mills, N. C. (1990). Androgen effects on Sertoli cells. *Int J Androl.* **13** (2): 123-134.
- Miyazaki, A., H. Nakayama, and S. Horiuchi. (2002). Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *Trends Cardiovasc Med.* **12** (6): 258-262.
- Mizuno, K., A. Shiratsuchi, Y. Masamune, and Y. Nakanishi. (1996). The role of Sertoli cells in the differentiation and exclusion of rat testicular germ cells in primary culture. *Cell Death Differ.* **3** (1): 119-123.
- Morris, M. D., and I. L. Chaikoff. (1959). The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland, and testis of the rat: dietary versus endogenous contributions. *J Biol Chem.* **234** (5): 1095-1097.
- Mulcahy, J. V., D. R. Riddell, and J. S. Owen. (2004). Human scavenger receptor class B type II (SR-BII) and cellular cholesterol efflux. *Biochem J.* **377** (Pt 3): 741-747.
- Nakagawa, A., K. Nagaosa, T. Hirose, K. Tsuda, K. Hasegawa, A. Shiratsuchi, and Y. Nakanishi. (2004). Expression and function of class B scavenger receptor type I on both apical and basolateral sides of the plasma membrane of polarized testicular Sertoli cells of the rat. *Dev Growth Differ.* **46** (3): 283-298.
- Nakagawa, A., A. Shiratsuchi, K. Tsuda, and Y. Nakanishi. (2005). *In vivo* analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Mol Reprod Dev.* **71** (2): 166-177.
- Nakanishi, Y., and A. Shiratsuchi. (2004). Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biol Pharm Bull.* **27** (1): 13-16.

- Nakata, A., Y. Nakagawa, M. Nishida, S. Nozaki, J. Miyagawa, T. Nakagawa, R. Tamura, K. Matsumoto, K. Kameda-Takemura, S. Yamashita, and Y. Matsuzawa. (1999). CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19** (5): 1333-1339.
- Ness, G. C., and S. J. Nazian. (1992). Developmental expression of multiple forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA in rat testes. *J Androl.* **13** (4): 318-322.
- Neufeld, E. B., S. J. Demosky, Jr., J. A. Stonik, C. Combs, A. T. Remaley, N. Duverger, S. Santamarina-Fojo, and H. B. Brewer, Jr. (2002). The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **297** (4): 974-979.
- Neufeld, E. B., A. T. Remaley, S. J. Demosky, J. A. Stonik, A. M. Cooney, M. Comly, N. K. Dwyer, M. Zhang, J. Blanchette-Mackie, S. Santamarina-Fojo, and H. B. Brewer, Jr. (2001). Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem.* **276** (29): 27584-27590.
- Nicholson, A. C., S. Frieda, A. Pearce, and R. L. Silverstein. (1995). Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **15** (2): 269-275.
- Niemi, M., R. M. Sharpe, and W. R. Brown. (1986). Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tissue Res.* **243** (2): 337-344.
- Nikolopoulou, M., D. A. Soucek, and J. C. Vary. (1985). Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta.* **815** (3): 486-498.
- O'Donnell, L., R. I. McLachlan, N. G. Wreford, D. M. de Kretser, and D. M. Robertson. (1996). Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod.* **55** (4): 895-901.
- Oakberg, E. F. (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat.* **99** (3): 391-413.

- Ohama, T., K. Hirano, Z. Zhang, R. Aoki, K. Tsujii, Y. Nakagawa-Toyama, K. Tsukamoto, C. Ikegami, A. Matsuyama, M. Ishigami, N. Sakai, H. Hiraoka, K. Ueda, S. Yamashita, and Y. Matsuzawa. (2002). Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands. *Biochem Biophys Res Commun.* **296** (3): 625-630.
- Ohgami, N., D. C. Ko, M. Thomas, M. P. Scott, C. C. Chang, and T. Y. Chang. (2004). Binding between the Niemann-Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101** (34): 12473-12478.
- Ohgami, N., R. Nagai, A. Miyazaki, M. Ikemoto, H. Arai, S. Horiuchi, and H. Nakayama. (2001). Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem.* **276** (16): 13348-13355.
- Onstad, O. (1967). Studies on postnatal testicular changes, semen quality, and anomalies of reproductive organs in the mink. A clinical, histological, and histochemical study. *Acta Endocrinol (Copenh).* Suppl 117:113+.
- Oquendo, P., E. Hundt, J. Lawler, and B. Seed. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell.* **58** (1): 95-101.
- Orth, J. M. (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec.* **203** (4): 485-492.
- Osada, Y., A. Shiratsuchi, and Y. Nakanishi. (2006). Involvement of mitogen-activated protein kinases in class B scavenger receptor type I-induced phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res.* **312** (10): 1820-1830.
- Osborne, T. F. (1995). Transcriptional control mechanisms in the regulation of cholesterol balance. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **5** (3-4): 317-335.
- Osborne, T. F. (2000). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem.* **275** (42): 32379-32382.
- Osuga, J., S. Ishibashi, T. Oka, H. Yagyū, R. Tozawa, A. Fujimoto, F. Shionoiri, N. Yahagi, F. B. Kraemer, O. Tsutsumi, and N. Yamada. (2000). Targeted disruption of hormone-sensitive

- lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** (2): 787-792.
- Panzenboeck, U., Z. Balazs, A. Sovic, A. Hrzenjak, S. Levak-Frank, A. Wintersperger, E. Malle, and W. Sattler. (2002). ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an *in vitro* blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. *J Biol Chem.* **277** (45): 42781-42789.
- Parathath, S., D. Sahoo, Y. F. Darlington, Y. Peng, H. L. Collins, G. H. Rothblat, D. L. Williams, and M. A. Connelly. (2004). Glycine 420 near the C-terminal transmembrane domain of SR-BI is critical for proper delivery and metabolism of high density lipoprotein cholesteryl ester. *J Biol Chem.* **279** (24): 24976-24985.
- Paresce, D. M., R. N. Ghosh, and F. R. Maxfield. (1996). Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron.* **17** (3): 553-565.
- Parks, J. E., J. W. Arion, and R. H. Foote. (1987). Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* **37** (5): 1249-1258.
- Parks, J. E., and R. H. Hammerstedt. (1985). Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod.* **32** (3): 653-668.
- Parks, J. E., and D. V. Lynch. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology.* **29** (2): 255-266.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature.* **373** (6515): 573-580.
- Pelletier, R., J. M. Trifaro, M. E. Carbajal, Y. Okawara, and M. L. Vitale. (1999). Calcium-dependent actin filament-severing protein scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis, and spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **60** (5): 1128-1136.
- Pelletier, R. M. (1986). Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*), a seasonal breeder. *Am J Anat.* **175** (1): 91-117.

- Pelletier, R. M. (1995). The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (Guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *J Androl.* **16** (5): 400-409.
- Pelletier, R. M., and S. W. Byers. (1992). The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech.* **20** (1): 3-33.
- Pelletier, R. M., and D. S. Friend. (1983). The Sertoli cell junctional complex: structure and permeability to filipin in the neonatal and adult Guinea pig. *Am J Anat.* **168** (2): 213-228.
- Pelletier, R. M., and D. S. Friend. (1986). Sertoli cell junctional complexes in gossypol-treated neonatal and adult Guinea pigs. *J Androl.* **7** (3): 127-139.
- Pelletier, R. M., S. R. Yoon, C. D. Akpovi, E. Silvas, and M. L. Vitale. (2009). Defects in the Regulatory Clearance Mechanisms Favour the Breakdown of Self-Tolerance During Spontaneous Autoimmune Orchitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (In press)
- Peng, Y., W. Akmentin, M. A. Connelly, S. Lund-Katz, M. C. Phillips, and D. L. Williams. (2004). Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol Biol Cell.* **15** (1): 384-396.
- Pineau, C., B. Le Magueresse, J. L. Courtens, and B. Jegou. (1991). Study *in vitro* of the phagocytic function of Sertoli cells in the rat. *Cell Tissue Res.* **264** (3): 589-598.
- Platt, N., R. P. da Silva, and S. Gordon. (1999). Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Immunol Lett.* **65** (1-2): 15-19.
- Plump, A. S., S. K. Erickson, W. Weng, J. S. Partin, J. L. Breslow, and D. L. Williams. (1996). Apolipoprotein A-I is required for cholesteryl ester accumulation in steroidogenic cells and for normal adrenal steroid production. *J Clin Invest.* **97** (11): 2660-2671.
- Podrez, E. A., M. Febbraio, N. Sheibani, D. Schmitt, R. L. Silverstein, D. P. Hajjar, P. A. Cohen, W. A. Frazier, H. F. Hoff, and S. L. Hazen. (2000). Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest.* **105** (8): 1095-1108.

- Pohl, J., A. Ring, U. Korkmaz, R. Ehehalt, and W. Stremmel. (2005). FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts. *Mol Biol Cell*. **16** (1): 24-31.
- Pokel, J. D., W. R. Moyle, and R. O. Greep. (1972). Depletion of esterified cholesterol in mouse testis and Leydig cell tumors by luteinizing hormone. *Endocrinology*. **91** (1): 323-325.
- Potter, J. E., C. F. Millette, M. J. James, and A. A. Kandutsch. (1981). Elevated cholesterol and dolichol synthesis in mouse pachytene spermatocytes. *J Biol Chem*. **256** (14): 7150-7154.
- Puglielli, L., A. Rigotti, A. V. Greco, M. J. Santos, and F. Nervi. (1995). Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts. *J Biol Chem*. **270** (32): 18723-18726.
- Rana, A. P., G. C. Majumder, S. Misra, and A. Ghosh. (1991). Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta*. **1061** (2): 185-196.
- Ravid, T., R. Doolman, R. Avner, D. Harats, and J. Roitelman. (2000). The ubiquitin-proteasome pathway mediates the regulated degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem*. **275** (46): 35840-35847.
- Reaven, E., Y. Cortez, S. Leers-Sucheta, A. Nomoto, and S. Azhar. (2004). Dimerization of the scavenger receptor class B type I: formation, function, and localization in diverse cells and tissues. *J Lipid Res*. **45** (3): 513-528.
- Reaven, E., Y. Lua, A. Nomoto, R. Temel, D. L. Williams, D. R. van der Westhuyzen, and S. Azhar. (1999). The selective pathway and a high-density lipoprotein receptor (SR-BI) in ovarian granulosa cells of the mouse. *Biochim Biophys Acta*. **1436** (3): 565-576.
- Reaven, E., L. Zhan, A. Nomoto, S. Leers-Sucheta, and S. Azhar. (2000). Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis. *J Lipid Res*. **41** (3): 343-356.
- Remaley, A. T., U. K. Schumacher, J. A. Stonik, B. D. Farsi, H. Nazih, and H. B. Brewer, Jr. (1997). Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor

- specificity and effect of brefeldin on lipid efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17** (9): 1813-1821.
- Ren, Y., R. L. Silverstein, J. Allen, and J. Savill. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med.* **181** (5): 1857-1862.
- Repa, J. J., K. K. Buhman, R. V. Farese, Jr., J. M. Dietschy, and S. D. Turley. (2004). ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterol-fed mouse: impact on hepatic cholesterol homeostasis. *Hepatology.* **40** (5): 1088-1097.
- Repa, J. J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J. M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M. S. Brown, J. L. Goldstein, and D. J. Mangelsdorf. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta. *Genes Dev.* **14** (22): 2819-2830.
- Rigotti, A., S. L. Acton, and M. Krieger. (1995). The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem.* **270** (27): 16221-16224.
- Rigotti, A., H. E. Miettinen, and M. Krieger. (2003). The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev.* **24** (3): 357-387.
- Rigotti, A., B. Trigatti, J. Babitt, M. Penman, S. Xu, and M. Krieger. (1997). Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol.* **8** (3): 181-188.
- Ring, A., S. Le Lay, J. Pohl, P. Verkade, and W. Stremmel. (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* **1761** (4): 416-423.
- Risley, M. S. (2000). Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod.* **62** (3): 748-754.
- Rodrigueza, W. V., S. T. Thuahnai, R. E. Temel, S. Lund-Katz, M. C. Phillips, and D. L. Williams. (1999). Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *J Biol Chem.* **274** (29): 20344-20350.

- Roff, C. F., J. F. Strauss, 3rd, E. Goldin, H. Jaffe, M. C. Patterson, G. C. Agritellis, A. M. Hibbs, M. Garfield, R. O. Brady, and P. G. Pentchev. (1993). The murine Niemann-Pick type C lesion affects testosterone production. *Endocrinology*. **133** (6): 2913-2923.
- Rohrer, J., and A. Kuhn. (1990). The function of a leader peptide in translocating charged amino acyl residues across a membrane. *Science*. **250** (4986): 1418-1421.
- Russell, L. (1977). Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. *Am J Anat*. **148** (3): 301-312.
- Russell, L. D., and Y. Clermont. (1977). Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec*. **187** (3): 347-366.
- Rust, S., M. Rosier, H. Funke, J. Real, Z. Amoura, J. C. Piette, J. F. Deleuze, H. B. Brewer, N. Duverger, P. Deneffe, and G. Assmann. (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*. **22** (4): 352-355.
- Ryeom, S. W., J. R. Sparrow, and R. L. Silverstein. (1996). CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J Cell Sci*. **109** (Pt 2): 387-395.
- Sahoo, D., Y. Peng, J. R. Smith, Y. F. Darlington, and M. A. Connelly. (2007). Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) homo-dimerizes via its C-terminal region: fluorescence resonance energy transfer analysis. *Biochim Biophys Acta*. **1771** (7): 818-829.
- Sakashita, N., A. Miyazaki, M. Takeya, S. Horiuchi, C. C. Chang, T. Y. Chang, and K. Takahashi. (2000). Localization of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) in macrophages and in various tissues. *Am J Pathol*. **156** (1): 227-236.
- Sarsfield, P., A. Rinne, D. B. Jones, P. Johnson, and D. H. Wright. (1996). Accessory cells in physiological lymphoid tissue from the intestine: an immunohistochemical study. *Histopathology*. **28** (3): 205-211.
- Savill, J., and V. Fadok. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. **407** (6805): 784-788.

- Schlegel, R. A., and P. Williamson. (2001). Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ.* **8** (6): 551-563.
- Schmitz, G., and C. Buechler. (2002). ABCA1: regulation, trafficking and association with heteromeric proteins. *Ann Med.* **34** (5): 334-347.
- Schroeder, F., A. B. Kier, and W. D. Sweet. (1990). Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation in LM fibroblast plasma membrane transbilayer structure. *Arch Biochem Biophys.* **276** (1): 55-64.
- Schubert, A. L., W. Schubert, D. C. Spray, and M. P. Lisanti. (2002). Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry.* **41** (18): 5754-5764.
- Schwartz, K., R. M. Lawn, and D. P. Wade. (2000). ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun.* **274** (3): 794-802.
- Selva, D. M., V. Hirsch-Reinshagen, B. Burgess, S. Zhou, J. Chan, S. McIsaac, M. R. Hayden, G. L. Hammond, A. W. Vogl, and C. L. Wellington. (2004). The ATP-binding cassette transporter 1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility. *J Lipid Res.* **45** (6): 1040-1050.
- Setchell, B. P. (1967). The blood-testicular fluid barrier in sheep. *J Physiol.* **189** (2): 63P-65P.
- Sever, N., B. L. Song, D. Yabe, J. L. Goldstein, M. S. Brown, and R. A. DeBose-Boyd. (2003). Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem.* **278** (52): 52479-52490.
- Shiratsuchi, A., Y. Kawasaki, M. Ikemoto, H. Arai, and Y. Nakanishi. (1999). Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Sertoli cells. *J Biol Chem.* **274** (9): 5901-5908.
- Shiratsuchi, A., M. Umeda, Y. Ohba, and Y. Nakanishi. (1997). Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by Sertoli cells of the rat. *J Biol Chem.* **272** (4): 2354-2358.

- Silver, D. L. (2002). A carboxyl-terminal PDZ-interacting domain of scavenger receptor B, type I is essential for cell surface expression in liver. *J Biol Chem.* **277** (37): 34042-34047.
- Silver, D. L., and A. R. Tall. (2001). The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Curr Opin Lipidol.* **12** (5): 497-504.
- Silver, D. L., N. Wang, and A. R. Tall. (2000). Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake. *J Clin Invest.* **105** (2): 151-159.
- Simantov, R., M. Febbraio, and R. L. Silverstein. (2005). The antiangiogenic effect of thrombospondin-2 is mediated by CD36 and modulated by histidine-rich glycoprotein. *Matrix Biol.* **24** (1): 27-34.
- Sinha-Hikim, A. P., and R. S. Swerdloff. (1993). Temporal and stage-specific changes in spermatogenesis of rat after gonadotropin deprivation by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology.* **133** (5): 2161-2170.
- Sinha Hikim, A. P., and R. S. Swerdloff. (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod.* **4** (1): 38-47.
- Steinberger, A., M. Hintz, and J. J. Heindel. (1978). Changes in cyclic AMP responses to FSH in isolated rat Sertoli cells during sexual maturation. *Biol Reprod.* **19** (3): 566-572.
- Susztak, K., E. Ciccone, P. McCue, K. Sharma, and E. P. Bottinger. (2005). Multiple metabolic hits converge on CD36 as novel mediator of tubular epithelial apoptosis in diabetic nephropathy. *PLoS Med.* **2** (2): e45.
- Tandon, N. N., U. Kralisz, and G. A. Jamieson. (1989). Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem.* **264** (13): 7576-7583.
- Tao, N., S. J. Wagner, and D. M. Lublin. (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem.* **271** (37): 22315-22320.

- Tavani, D. M., T. Tanaka, J. F. Strauss, 3rd, and J. T. Billheimer. (1982). Regulation of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase in the luteinized rat ovary: observations with an improved enzymatic assay. *Endocrinology*. **111** (3): 794-800.
- Temel, R. E., L. Hou, L. L. Rudel, and G. S. Shelness. (2007). ACAT2 stimulates cholesteryl ester secretion in apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res*. **48** (7): 1618-1627.
- Temel, R. E., B. Trigatti, R. B. DeMattos, S. Azhar, M. Krieger, and D. L. Williams. (1997). Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94** (25): 13600-13605.
- Travis, A. J., T. Merdushev, L. A. Vargas, B. H. Jones, M. A. Purdon, R. W. Nipper, J. Galatioto, S. B. Moss, G. R. Hunnicutt, and G. S. Kopf. (2001). Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Dev Biol*. **240** (2): 599-610.
- Trigatti, B., H. Rayburn, M. Vinals, A. Braun, H. Miettinen, M. Penman, M. Hertz, M. Schrenzel, L. Amigo, A. Rigotti, and M. Krieger. (1999). Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96** (16): 9322-9327.
- Trigatti, B., A. Rigotti, and M. Krieger. (2000a). The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol*. **11** (2): 123-131.
- Trigatti, B. L., A. Rigotti, and A. Braun. (2000b). Cellular and physiological roles of SR-BI, a lipoprotein receptor which mediates selective lipid uptake. *Biochim Biophys Acta*. **1529** (1-3): 276-286.
- Tung, K. S., L. Ellis, C. Teuscher, A. Meng, J. C. Blaustein, S. Kohno, and R. Howell. (1981). The black mink (*Mustela vison*). A natural model of immunologic male infertility. *J Exp Med*. **154** (4): 1016-1032.
- Urban, S., S. Zieseniss, M. Werder, H. Hauser, R. Budzinski, and B. Engelmann. (2000). Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into the cells. *J Biol Chem*. **275** (43): 33409-33415.

- Vallet-Erdtmann, V., G. Tavernier, J. A. Contreras, A. Mairal, C. Rieu, A. M. Touzalin, C. Holm, B. Jegou, and D. Langin. (2004). The testicular form of hormone-sensitive lipase HSLtes confers rescue of male infertility in HSL-deficient mice. *J Biol Chem.* **279** (41): 42875-42880.
- van der Velde, A. E., and A. K. Groen. (2005). Shifting gears: liver SR-BI drives reverse cholesterol transport in macrophages. *J Clin Invest.* **115** (10): 2699-2701.
- Van Eck, M., J. Twisk, M. Hoekstra, B. T. Van Rij, C. A. Van der Lans, I. S. Bos, J. K. Kruijt, F. Kuipers, and T. J. Van Berkel. (2003). Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver. *J Biol Chem.* **278** (26): 23699-23705.
- van Haren, L., K. J. Teerds, B. C. Ossendorp, G. P. van Heusden, J. Orly, D. M. Stocco, K. W. Wirtz, and F. F. Rommerts. (1992). Sterol carrier protein 2 (non-specific lipid transfer protein) is localized in membranous fractions of Leydig cells and Sertoli cells but not in germ cells. *Biochim Biophys Acta.* **1124** (3): 288-296.
- van Noort, M., F. F. Rommerts, A. van Amerongen, and K. W. Wirtz. (1988). Intracellular redistribution of SCP2 in Leydig cells after hormonal stimulation may contribute to increased pregnenolone production. *Biochem Biophys Res Commun.* **154** (1): 60-65.
- van Vliet, A. K., G. C. van Thiel, R. H. Huisman, H. Moshage, S. H. Yap, and L. H. Cohen. (1995). Different effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors on sterol synthesis in various human cell types. *Biochim Biophys Acta.* **1254** (1): 105-111.
- Vanier, M. T., C. Rodriguez-Lafrasse, R. Rousson, N. Gazzah, M. C. Juge, P. G. Pentchev, A. Revol, and P. Louisot. (1991). Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta.* **1096** (4): 328-337.
- Veldhuis, J. D., J. F. Strauss, 3rd, S. L. Silavin, and L. A. Kolp. (1985). The role of cholesterol esterification in ovarian steroidogenesis: studies in cultured swine granulosa cells using a novel inhibitor of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Endocrinology.* **116** (1): 25-30.

- Vergouwen, R. P., S. G. Jacobs, R. Huiskamp, J. A. Davids, and D. G. de Rooij. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil.* **93** (1): 233-243.
- Vinals, M., S. Xu, E. Vasile, and M. Krieger. (2003). Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem.* **278** (7): 5325-5332.
- Voisin, G. A., and F. Toullet. (1968). Étude sur l'orchite aspermatogénétique autoimmune et les autoantigènes de spermatozoïdes chez le cobaye. *Ann. Inst. Pasteur (Paris).* **114** (6): 727-755.
- Wang, H., F. Liu, C. F. Millette, and D. L. Kilpatrick. (2002). Expression of a novel, sterol-insensitive form of sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) in male germ cells suggests important cell- and stage-specific functions for SREBP targets during spermatogenesis. *Mol Cell Biol.* **22** (24): 8478-8490.
- Wang, N., W. Chen, P. Linsel-Nitschke, L. O. Martinez, B. Agerholm-Larsen, D. L. Silver, and A. R. Tall. (2003). A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J Clin Invest.* **111** (1): 99-107.
- Wang, X., H. L. Collins, M. Ranalletta, I. V. Fuki, J. T. Billheimer, G. H. Rothblat, A. R. Tall, and D. J. Rader. (2007). Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport *in vivo*. *J Clin Invest.* **117** (8): 2216-2224.
- Warner, G. J., G. Stoudt, M. Bamberger, W. J. Johnson, and G. H. Rothblat. (1995). Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. *J Biol Chem.* **270** (11): 5772-5778.
- Webb, N. R., P. M. Connell, G. A. Graf, E. J. Smart, W. J. de Villiers, F. C. de Beer, and D. R. van der Westhuyzen. (1998). SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J Biol Chem.* **273** (24): 15241-15248.
- Webb, N. R., W. J. de Villiers, P. M. Connell, F. C. de Beer, and D. R. van der Westhuyzen. (1997). Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J Lipid Res.* **38** (7): 1490-1495.

- Welch, C. L., Y. R. Xia, L. J. Gu, D. Machleder, M. Mehrabian, P. Z. Wen, N. Webb, W. J. de Villiers, D. van der Westhuyzen, and A. J. Lusis. (1997). *Srb1* maps to mouse chromosome 5 in a region harboring putative QTLs for plasma lipoprotein levels. *Mamm Genome*. **8** (12): 942-944.
- Wellington, C. L., E. K. Walker, A. Suarez, A. Kwok, N. Bissada, R. Singaraja, Y. Z. Yang, L. H. Zhang, E. James, J. E. Wilson, O. Francone, B. M. McManus, and M. R. Hayden. (2002). ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest*. **82** (3): 273-283.
- Wiebe, J. P., and K. S. Tilbe. (1979). *De novo* synthesis of steroids (from acetate) by isolated rat Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **89** (4): 1107-1113.
- Wilcox, L. J., N. M. Borradaile, L. E. de Dreu, and M. W. Huff. (2001). Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J Lipid Res*. **42** (5): 725-734.
- Williams, D. L., M. de La Llera-Moya, S. T. Thuahnai, S. Lund-Katz, M. A. Connelly, S. Azhar, G. M. Anantharamaiah, and M. C. Phillips. (2000). Binding and cross-linking studies show that scavenger receptor BI interacts with multiple sites in apolipoprotein A-I and identify the class A amphipathic alpha-helix as a recognition motif. *J Biol Chem*. **275** (25): 18897-18904.
- Wilson, J. D. (1978). Sexual differentiation. *Annu Rev Physiol*. **40**: 279-306.
- Wyler, B., L. Daviet, H. Bortkiewicz, J. C. Bordet, and J. L. McGregor. (1993). Cloning of the cDNA encoding human platelet CD36: comparison to PCR amplified fragments of monocyte, endothelial and HEL cells. *Thromb Haemost*. **70** (3): 500-505.
- Xie, C., J. A. Richardson, S. D. Turley, and J. M. Dietschy. (2006). Cholesterol substrate pools and steroid hormone levels are normal in the face of mutational inactivation of NPC1 protein. *J Lipid Res*. **47** (5): 953-963.
- Xie, C., S. D. Turley, P. G. Pentchev, and J. M. Dietschy. (1999). Cholesterol balance and metabolism in mice with loss of function of Niemann-Pick C protein. *Am J Physiol*. **276** (2 Pt 1): E336-344.

- Xu, S., M. Laccotripe, X. Huang, A. Rigotti, V. I. Zannis, and M. Krieger. (1997). Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *J Lipid Res.* **38** (7): 1289-1298.
- Yagy, H., T. Kitamine, J. Osuga, R. Tozawa, Z. Chen, Y. Kaji, T. Oka, S. Perrey, Y. Tamura, K. Ohashi, H. Okazaki, N. Yahagi, F. Shionoiri, Y. Iizuka, K. Harada, H. Shimano, H. Yamashita, T. Gotoda, N. Yamada, and S. Ishibashi. (2000). Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J Biol Chem.* **275** (28): 21324-21330.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote.* **2** (4): 371-372.
- Yancey, P. G., B. F. Asztalos, N. Stettler, D. Piccoli, D. L. Williams, M. A. Connelly, and G. H. Rothblat. (2004). SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol efflux to serum from patients with Alagille syndrome. *J Lipid Res.* **45** (9): 1724-1732.
- Yancey, P. G., M. de la Llera-Moya, S. Swarnakar, P. Monzo, S. M. Klein, M. A. Connelly, W. J. Johnson, D. L. Williams, and G. H. Rothblat. (2000). High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem.* **275** (47): 36596-36604.
- Yeagle, P. L. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta.* **822** (3-4): 267-287.
- Yeaman, S. J. (1990). Hormone sensitive lipase, a multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* **1052** (1): 128-132.
- Yokoyama, S. (2000). Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim Biophys Acta.* **1529** (1-3): 231-244.
- Yu, L., G. Cao, J. Repa, and H. Stangl. (2004). Sterol regulation of scavenger receptor class B type I in macrophages. *J Lipid Res.* **45** (5): 889-899.
- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J.* **294** (Pt 1): 1-14.

- Zambrano, F., S. Fleischer, and B. Fleischer. (1975). Lipid composition of the Golgi apparatus of rat kidney and liver in comparison with other subcellular organelles. *Biochim Biophys Acta*. **380** (3): 357-369.
- Zhang, W., P. G. Yancey, Y. R. Su, V. R. Babaev, Y. Zhang, S. Fazio, and M. F. Linton. (2003). Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. **108** (18): 2258-2263.
- Zhang, X., A. N. Moor, K. A. Merkler, Q. Liu, and M. P. McLean. (2007). Regulation of alternative splicing of liver scavenger receptor class B gene by estrogen and the involved regulatory splicing factors. *Endocrinology*. **148** (11): 5295-5304.
- Zhang, Y., J. R. Da Silva, M. Reilly, J. T. Billheimer, G. H. Rothblat, and D. J. Rader. (2005). Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport *in vivo*. *J Clin Invest*. **115** (10): 2870-2874.
- Zhou, M., R. D. Parr, A. D. Petrescu, H. R. Payne, B. P. Atshaves, A. B. Kier, J. M. Ball, and F. Schroeder. (2004). Sterol carrier protein-2 directly interacts with caveolin-1 *in vitro* and *in vivo*. *Biochemistry*. **43** (23): 7288-7306.
- Zibara, K., E. Malaud, and J. L. McGregor. (2002). CD36 mRNA and Protein Expression Levels Are Significantly Increased in the Heart and Testis of apoE Deficient Mice in Comparison to Wild Type (C57BL/6). *J Biomed Biotechnol*. **2** (1): 14-21.
- Zini, A., M. K. O'Bryan, M. S. Magid, and P. N. Schlegel. (1996). Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod*. **55** (5): 935-941.

Annexe 1: Article 1

The predominance of one of the SR-BI isoforms is associated with increased esterified cholesterol levels not apoptosis in mink testis

Casimir D. Akpovi, Suk Ran Yoon, María Leiza Vitale, and R-Marc Pelletier¹

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abstract Scavenger receptor class B type I (SR-BI) contributes to HDL-mediated cellular cholesterol efflux and is a phagocytosis-inducing phospholipid phosphatidylserine receptor in rat Sertoli cells, whereas the spliced variant of the SR-B gene, SR-BII, is implicated in the efflux of free cholesterol in macrophages. This study aimed to assess whether spontaneous autoimmune orchitis (AIO), which causes impaired clearance of apoptotic germ cells and spermatogenic arrest, involves SR-BI, SR-BII, and/or cholesterol. The levels measured during development and the annual reproductive cycle in normal mink were compared with those in mink with spontaneous AIO. Time periods with lowest tubular esterified cholesterol (EC) levels showed maximal SR-BI and SR-BII levels, and the periods when one or the other SR-BI isoform predominated showed increased EC levels and spermatogenic arrest in normal mink seminiferous tubules. In tubules with AIO, the predominance of only one or the other SR-BI isoform was the reverse of that measured in normal tubules, and it was associated with an increase in EC levels but not with apoptosis levels. SR-BI and SR-BII levels were not correlated with serum testosterone levels. SR-BI mainly localized to the Leydig cell, germ cell, and Sertoli cell surface, where its distribution was stage-specific. SR-BII was principally intracellular. Tubules from testes with AIO showed a deregulation of cholesterol homeostasis and SR-BI expression but relatively unchanged apoptosis levels. These results suggest that the expression of both SR-BI isoforms is required for the maintenance of low EC levels and that the predominance of only one isoform is associated with the accumulation of EC but not with apoptosis in the tubules.—Akpovi, C. D., S. R. Yoon, M. L. Vitale, and R-M. Pelletier. **The predominance of one of the SR-BI isoforms is associated with increased esterified cholesterol levels and not with apoptosis in mink testis.** *J. Lipid Res.* 2006. 47: 2233–2247.

Supplementary key words scavenger receptor class B type I • Sertoli cell • autoimmune orchitis • cell clearance • Leydig cell

The report of a high incidence of dyslipidemia in infertile men (1) is one of a body of evidence that cholesterol

is indispensable for gamete development and fertility (2–8). The source of cholesterol for Leydig cells is de novo synthesis and HDL, one of several lipoproteins transporting lipids from blood (9–11). In the seminiferous tubules, the other compartment of the testis, the basement membrane, which separates each tubule from blood capillaries, blocks LDL while allowing the entry of HDL (11), the major source of cholesterol for Sertoli cells (12). In addition, the blood-testis barrier formed by junctional complexes joining Sertoli cells (13, 14) has been said to be opposed to the entry of circulating cholesterol into the tubules (15). Although Sertoli cells show the capacity to synthesize cholesterol from acetate in vitro (16), there is no evidence that they do so in large amounts in vivo. Besides the blood circulation, cholesterol within the tubules themselves originates from the phagocytosis of lipid-containing residual bodies, lipid-rich cells, and apoptotic germ cells or their cell membrane remnants, which can represent up to 50% of cell loss in normal testis (17, 18). The observation that free cholesterol (FC) concentration in the interstitial tissue equals that in tubules (19, 20) entails factors regulating cholesterol influx and efflux to maintain equilibrium.

The nonenzymatic factors potentially involved in cholesterol homeostasis include ABCA1, which transfers cholesterol to apolipoprotein I (7, 21), and CD36 (22), which mediates the selective uptake of HDL cholesteryl esters and binds oxidized low density lipoproteins. In addition, scavenger receptor class B type I (SR-BI) selectively removes cholesteryl esters from the HDL to which it binds (23, 24) and contributes to the HDL-mediated cellular cholesterol efflux (25). Moreover, SR-BI is highly expressed in tissues with a strong cholesterol demand for steroidogenesis, such as adrenals, ovaries, and testes (23, 24). Experimental deficiency of SR-BI is accompanied by abnormal structure, composition, and abundance of lipoproteins, which alters the development of female gametes and

Manuscript received 10 April 2006 and in revised form 7 July 2006.

Published, JLR Papers in Press, July 21, 2006.
DOI 10.1194/jlr.M600162-JLR200

Copyright © 2006 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
This article is available online at <http://www.jlr.org>

¹To whom correspondence should be addressed.
e-mail: marc.pelletier@umontreal.ca

causes a significant proportion of ovulated oocytes to die soon after ovulation, resulting in sterility in *SR-B* gene-knockout female mice (26). SR-BII, a spliced variant of the *SR-B* gene that differs from SR-BI only in the C-terminal cytoplasmic domain, also binds HDL with high affinity (27). In contrast to SR-BI, SR-BII does not mobilize intracellular cholesteryl ester stores and is less efficient at promoting cellular cholesterol efflux (27), but it effluxes 2-fold more FC than SR-BI in macrophages (28). Nonetheless, SR-BI and SR-BII both colocalize with cholesterol-rich plasma membrane caveolae (28–31), which influence cholesterol homeostasis by acting as conduits for cellular flux (32) and concentrate signaling proteins for signal transduction (33).

Autoimmune orchitis (AIO) is characterized by an increase in serum anti-sperm antibody levels, inflammation of the testis, leukocyte infiltration, degeneration of the germinal epithelium, spermatogenic arrest, and infertility (34). Spontaneous AIO has been documented in human, dog, mink, and rat (35). The incidence of inflammation of the testis is high in infertile males, and testicular inflammation has been identified as a cause of infertility, although symptomatic orchitis caused by bacterial or viral infections is a rare occurrence in men (36). Immunological male infertility is associated with pathological features that resemble granulomatous orchitis, with inflammation of the testis and persistent infertility documented in infertile mink with spontaneous AIO (35). To assess whether testicular SR-BI, SR-BII, esterified cholesterol (EC), and FC were affected by an impaired clearance of apoptotic germ cells caused by AIO, measurements performed in mink with spontaneous AIO were compared with those in normal development and the annual reproductive cycle. The model provides a unique opportunity to highlight the relationship between apoptosis, germ cell removal, SR-BI expression, and cholesterol levels. This information is significant because injection of a part of the extracellular domain of rat SR-BI fused with human FC in the tubules was claimed to cause an increased numbers of apoptotic germ cells (37) and because phagocytosis of apoptotic germ cells by Sertoli cells was said to be mediated by SR-BI in rodents (31, 37–39).

This study shows that the time periods during the annual seasonal reproductive cycle characterized by high levels of SR-BI and SR-BII were accompanied by low EC levels in the tubules, whereas the periods characterized by the predominance of one of the two SR-BI isoforms were accompanied by high EC levels. These results show that tubules with AIO were characterized by a deregulation of cholesterol homeostasis and a concurrent deregulation of SR-BI and SR-BII expression. This study also shows that an increase in only one of the two SR-BI isoforms in the tubules with AIO was accompanied by increased EC levels but not by a significant increase in apoptosis levels, suggesting that the recognition and phagocytosis of apoptotic cells are distinct physiological events and that the engulfment of apoptotic cells by Sertoli cells is only partly dependent on SR-BI.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All mink (*Mustela vison*) purchased from Visonnière St. Damase (St. Damase, Québec, Canada) were individually caged, fed a high-protein diet, kept under natural lighting conditions, and allowed food and water ad libitum. After anesthesia by intraperitoneal injection of 0.9 ml/kg body weight sodium phenobarbital (Somnotol; MCI Pharmaceutical, Mississauga, Ontario, Canada) and 0.15 ml/kg body weight of a solution of 0.3 g/ml chloral hydrate in sterile saline, mink were decapitated and the trunk blood and tissues were collected. For studies on development, testes were harvested at 30 day intervals 1) during the neonatal period (60–90 days old), 2) during puberty (120, 150, 210, and 240 days old), and 3) by the onset of adulthood (270 days old). Adult mink testes were collected at 30 day intervals during the last week of the month throughout the annual reproductive cycle from 1–2 year old mink. The calendar of the monthly changes in germ cell population during the annual reproductive cycle and the method of Pelletier (40) for the identification of the 12 stages of the cycle of the seminiferous epithelium were used. Six normal mink per age group were used except when testes were small during puberty, when 6–10 mink were used.

For studies on infertile male mink, 2–3 year old mink that successfully mated and sired five litters of no fewer than four kits the year before but that were sterile during the current year and were diagnosed with spontaneous AIO were selected.

Clinical criteria of fertility

The ejaculated semen recovered from vaginal smears was evaluated with a light microscope, and the morphology, motility, and number of spermatozoa were assessed for each male mink during the mating season in March. For studies in infertile mink, those that failed to sire a litter, whose semen contained low counts of spermatozoa, immobile spermatozoa, or no spermatozoa with high serum levels of anti-sperm antibodies, and whose pathological features showed leukocyte infiltration and destruction of the seminiferous epithelium at autopsy typical of spontaneous AIO were used. Ten adult mink with AIO for February, March, and July (totaling 30 mink) were used. The right testis was processed for histological studies and the left for enriched tissue fractionation. The protocol was approved by the Université de Montréal Animal Care Committee.

Quantification of serum anti-sperm antibodies by ELISA

The methods of Ing et al. (41) and Benet-Rubinac et al. (42) were used as follows. One hundred microliters of spermatozoa suspended in PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) at a concentration of 1×10^6 cells/ml was added to each well (1×10^5 cells/well) of polystyrene flat-bottom plates (Immulon 2; Dynex Technology, Chantilly, VA), and the plates were centrifuged at 2,000 rpm in a GS-6R Beckman centrifuge (Beckman, Mississauga, Ontario, Canada) equipped with a GH 3.8 rotor at 4°C for 10 min. The supernatant was removed and the plates were dried. Spermatozoa were fixed in –20°C methanol for 30 min, dried, incubated with 1% BSA in PBS at 4°C overnight to eliminate nonspecific labeling, and washed in PBS containing 0.05% Tween 20. Spermatozoa were incubated first with various dilutions of mink sera (higher dilutions were needed when sera of infertile mink were used). Serum dilutions were prepared in 1% BSA in PBS ranging from 1:100 to 1:1,000. Spermatozoa were incubated with serum dilutions at 37°C for 1 h, next with rabbit anti-mink IgG (1:2,000 dilution) at 37°C for 1 h, and then with HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:2,000 dilution) at 37°C for 1 h. The reaction was detected by adding

100 μ l of substrate solution containing 0.4 mg/ml orthophenylene diamine and 0.015% hydrogen peroxide in citrate buffer, pH 5.0, and stopped by the addition of 25 μ l/well of 2 N sulfuric acid. Optical density was determined at 492 nm by an ELISA autoreader (Dynatech, Mississauga, Ontario, Canada). All samples were assayed in duplicate, and the results are expressed as fold dilution of serum where the absorbance value was 0.5.

Isolation of seminiferous tubule- and interstitial tissue-enriched fractions

Testes were decapsulated and immersed in PBS with or without phosphatase and protease inhibitors: 2 mM PMSF, 1 mM EGTA, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin, 4 mM Na_3VO_4 , 80 mM NaF, 20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, and 10 μ M potassium bisperoxol-(1,10-phenanthroline)oxovanadate. The seminiferous tubules were teased apart and individually detached from the interstitial tissue with fine tweezers. Next, the tubule-interstitial tissue mixture was placed in PBS with or without phosphatase inhibitors in a water shaker bath set at 80 cycles/min at 4°C for 1 h. The mixture was allowed to sediment for 1 h in 15 ml conical tubes on ice and centrifuged at 600 rpm for 20 min in a GS-6R Beckman centrifuge equipped with a GH 3.8 rotor at 4°C. The seminiferous tubule-enriched fraction (STf) occupied the pellet, and the interstitial tissue fraction (ITf) occupied the top. The fractions were washed in PBS or PBS containing proteases and phosphatase inhibitors, and their purity was evaluated by light microscopy. This represents a modification of a previously published isolation method in which mild enzymatic digestion with collagenase D and soybean trypsin inhibitor was used to separate tubules from the interstitial tissue (19). The protein content of the ITf and STf samples was measured (43).

Quantification of apoptosis by ELISA

Measurements were done using a cell death detection ELISA kit (Boehringer-Mannheim, Laval, Québec, Canada) in accordance with the manufacturer's instructions. The assay kit allows the quantification of mononucleosome- and oligonucleosome-bound DNA in the cytoplasmic fraction of a cell homogenate that is caused by DNA fragmentation during apoptosis. Briefly, STf homogenates were incubated with the lysis buffer at room temperature for 30 min and centrifuged at 15,000 rpm in a Beckman centrifuge (Palo Alto, CA) at 4°C for 30 min. The cytosolic fractions were collected, and 20 μ g of proteins was loaded onto streptavidin-coated microtiter plates, exposed to anti-histone biotin and peroxidase-conjugated anti-DNA antibody at room temperature for 2 h, washed, and incubated with 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzothiazoline sulfonate] diammonium salt substrate solution. The results are expressed in absorbance unit per milligram of protein STf (AU/mg). Samples were assayed in duplicate.

Epididymal spermatozoa

Epididymides from normal adult mink euthanized in February and March were diced in cold PBS with or without proteases and phosphatase inhibitors, filtered through a 74 μ m mesh, and centrifuged at 2,000 rpm for 15 min in a GS-6R Beckman centrifuge at 4°C to recover spermatozoa. The gametes were resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 8, containing 1 mM EDTA for 5 min to lyse epithelial and blood cells (44), washed twice, and diluted 1:1 in cold PBS with or without proteases and phosphatase inhibitors. The cells were sonicated in a Fisher Sonic Dismembrator (model 300; Fisher, Farmington, NY) during three 30 s intervals.

Antibodies against SR-BI and SR-BII

Three distinct antibodies were used for the detection of SR-BI and its isoform SR-BII: 1) the polyclonal antibody to SR-BI, which

recognizes only the SR-BI isoform, was raised in rabbit against a peptide antigen corresponding to residues 496–509 of mouse SR-BI; 2) the goat polyclonal antibody to SR-BI produced against a synthetic peptide made to the C-terminal region of murine SR-BI, corresponding to residues 400–509; and 3) the rabbit polyclonal antibody, which recognizes exclusively the SR-BII isoform, was produced against a peptide antigen corresponding to residues 491–506. In addition, the rabbit SR-BII antibodies were affinity-purified against the recombinant SR-BII coupled to a CNBr-activated Sepharose 4B column. Antibodies 1 and 3 above were purchased from Novus Biologicals (Littleton, CO). The goat polyclonal antibody to SR-BI was a generous gift from Novus Biologicals. The affinity-purified antibodies are specific for each isoform of SR-BI and do not cross-react with other proteins in Western blot analyses of tissue extracts. The specificity of SR-BI and SR-BII antibodies was tested using mouse tissue as a positive control. The primary or secondary antibody alone was used for negative controls.

Electrophoresis and Western blots

Twenty micrograms of total proteins for each STf and/or ITf sample was denatured in electrophoresis sample buffer and loaded on a 10% polyacrylamide minigel, subjected to electrophoresis, and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes blocked for 60 min at 37°C with 5% skim milk in TBS (140 mM NaCl and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) were incubated with purified anti-SR-BI (1:2,000 dilution) or anti-SR-BII (1:1,000) overnight and mixed with the corresponding HRP-conjugated secondary antibody. Some membranes were re probed with either a goat polyclonal antibody to human vimentin (Sigma, St. Louis, MO) (1:500 dilution) or a monoclonal anti-human clusterin (Novocastrol Laboratories, Ltd., New Castle upon Tyne, UK) (1:50 dilution).

For studies of AIO, myosin light chain (MLC) was used as an internal loading control. MLC has a molecular mass of 20 kDa, and the intensity of the band did not change in the different experimental conditions. The membranes between 40 and 50 kDa were incubated with monoclonal MLC antibody (Sigma) and then with anti-IgM peroxidase-conjugated antibody. Antigen-antibody complexes were revealed using enhanced chemiluminescence (Lumi-light⁺; Roche, Laval, Québec, Canada).

Plasma and testicular cholesterol analysis

Duplicate samples of enriched tissue fraction homogenates (60–80 μ l each) and serum (40–60 μ l) were extracted with 5 ml of hexane-isopropanol (3:2) for 30 min at room temperature and centrifuged at 2,500 rpm (GS-6R Beckman centrifuge) for 5 min (45). The supernatant was removed, and the extraction was repeated three times on the pellet. The supernatant from each sample was pooled, separated into two equal volumes, and evaporated at 37°C with N-EVAP Nitrogen Evaporators (Organomation Associates, Inc., Berlin, MA). Total cholesterol (TC) and unesterified FC were measured in the dried pellet from the 2 volumes with an enzymatic kit (Wako Chemical USA, Inc., Richmond, VA). EC levels were obtained by subtraction of FC from TC. EC and FC contents are expressed in μ g cholesterol/mg total protein for ITf and STf or in mg cholesterol/dl serum. The values are means \pm SEM from three independent experiments.

Immunolabeling

Testes were perfusion-fixed with Bouin's fixative (46). Endogenous peroxidase activity was inhibited with 0.3% hydrogen peroxide, and immunolabeling was performed (19). Nonspecific binding was blocked with 0.5–3.0% skim milk. Paraffin sections were incubated with rabbit anti-SR-BI (1:50 dilution), goat anti-SR-BI (1:100 dilution), or rabbit anti-SR-BII (1:25 dilution), then

with biotinylated anti-rabbit F(ab')₂ (1:10,000 dilution) or anti-goat IgG (1:2,000 dilution) and peroxidase-conjugated streptavidin (1:200 dilution) (20). Controls included either the first or the second antibody alone.

Fluorescence microscopy

Spermatozoa mounted on poly-L-lysine-coated cover slips were air-dried, fixed, and permeabilized with -20°C methanol for 10 min. Preparations were incubated with 3% skim milk in PBS to block nonspecific binding. Next, spermatozoa were incubated with purified anti-SR-BI (1:10 dilution) or anti-SR-BII (1:5 dilution) for 60–120 min at 37°C, rinsed with PBS, and incubated with FITC-conjugated anti-rabbit IgG (1:400 dilution) at 37°C for 1 h. Cover slips were mounted in PBS/glycerol (1:1) containing 5% 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]octane and visualized with a Carl Zeiss Axioskop II fluorescence microscope.

Measurements of serum testosterone levels

Testosterone concentration in mink sera was measured by ELISA using ALPCO diagnostics kits (American Laboratory Products Company, Salem, NH) (19). The sensitivity of the method was 0.07 ng/ml.

Data analysis and statistical analysis

The bands of five independent immunoblots of SR-BI and SR-BII obtained for each time interval studied in ITf and STf were scanned on an Astra 2000S laser scanner (Umax Data System, Inc., Hainchu, Taiwan). The relative SR-BI and SR-BII protein contents of scanned bands were estimated by densitometry (Scion Image Software, Scion Corp.). The values were normalized to 60 day values for the studies of development or to August values for the studies of adults. The data are presented as means ± SEM and were evaluated with Student's *t*-test.

Source of chemicals and antibodies

Poly-L-lysine and 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]octane were from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada), and PMSF, biotinylated anti-rabbit IgG, biotinylated anti-goat IgG, leupeptin, aprotinin, and the Lumi-light⁺ chemiluminescence detection kit were from Roche. Potassium bisperoxol-(1,10-phenanthroline) oxovanadate(V) was from Calbiochem (San Diego, CA). Biotinylated anti-rabbit affinity-purified F(ab')₂ fragment and peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, and anti-goat IgG were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Mississauga, Ontario, Canada).

RESULTS

In the mink, the neonatal period covers the first 90 days after birth, generally by May in the northern hemisphere, and it is followed by puberty, which lasts from day 91 to day 252 after birth. Spermatogenesis is completed by day 240 after birth. The appearance of spermatozoa in the epididymis 12 days later in January is the hallmark for the onset of adulthood (40). The annual seasonal reproductive cycle in the adult is composed of an 8 month long active spermatogenic phase, beginning with the division of spermatogonial stem cells in August and ending with the arrest of spermatogenesis by the last week of March. Spermatozoa are produced from January to March (40). This is followed by a 4 month long inactive spermatogenic phase, or tes-

ticular regression, from April until the end of July (40). The duration of the cycle of the seminiferous epithelium lasts 58 days in mink (47).

Western blot analyses of SR-BI and SR-BII in mink and mouse tissue fractions

When anti-SR-BI was used, one immunoreactive band was detected in the ITf and one in the STf (Fig. 1). Although the molecular mass was the same in both mink tissue fractions, the mass was 82 kDa in mink and 85 kDa in mouse (Fig. 1). Anti-SR-BII showed a molecular mass of 85 kDa in the two tissue fractions in both species (Fig. 1).

Western blot analyses of SR-BI and SR-BII in mink tissues

The intensity of the SR-BI immunoreactive band was strongest in mink ITf followed by the liver, STf, kidney, small intestine, and lung. The heart and brain contained traces (Fig. 2A). The intensity of the SR-BII immunoreactive band was strongest in the ITf and next in the STf and kidney (Fig. 2B). Contrary to SR-BI, the liver and small intestine contained only traces of SR-BII (Fig. 2B).

Measurements of SR-BI and SR-BII levels in the ITf

During development, SR-BI levels increased from 90 to 180 days, then leveled off until 270 days (Fig. 2C). During the annual cycle, SR-BI levels decreased significantly by March, leaving traces from April to June, but increased significantly by July and stayed high from August until February (Fig. 2D).

During development, traces of SR-BII were detected from 60 to 120 days, but the levels increased significantly from 120 to 150 days, from 150 to 180 days, and from 210 to 240 days (Fig. 2E). In contrast to SR-BI (Fig. 2D), SR-BII levels were low from July to October but high from November to June (Fig. 2F). SR-BII levels increased significantly from October to November (Fig. 2F) but decreased from June to July (Fig. 2F).

Measurements of SR-BI and SR-BII levels in the STf

During development, SR-BI levels increased significantly from 120 to 150 days, when they peaked and reached values

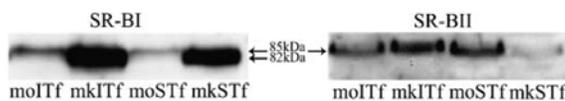


Fig. 1. Specificity of anti-scavenger receptor class B type I (SR-BI) and anti-SR-BII antibodies in mink and mouse seminiferous tubule-enriched fraction (STf). Representative Western blots show one immunoreactive band of 82 kDa in interstitial tissue fraction (ITf) (mkSTf) and STf (mkSTf) from adult mink in February, when anti-SR-BI antibodies were used. In mouse ITf (moITf) and STf (moSTf), the band shows a molecular mass of 85 kDa with the same antibodies. When SR-BII antibodies were used on the same samples, the immunoreactive band detected had a molecular mass of 85 kDa in the ITf and STf of both species.

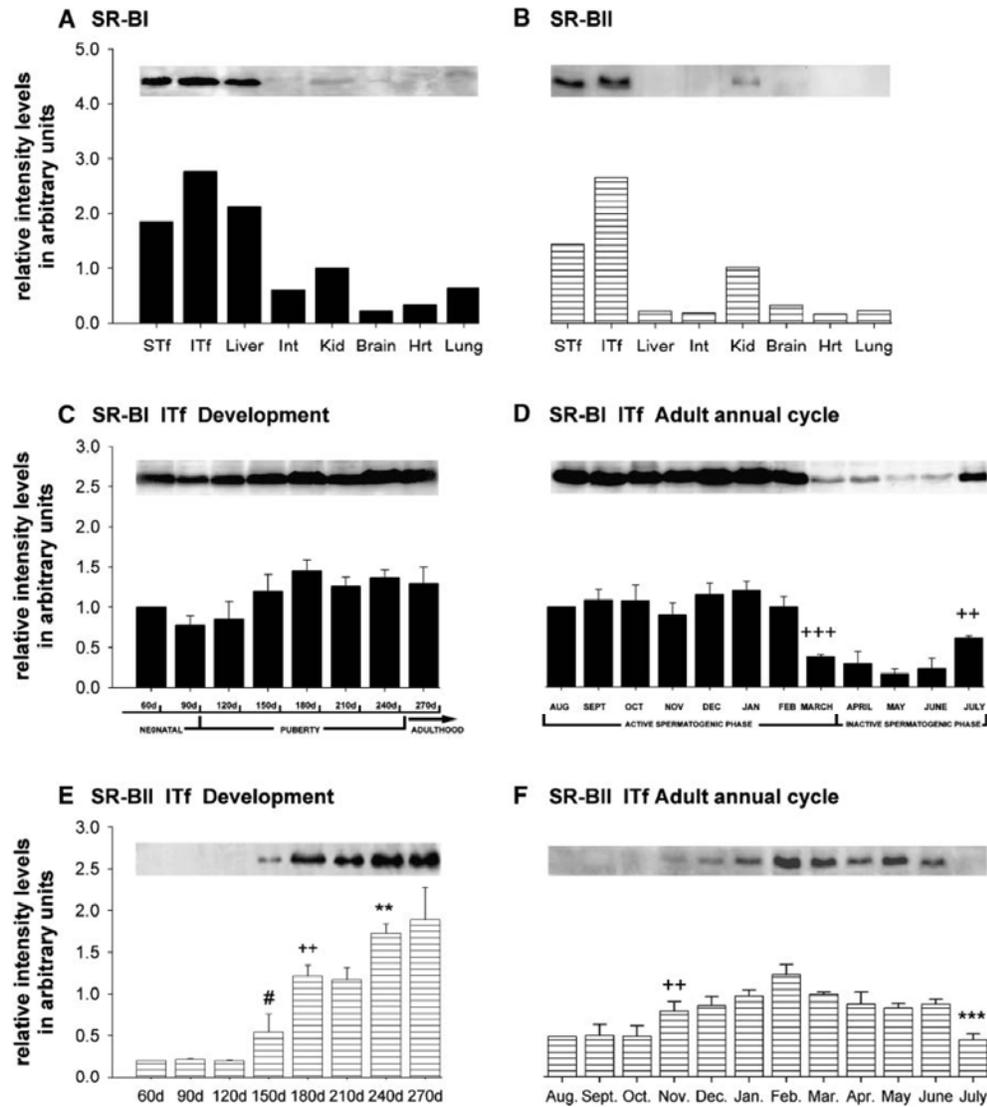


Fig. 2. Assessment of SR-BI and SR-BII levels in mink tissues and in the ITf during development and the annual reproductive cycle. A: Representative Western blot analysis of SR-BI showing that the molecular mass of SR-BI was 82 kDa in all of the mink tissues assayed. The histogram shows SR-BI protein levels expressed in arbitrary units. The SR-BI levels were highest in ITf followed by STf, liver, kidney (Kid), lung, and small intestine (Int). The brain and heart (Hrt) contained traces of the protein. B: Representative Western blot analysis of SR-BII. The intensity of the 85 kDa immunoreactive band was strongest in the ITf followed by the STf and kidney. Weak traces of the protein were present in the lung, small intestine, brain, and heart. The SR-BII protein levels are expressed in arbitrary units. C, D: Western blot analyses of SR-BI in ITf obtained monthly throughout development (C) and during the seasonal annual reproductive cycle in the adult (D). Representative Western blots show that the 82 kDa SR-BI-immunoreactive band is detected throughout both development and the annual reproductive cycle in the adult. The intensities of the bands obtained in six independent experiments were normalized to the 60 day data for development or to the August data for the annual reproductive cycle. The values shown are means \pm SEM. $^{+++} P < 0.00001$, February versus March; $^{++} P < 0.001$, June versus July. E, F: Representative Western blot analyses of SR-BII in the ITf obtained monthly during development (E) and throughout the annual reproductive cycle (F). The intensities of the bands obtained in six independent experiments were normalized to the 60 day data for development or to the August data for the annual cycle. The values shown are means \pm SEM. $^{\#} P < 0.02$, 120 versus 150 days; $^{++} P < 0.001$, 150 versus 180 days; $^{**} P < 0.005$, 210 versus 240 days $^{***} P < 0.00005$.

that neared twice the ITf values before decreasing until 270 days; the decrease was significant between 180 and 210 days (Fig. 3A). During the annual reproductive cycle, SR-BI levels were increased by August, then they decreased significantly by September before increasing again to reach peak values until February (Fig. 3B). From February

to March, there was a very significant decrease in SR-BI levels, and only traces of the receptor were detected from April to June. However, this was followed by a significant increase in SR-BI levels from June to July (Fig. 3B). SR-BI was detected in epididymal spermatozoa isolated from adult mink in February and March (Fig. 3B).

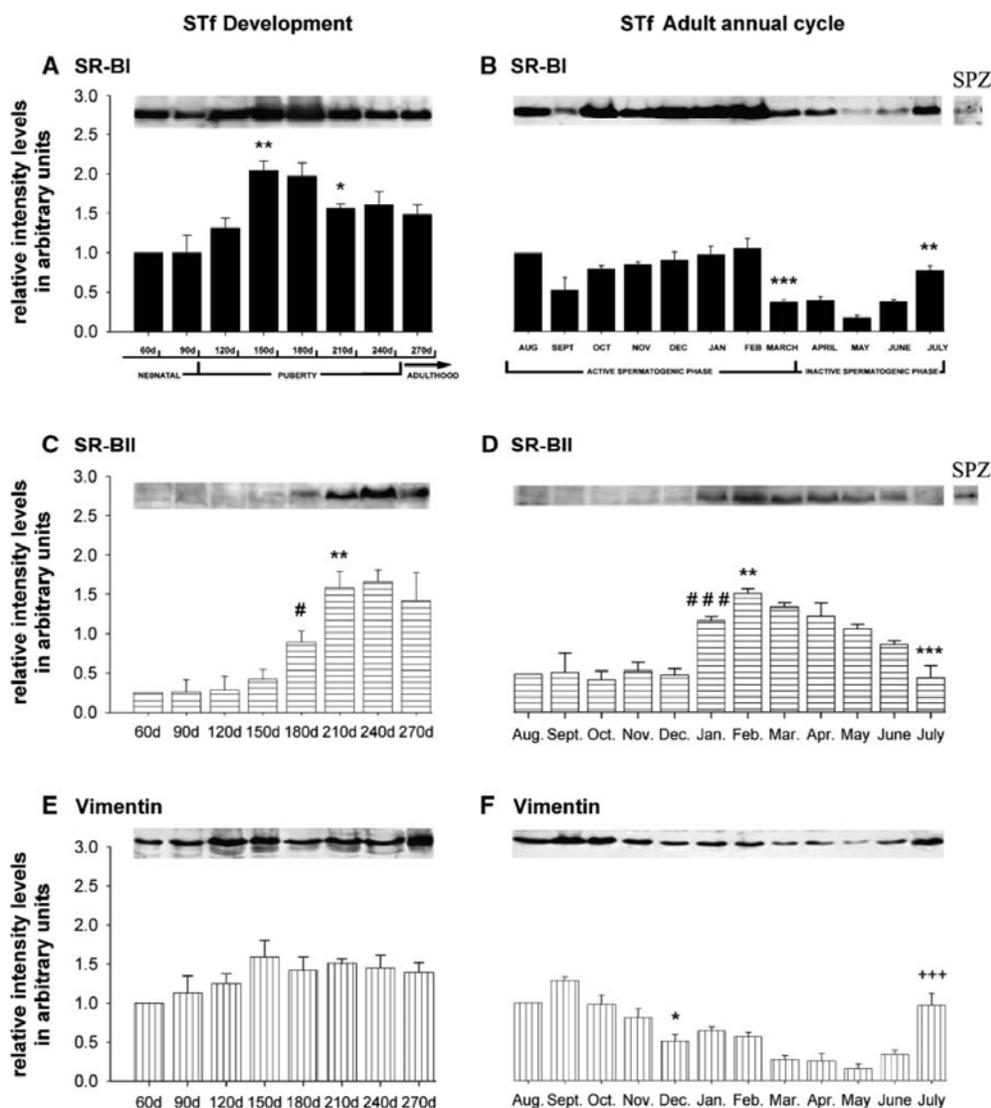


Fig. 3. Measurements of SR-BI and SR-BII levels and of vimentin in the STf during development and the annual reproductive cycle. A, B: Representative Western blot analyses of SR-BI in the STf obtained monthly during development (A) and the annual reproductive cycle (B) and in epididymal spermatozoa (SPZ). * $P < 0.05$, 180 versus 210 days and August versus September; ** $P < 0.005$, 120 versus 150 days and June versus July; *** $P < 0.00005$, February versus March. C, D: Representative Western blot analyses of SR-BII in the STf obtained monthly during development (C) and the annual reproductive cycle (D) as well as in epididymal spermatozoa. # $P < 0.02$, 150 versus 180 days; ### $P < 0.00002$, December versus January; ** $P < 0.005$, 180 versus 210 days and January versus February; *** $P < 0.00005$, June versus July. E, F: Representative Western blot analyses of vimentin performed on the same membranes for which the Western blots of SR-BI had been done. * $P < 0.05$, November versus December; +++ $P < 0.00001$, June versus July. The intensity of the bands obtained in six independent experiments was measured to generate histograms, and values were normalized to the 60 day data for development or to the August data for the annual cycle. All values shown are means \pm SEM.

During development, in contrast to SR-BI (Fig. 3A), there were only traces of SR-BII from 60 to 150 days, and the first significant increase in SR-BII occurred from 150 to 180 days (Fig. 3C). This 150–180 day SR-BII increase (Fig. 3C) was roughly concomitant with a decline in SR-BI levels in the STf (Fig. 3A). A second significant SR-BII increase occurred from 180 to 210 days (Fig. 3C). During the annual reproductive cycle, in contrast to SR-BI (Fig. 3B), SR-BII appeared in traces from August to December (Fig. 3D). The SR-BII levels were very significantly increased from December to January and again from January to February before decreasing from July to December (Fig. 3D). The SR-BII decrease was significant from June to July, and this (Fig. 3D) was concomitant with a significant SR-BI increase in July (Fig. 3B). Thus, SR-BII and SR-BI levels were inversely related to each other in the STf except for during the months of January and February. SR-BII levels were increased when the number of germ cells was high from January to June (Fig. 3D), suggesting that SR-BII is chiefly associated with germ cells and SR-BI is chiefly associated with Sertoli cells and germ cells. Spermatozoa contained SR-BII (Fig. 3D).

The immunoblot membranes used to measure SR-BI expression in the STf were stripped and probed for vimentin (Fig. 3E, F) and clusterin (data not shown because clusterin and vimentin variations were similar). The vimentin levels showed a profile of variations (Fig. 3E, F) reminiscent of that of SR-BI (Fig. 3A, B) but not SR-BII (Fig. 3C, D), suggesting that SR-BI is associated partly, albeit not exclusively, with Sertoli cells. This observation adds further support to the contention that SR-BII is principally associated with germ cells, because vimentin and clusterin have been considered to be normally synthesized by Sertoli cells, not germ cells.

Immunohistochemical studies of SR-BI

SR-BI localized to germ cells and Sertoli cells in a stage-specific manner in adult mink testes harvested in February (Fig. 4A–D). SR-BI localized at the surface of the thin Sertoli cell cytoplasmic processes surrounding the germ cells during stage I (Fig. 4A). By stages VII and VIII, intercellular Sertoli cell junctional membranes in the vicinity of spermatocytes near the basal third of the epithelium (Fig. 4B, C) and the “trunk” of the supporting cells were labeled (Fig. 4D). The cell surfaces in the intercellular clefts between zygotene spermatocytes and Sertoli cell as well as those between adjoining Sertoli cell processes were SR-BI-positive during stage X (Fig. 4D). Stage X is concomitant with the spermatocyte migration from the basal to the luminal compartment in mink. SR-BI-positive material was detected at the germ cell’s surface and within the cytoplasm, where it appeared as SR-BI-positive minute dots (Fig. 4A–D). Intracellular SR-BI-positive clumps were present in apoptotic germ cells (Fig. 4B). SR-BI localized to the Leydig cell surface (Fig. 4E).

The histological changes during puberty are similar to those of the testicular regression in reverse sequence in mink testis (40). Because changes in SR-BI immunolocal-

ization during puberty during testicular regression were similar, only data recorded during the later period are presented here (Fig. 4F–H). SR-BI-positive dots were detected within the Sertoli cells’ trunk (Fig. 4F), but cytoplasmic labeling decreased during testicular regression (Fig. 4H). In addition, the cell surface of Sertoli cells and germ cells was labeled; Sertoli cell membrane segments facing degenerating germ cells were intensely labeled (Fig. 4F–H). Sertoli cells contained large SR-BI-positive vacuoles after germ cells had been cleared from the tubules (Fig. 4G). Intracellular SR-BI-positive clumps were observed in germ cells undergoing apoptosis (Fig. 4F–H).

Immunohistochemical studies of SR-BII

Most SR-BII was detected intracellularly in the vicinity of the nucleus in germ cells (Fig. 5A, B) and Sertoli cells (Fig. 5A) in adult mink testes harvested in February, but this distribution did not change with the stage of the cycle (Fig. 5A, B). In addition, intercellular clefts between Sertoli cells and germ cells were weakly immunostained during stage X (Fig. 5B). The endothelial cells of blood vessels and other interstitial cells, but not Leydig cells, were SR-BII-positive (Fig. 5C). During testicular regression, the Sertoli cell surface was very weakly SR-BII-immunoreactive, although the immunoreactivity in this location was increased by May and June (cf. Fig. 5D, E with Fig. 5F). In addition, the intracellular immunoreactivity of SR-BII was localized to germ cells, in particular round spermatids and cells that showed signs of apoptosis (Fig. 5A). The protein was not detected in the interstitial space during testicular regression (Fig. 5D–F).

Immunofluorescence studies on epididymal spermatozoa

Spermatozoa incubated with the second antibody alone showed occasional nonspecific weak staining of the mitochondrial sheath in the tail (Fig. 6A). Scattered SR-BI-positive clumps covered the anterior acrosomal segment, and the mitochondrial sheath was labeled (Fig. 6B). SR-BII localized to the anterior acrosomal segment but more intensely than SR-BI in the same region, and the mitochondrial sheath was not labeled (Fig. 6C).

Measurements of FC and EC levels in the ITf and STf and serum

The developmental and seasonal FC and EC level variations in the ITf, STf, and serum are shown in Fig. 7. In the ITf, during development, FC levels reached a plateau at ~45 µg cholesterol/mg protein by 120 days until adulthood. Conversely, the increase in EC levels from 90 to 150 days was followed by a significant decrease ($P < 0.01$, 150 vs. 180 days old) by 180 days. In adult mink, FC levels were approximately three times the EC values. FC and EC levels were lower during the periods when spermatogenesis was completed (from December to March) than when it was not (the rest of the annual reproductive cycle). In the STf, FC values were three times the EC values. During development, FC levels showed no significant changes but EC levels decreased, although not significantly, until adult-

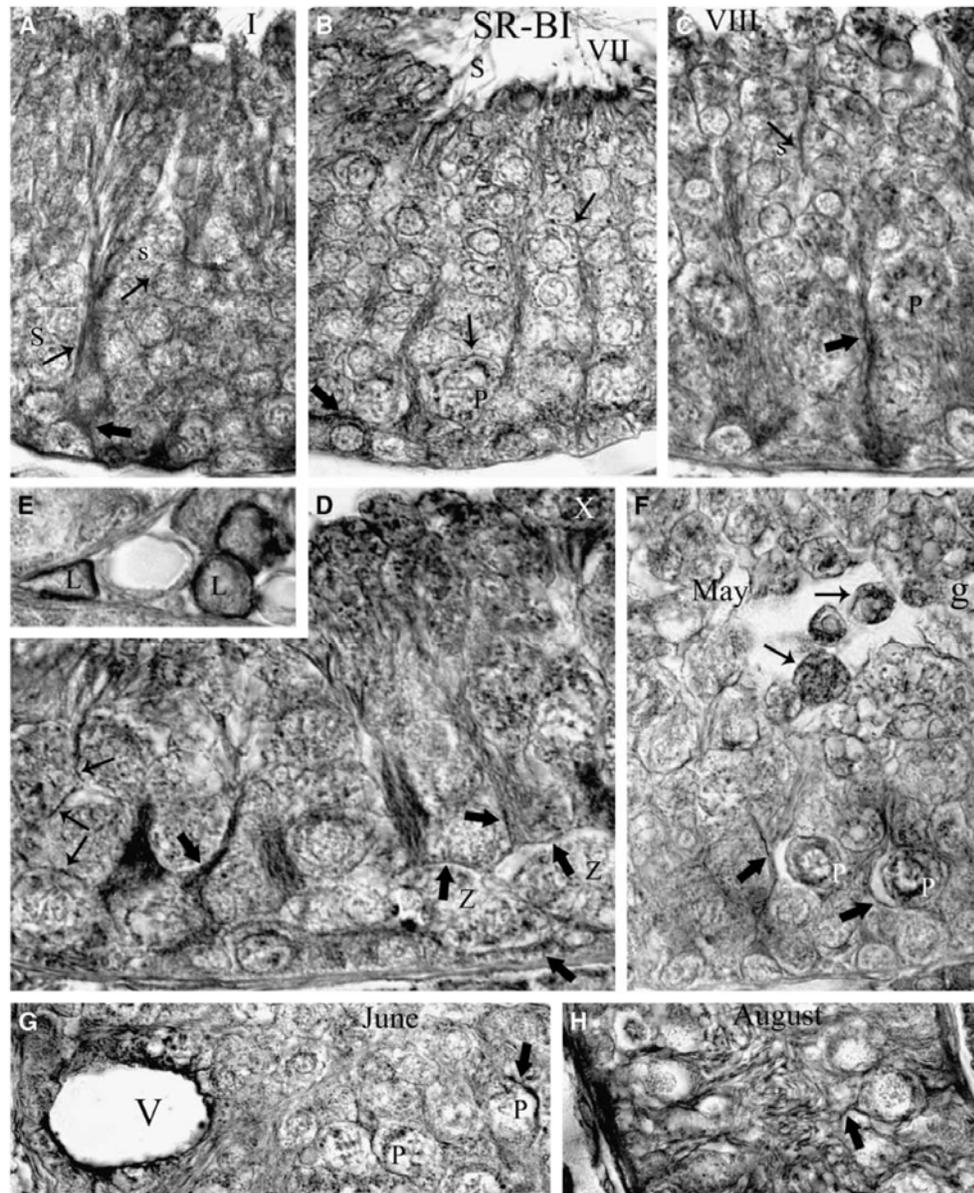


Fig. 4. Immunolocalization of SR-BI in adult mink testis. A–D: The stages of the cycle of the seminiferous epithelium appear in roman numerals at the top of the panels. SR-BI-positive dots are identified in germ cells. P, pachytene spermatocytes; s and S, rounded (s) and elongated (S) spermatids; Z, zygotene spermatocytes. In B, a pachytene spermatocyte showing signs of apoptosis contains clumps of SR-BI-positive material. In addition, the protein localizes at the surface of germ cells (thin arrows). In the Sertoli cell's cytoplasm, SR-BI labeling is abundant near the basal third of the epithelium (thick arrows in A–D). In addition, the localization of the protein coincides with the localization usually agreed to be that of the cell junctions within the Sertoli cell junctional complexes (thick arrows in B–D). Labeling in this location of the seminiferous epithelium is particularly intense during stage X of the cycle (D). It is apparent in the intercellular cleft separating zygotene spermatocytes from the neighboring Sertoli cells (the three thick arrows near the lowest zygotene spermatocytes in D) and in the clefts between adjacent Sertoli cells (the thick top right arrow in D and the thick arrow in C). Magnification, $\times 1,310$. E: Within the interstitial tissue, SR-BI immunoreactivity was detected on the Leydig cell surfaces (L). Magnification, $\times 1,100$. F: A tubule with a lumen in May. g, giant cell. G, H: Tubules with a collapsed lumen in June and August, respectively. SR-BI labeling is visible at the surface [thick arrows in F–H and along the outline of the large vacuole (V) in G] and in the Sertoli cell's cytoplasm principally near the basal third of the epithelium (thick arrows) and at the germ cell surface (P in F, G). SR-BI-positive clumps are identified in apoptotic germ cells (P in F, G and thin arrows in F). Magnification, $\times 780$.

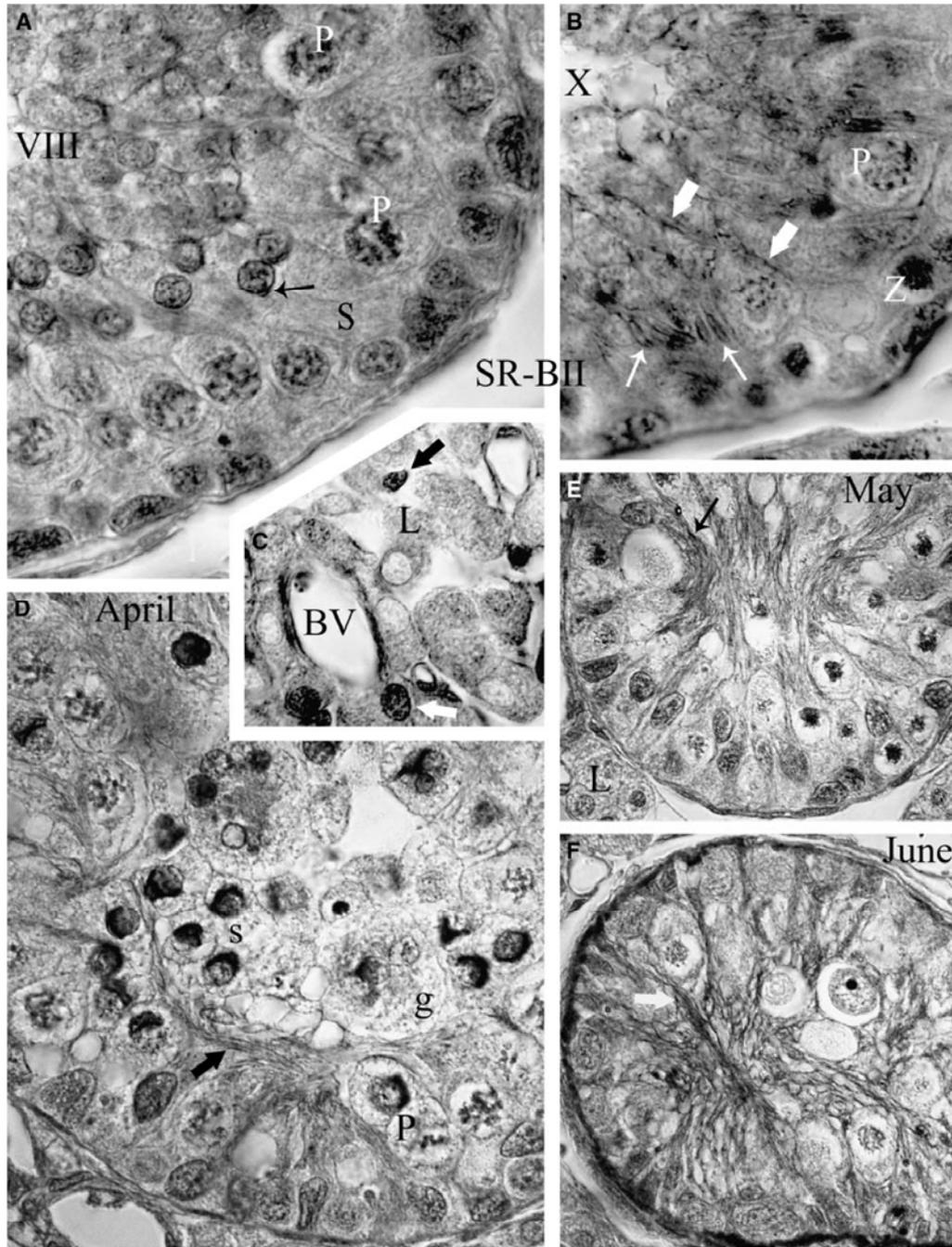


Fig. 5. Immunolocalization of SR-BII in adult mink testis. A, B: The stages of the cycle of the seminiferous epithelium appear in roman numerals at the top of the panels. SR-BII localizes to pachytene (P) and zygotene (Z) spermatocytes, round and elongated spermatids (thin arrows), and Sertoli cells (S). Labeling is visible near the nucleus (A, B) and at the Sertoli cell-germ cell interface (thick arrows in B). C: In the interstitial tissue, endothelial cells in blood vessels (BV) and interstitial cells (thick arrows) resembling macrophages are immunostained, but Leydig cells (L) are not. D: A tubule with a lumen in April. E, F: Tubules with a collapsed lumen in May and June, respectively. SR-BII labeling is weak at the surface of Sertoli cells, but immunoreactivity in this location is increased by May and June (thin arrows in D-F). SR-BII-positive material is detected in germ cells, particularly round spermatids showing signs of degradation; some spermatids are gathered into giant cells (g) and disposed like a plug in the reduced lumen (D). In June, the base of Sertoli cells is SR-BII-positive (F). Magnifications, $\times 1,000$ (A, C); $\times 880$ (B); $\times 1,190$ (D); $\times 880$ (E, F).

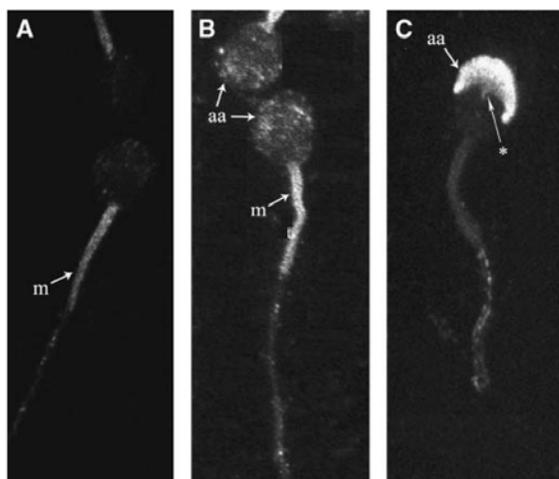


Fig. 6. Immunofluorescence localization of SR-BI and SR-BII in epididymal spermatozoa. A: Controls with the first or second antibody alone showed inconsistent weak staining in the mitochondrial sheath (m). B: SR-BI is localized over the anterior acrosomal segment (aa) and scattered in clumps; the mitochondrial sheath is also labeled. C: The anterior acrosomal segment is strongly SR-BII-positive and is ended by a distinct shape reminiscent of a pair of eyebrows (asterisk) next to the equatorial segment, which itself is not labeled. Magnification, $\times 980$.

hood. In the adult, FC levels decreased from December to March. The profile of the EC levels in the STF was reminiscent of that in the ITf, except that the November-to-December decrease ($P < 0.01$) was significant and there was a significant increase from March to April ($P < 0.02$) followed by a significant decrease from April to May ($P < 0.05$). Serum FC and EC values were near each other and ranged between 80 and 90 mg cholesterol/dl serum and 90 and 104 mg cholesterol/dl, respectively, without showing significant differences.

Studies on adult mink with spontaneous AIO

SR-BI and SR-BII levels in the STF of normal mink and mink with AIO. In **Fig. 8**, for each month studied, the control value was set at 1 and the AIO values were compared with the corresponding controls. SR-BI levels were increased significantly in mink with AIO in February ($P < 0.02$, AIO vs. normal). However, control SR-BI values did not differ significantly from those in mink with AIO in March and July. SR-BII levels were not significantly higher in mink with AIO than in controls in February. However, SR-BII was decreased significantly by March ($P < 0.02$, AIO vs. normal) and increased significantly by July ($P < 0.05$, AIO vs. normal).

FC and EC levels in the STF in normal mink and mink with AIO. There were no significant differences between normal and AIO FC values (**Fig. 9**). However, EC levels tended to be higher in mink with AIO than in normal mink in the 3 months studied, and the difference was significant ($P < 0.02$, AIO vs. normal) by March.

Apoptosis levels measured by cell death detection with ELISA in the cytoplasmic fraction of the STF obtained from adult normal fertile mink and mink with AIO. Apoptosis levels were higher in mink with AIO than in normal mink in February, but the values were not significantly different for any of the months studied (**Fig. 10**).

Serum testosterone levels

Serum testosterone levels were significantly lower in mink with AIO than in normal mink in February and March but not in July (**Table 1**).

DISCUSSION

SR-BI is an integral membrane cell glycoprotein well preserved among mammalian species, given that the predicted protein sequences of hamster, mouse, rat, cow, and human have been reported to nearly 80% identity (48, 49). The SR-BI-immunoreactive band showed a molecular mass of 82 kDa in mink. This observation differs from the report of dimeric (164 kDa) and hetero/oligomeric forms in rat (50, 51) and from that of a "discreet signal with a molecular mass of ~ 70 kDa" in membrane subfractions of primary cultured, pubertal 20 day old rat Sertoli cells and liver (38).

Cholesterol and apoptosis levels

Our results show that measurements generated with the N-EVAP Nitrogen Evaporator reflect real FC and EC levels and substantiate the data we had obtained previously by TLC (20).

Apoptosis levels measured by ELISA in whole testis extracts (52) and in enriched STFs (our unpublished results) showed a 2-fold increase in March and July in normal mink. The phagocytosis of massive numbers of apoptotic cells entails a cholesterol buildup that results in increased EC levels by March and April, whereas the decreased EC levels in July reflect reduced cholesterol amounts originating from fewer apoptotic cells remaining during this period. The observation of infrequent apoptotic figures in February in mink testis sections despite the report that apoptosis-mediated germ cell death accounts for half of the cell loss in normal testis (17, 18) implies a rapid removal and disposal by Sertoli cells. Moreover, our observation that low EC levels in February prevailed suggests a contribution of SR-BI/SR-BII to the removal of cholesterol-containing germ cells from the tubules back to the liver for the reverse transport of peripheral cholesterol during periods of spermatogenic activity. In normal mink, EC levels were lowest when SR-BI and SR-BII expression were both high, but the levels increased when only one isoform was predominant in the tubules. This suggests that the maintenance of low EC levels requires both isoforms and that each one influences cholesterol in a distinct manner in normal tubules. However, impaired clearance of cholesterol-containing apoptotic cells by Sertoli cells deregulates cholesterol homeostasis and results in increased EC levels in mink tubules with AIO, in which a significant

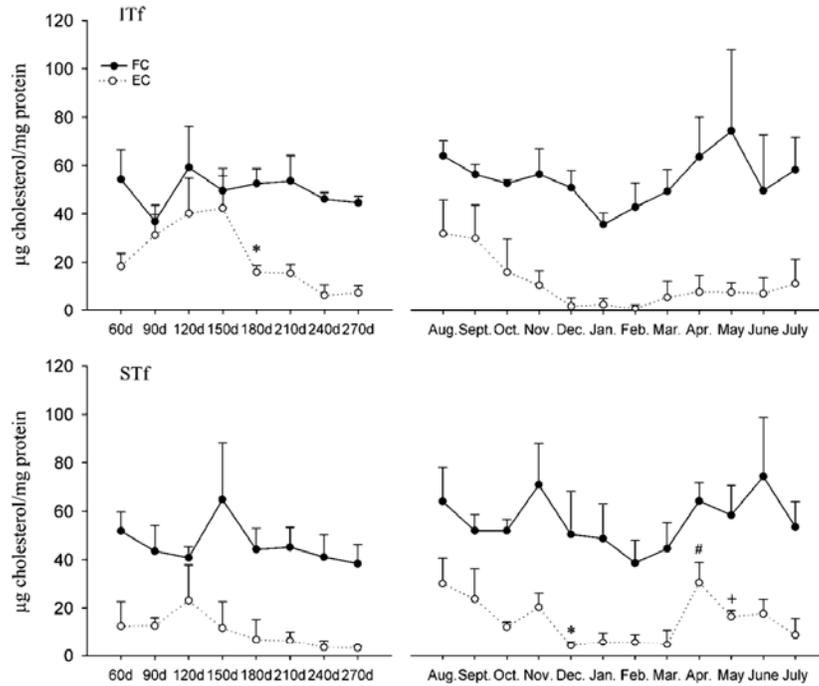


Fig. 7. Free cholesterol (FC) and esterified cholesterol (EC) levels in normal STf and ITf and serum. FC (closed circles) and EC (open circles) are expressed in µg cholesterol/mg total protein for the ITf and STf. The values shown are means ± SEM of three independent experiments. In the ITf (top), FC levels from 120 to 270 day old mink were not significantly higher than those from 90 day old animals. However, EC levels decreased significantly (* $P < 0.01$) from 150 to 180 days. In adult mink, FC and EC levels were both lower, but not significantly, in January and February than during the remainder of the annual reproductive cycle. In the STf (bottom), FC and EC levels were not significantly different during development. However, in the adult, EC but not FC showed significant differences during the annual reproductive cycle. EC levels decreased significantly from November to December (* $P < 0.01$), they increased from March to April (# $P < 0.02$), and finally, they decreased from April to May (+ $P < 0.05$).

EC increase was accompanied by a decrease in SR-BII but not SR-BI in March. This observation is consistent with the report that experimental hepatic overexpression of SR-BI induces a significant diminution of HDL cholesterol (53).

We show here the first measurements of SR-BI and SR-BII in individual compartments rather than in whole testis extract. Regarding the tubular compartment, the results with vimentin, a marker for Sertoli cells, showed that the

concentration of vimentin-containing Sertoli cells in STf samples was lowest during periods when spermatogenesis was near completion, although the total Sertoli cell number per testis remained constant regardless of spermatogenic activity through the annual reproductive cycle. In addition, the vimentin concentration profiles during the development and annual cycle were similar to those in SR-BI. Therefore, SR-BI variations are concomitant with those in the proportion of Sertoli cells relative to the germ cell

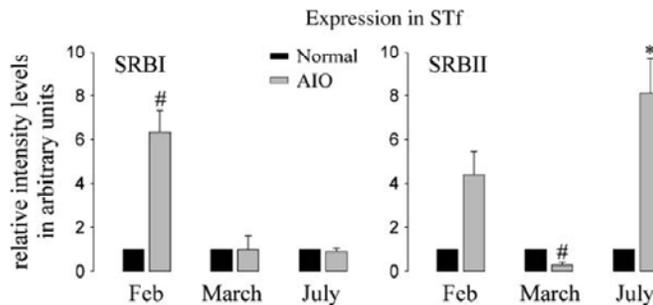


Fig. 8. Measurements of SR-BI and SR-BII levels in the STf in normal fertile adult mink and in mink with autoimmune orchitis (AIO) in February, March, and July. The SR-BI levels were very significantly increased in mink with AIO in February (# $P < 0.02$, AIO vs. normal) but not in March and July. SR-BII levels were significantly decreased by March (# $P < 0.02$, AIO vs. normal) but increased by July (* $P < 0.05$, AIO vs. normal). The values shown are the mean ± SEM of three independent experiments.

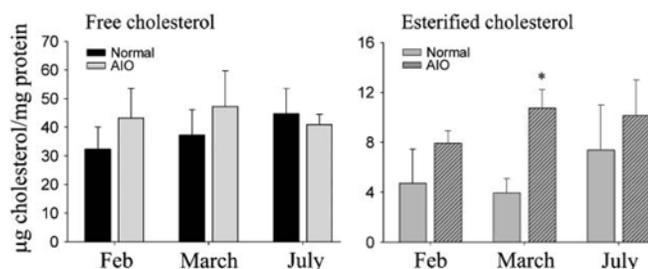


Fig. 9. FC and EC levels in the STF in normal fertile adult mink and mink with AIO in February, March, and July. Normal versus AIO mink FC levels (expressed in μg cholesterol/mg total protein) were not significantly different in February, March, and July, but the EC levels tended to be higher in mink with AIO than in normal mink. In March, the difference was significant (* $P < 0.02$, AIO vs. normal). The values shown are means \pm SEM of three independent experiments.

population in the sample. This does not exclude the possibility that the profile of variations in vimentin or in SR-BI indicates a specific change in vimentin and SR-BI gene expression. The predominance of SR-BI from July to February and of SR-BII from January to June suggests that an increase in SR-BII causes a restriction in SR-BI expression in normal mink tubules. During AIO, however, the feedback mechanism responsible for the expression in tandem of each isoform is perturbed, as shown by the observations that SR-BI and SR-BII expression was concurrent and that SR-BI increased in February but SR-BII increased in July, opposite of the normal measurements.

SR-BI/SR-BII expression and apoptosis levels

Our results show that the peak in apoptosis levels reported in whole testis extracts (52) and tubule-enriched fractions (our unpublished data) in March corresponds to increased SR-BII levels, whereas the peak in apoptosis recorded in July corresponds to high SR-BI levels. This could suggest the involvement of a distinct isoform in the removal of distinct generations of germ cells in normal tubules. However, our observation that increased SR-BI and/or SR-BII levels were not accompanied by significant increases in apoptosis in mink with AIO in February and July agrees with the reports that the expression of indi-

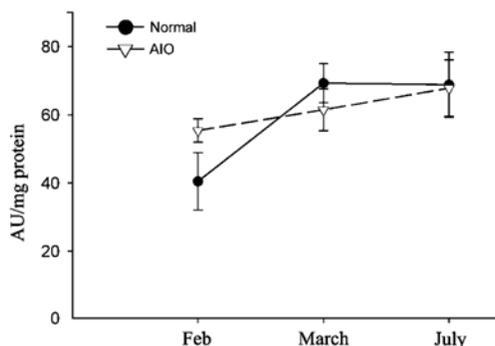


Fig. 10. Apoptosis levels measured by cell death detection. ELISA in the cytoplasmic fraction of STF from normal fertile mink and mink with AIO. The data are expressed as optical density at 410 nm, and the values represent means \pm SEM of measurements performed in six different animals per experimental condition. Apoptosis levels in fertile and infertile STF were not significantly different.

vidual receptors (54–56) and the genetic deletion of scavenger receptor A (57) only produce minimal effects on the uptake of apoptotic cells in culture. Our results suggest that other multiligands besides SR-BI/SR-BII are involved in apoptosis and that this process is not causally related to SR-BI expression in testis. However, our results contrast with the report that injection of rat SR-BI into seminiferous tubules causes an increase in the number of apoptotic cells identified with the Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL) method in mice (37). The TUNEL measures apoptotic cells not engulfed and remaining in tubules (i.e., clearance by Sertoli cells), whereas ELISA measurements reflect real apoptosis levels. Other studies have reported an increase in in situ end labeling (ISEL)-positive apoptotic germ cells in the tubules during experimental AIO in rat (58). More importantly, our finding of increased numbers of apostain-labeled apoptotic germ cells in mink tubules in which apoptosis levels measured by ELISA were not increased is proof that cell clearance is impaired during spontaneous AIO in mink (our unpublished data). Apoptosis is characterized by the appearance of plasma membrane blebs that have been shown to express externalized phosphatidylserine and to constitute sites for C1q and C-reactive protein binding, both of which are events connected with the noninflammatory clearance of cellular debris (59). The finding that phagocytosis of apoptotic germ cells was inhibited by liposomes containing phosphatidylserine (60) and/or by anti-SR-BI antibody provides strong support for the conclusion that SR-BI acts as a phosphatidylserine receptor (38).

Here, we show deregulated SR-BI and SR-BII expression in mink testis with AIO, which could alter the bleb recognition of dying germ cells and lead to impaired clearance

TABLE 1. Serum testosterone levels in normal adult mink and mink with AIO

Month	Normal	AIO
February	9.58 \pm 1.74 (n = 7)	1.93 \pm 0.52 (n = 6) ^a
March	1.65 \pm 0.62 (n = 8)	0.33 \pm 0.09 (n = 9) ^b
July	0.64 \pm 0.08 (n = 4)	0.44 \pm 0.09 (n = 4)

AIO, autoimmune orchitis. Testosterone levels in serum measured by ELISA are expressed in ng/ml serum. The values shown are means \pm SEM, and the number of animals in which the measurements were performed is indicated in parentheses.

^a $P < 0.03$, AIO versus normal in February.

^b $P < 0.05$, AIO versus normal in March.

by Sertoli cells. A deficit in SR-BI-mediated recognition of the nuclear antigens that have been shown to redistribute in blebs and apoptotic bodies (61) could favor intolerance to self proteins. The observation here that an increase in SR-BI or SR-BII was accompanied by minimal effects on apoptosis levels supports the notion that the recognition and phagocytosis of apoptotic cells are distinct physiological events and that the engulfment of apoptotic cells by Sertoli cells is only partly SR-BI-dependent.

The distribution of SR-BI and SR-BII

The interstitial compartment. Our finding of SR-BI at the mink Leydig cell plasma membrane agrees with similar findings in rat (62, 63). However, the discrepancy between our observation of a strong rather than “a very weak SR-BI staining” and “barely detectable” (62) SR-BI levels likely stems from the fact that mink Leydig cells are rich (64), whereas rat Leydig cells are poor, in cholesteryl ester-containing lipid droplets (65) and in the use endogenous, not exogenous, blood-borne HDL or LDL cholesterol for the purpose of testosterone production (62).

The seminiferous tubules. Our observation of SR-BI localized to mink Sertoli cells agrees with the finding of the receptor protein and mRNA (39) and of SR-BI as a phagocytosis-inducing phospholipid phosphatidylserine receptor in rat Sertoli cells (37). In addition, our detection of SR-BI on testicular cell and spermatozoan surfaces and of SR-BII on the inner acrosome overlying the nucleus is consistent with the report of ~70% of SR-BI on the cell surface and ~80–90% of SR-BII around the Chinese hamster ovary cell nucleus (66). In addition, our localization of SR-BI to mink Sertoli cell junctional membranes, except when it accumulates in the trunk of the cell during stage X of the cycle of the seminiferous epithelium, entails factors modifying its location to adapt to the physiological activities of the cell. This view is supported by the report of decreased SR-BI mRNA expression during stages I–VI in rat (39). In addition, SR-BI was reported to modify the structure of the membrane (67, 68) and the distribution of cholesterol within the membrane (69, 70). We showed that cholesterol accumulates in germ cell membranes (71), at the tight junctions of Sertoli cells (72–74), and within testicular cells (74). SR-BI/SR-BII-mediated selective lipid uptake in testicular cell membrane segments could modify the membrane fluidity causing local concentration of signaling proteins for signal transduction, which would in turn influence cell-cell interactions. In particular, spermatozoan translocation from one side to the other of the blood-testis barrier during stage X requires Sertoli cell junction plasticity while the spermatids release into the lumen, and the engulfment by Sertoli cells of lipid-containing residual bodies involves the intracellular management of cholesterol. A change in the scavenger receptor location could influence both of these events, because the “selective uptake of lipids by SR-BI and SR-BII correlates with the surface expression of SR-BI and SR-BII rather than with the rate at which the two receptors accumulate HDL intracellularly” (66, 75). The lack of a C-terminal leucine amino

acid decreased the surface expression of SR-BI in mouse hepatocytes, and the three C-terminal amino acids required for binding PDZK1 are lacking in SR-BII (76). Interestingly, hormone-sensitive lipase (20) and SR-BI expression are both upregulated in the tubules during stage X.

In conclusion, cholesterol homeostasis and SR-BI expression are deregulated, but apoptosis levels are unchanged, in tubules with AIO. These results suggest that SR-BI and SR-BII expression favors the maintenance of low EC levels and that the predominance of only one isoform is associated with the accumulation of EC but not with apoptosis in the tubules. ■

The authors express their sincere gratitude to Dr. Marshall E. Bloom from the Laboratory of Persistent Viral Diseases (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Hamilton, MT) for his generous and invaluable gift of rabbit anti-mink IgG. The authors are immensely indebted and grateful to Dr. Lise Bernier (IRCM) for her guidance in the cholesterol measurements. This work was supported in part by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Grant OGP0041653 and by a Population Council ICMC grant to R.M.P. and by NSERC Grant OGP0194652 to M.L.V. M.L.V. was also funded by a scholarship from Les Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Ramirez-Torres, M. A., A. Carrera, and M. Zambrana. 2000. High incidence of hyperestrogenemia and dyslipidemia in a group of infertile men. *Ginecol. Obstet. Mex.* **68**: 224–229.
- Osuga, J., S. Ishibashi, T. Oka, H. Yagyu, R. Tozawa, A. Fujimoto, F. Shionoiri, N. Yahagi, F. B. Kreamer, O. Tsutsumi, et al. 2000. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 787–792.
- Chung, S., S. P. Wang, L. Pan, G. A. Mitchell, J. M. Trasler, and L. Hermo. 2001. Infertility and testicular defects in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Endocrinology.* **142**: 4272–4281.
- Vallet-Erdtmann, V., G. Tavernier, J. A. Contreras, A. Mairal, C. Rieu, A.-M. Touzalin, C. Holm, B. Jégou, and D. Langin. 2004. The testicular form of hormone-sensitive lipase HSL_{tes} confers rescue of male infertility in HSL-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **279**: 42875–42880.
- Wechsler, A., A. Brafman, M. Shafir, M. Heverin, H. Gottlieb, G. Damari, S. Gozlan-Kelner, I. Spivak, O. Moshkin, E. Fridman, et al. 2003. Generation of viable cholesterol-free mice. *Science.* **302**: 2087.
- Rodemer, C., T. P. Thai, B. Brugger, T. Kaercher, H. Werner, K. A. Nave, F. Wieland, K. Gorgas, and W. W. Just. 2003. Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defect in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. *Hum. Mol. Genet.* **12**: 1881–1895.
- Selva, D. M., V. Hirsh-Reinshagen, B. Gurgess, S. Zhou, J. Chan, S. McIsaac, M. R. Hyden, G. L. Hammon, A. W. Vogl, and C. L. Wellington. 2004. The ATP-binding cassette transporter 1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility. *J. Lipid Res.* **45**: 1040–1050.
- Sugkraroek, P., M. Kates, A. Leader, and N. Tanphaichitr. 1991. Level of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. *Fertil. Steril.* **55**: 820–827.
- Steinberger, E., A. Root, M. Fisher, and K. D. Smith. 1973. The role of androgens in the initiation of spermatogenesis in man. *Clin. Endocrinol. Metab.* **37**: 746–749.
- McLachland, R. I., N. G. Wreford, L. O'Donnell, D. M. de Kretser, and D. M. Robertson. 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J. Endocrinol.* **148**: 1–9.

11. Fofana, M., J.-C. Maboundou, J. Bocquet, and D. Le Goff. 1996. Transfer of cholesterol between high density lipoproteins and cultured rat Sertoli cells. *Biochem. Cell Biol.* **74**: 681–686.
12. Fofana, M., C. Travert, C. Carreau, and D. LeGoff. 2000. Evaluation of cholesteryl ester transfer in the seminiferous tubule cells of immature rats *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* **118**: 79–83.
13. Pelletier, R.-M., and S. W. Byers. 1992. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc. Res. Tech.* **20**: 3–33.
14. Pelletier, R.-M. 2004. The tight junction in the testis. In *Recent Research in Development and Endocrinology*. S. G. Pandalai, editor. Transworld Research Network, Trivandrum, India. 29–51.
15. Setchell, B. P., and G. M. H. Waites. 1975. The Blood-Testis Barrier. American Physiological Society, Washington, DC. 143–172.
16. Wiebe, J. P., and K. S. Tilbe. 1979. *De novo* synthesis of steroids (from acetate) by isolated rat Sertoli cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**: 1107–1113.
17. Huckins, C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat. Rec.* **190**: 905–926.
18. Kerr, J. B. 1992. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J. Reprod. Fertil.* **95**: 825–830.
19. Kabbaj, O., C. Holm, M. L. Vitale, and R.-M. Pelletier. 2001. Expression, activity and subcellular localization of testicular hormone-sensitive lipase (HSL) during postnatal development in the guinea pig. *Biol. Reprod.* **65**: 601–612.
20. Kabbaj, O., S. R. Yoon, C. Holm, J. Rose, M. L. Vitale, and R.-M. Pelletier. 2003. Relationship of the hormone sensitive lipase (HSL)-mediated modulation of cholesterol metabolism in individual compartments of the testis to serum pituitary hormone and testosterone concentrations in a seasonal breeder, the mink (*Mustela vison*). *Biol. Reprod.* **68**: 722–734.
21. Wellington, C. L., E. C. Walker, A. Suarez, A. Kwok, N. Bissada, R. Singaraja, Y.-Z. Yang, L. H. Zhang, E. James, J. E. Wilson, et al. 2002. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab. Invest.* **82**: 273–283.
22. Arenas, M. L., M. V. T. Lobo, E. Caso, L. Huerta, R. Paniagua, and M. A. Martin-Hidalgo. 2004. Normal and pathological human testes express hormone-sensitive lipase and the lipid receptors CLA-1/CD36. *Hum. Pathol.* **35**: 34–42.
23. Temel, R. E., B. Trigatti, R. B. DeMattos, S. Azhar, and D. L. Williams. 1997. Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 13600–13605.
24. Kozarsky, K. F., M. H. Donahee, A. Rigotti, S. N. Iqbal, E. R. Edelman, and M. Krieger. 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature.* **387**: 414–417.
25. Ji, Y., N. Jian, Y. Wang, Y. Sun, M. L. Moya, M. C. Phillips, G. H. Rothblat, J. B. Swaney, and A. R. Tall. 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* **272**: 20982–20985.
26. Trigatti, B., H. Rayburn, M. Vinals, A. Braun, H. Miettinen, M. Penman, M. Hertz, M. Schrenze, L. Amigo, A. Rigotti, et al. 1999. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 9322–9327.
27. Webb, N. R., W. J. S. de Villiers, P. M. Connell, F. C. de Beer, and D. R. van der Westhuyzen. 1997. Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BII). *J. Lipid Res.* **38**: 1490–1495.
28. Mulcahy, J. V., D. R. Riddell, and J. S. Owen. 2004. Human scavenger receptor class B type II (SR-BII) and cellular cholesterol efflux. *Biochem. J.* **277**: 741–747.
29. Babbitt, J., B. Trigatti, A. Rigotti, E. J. Smart, R. G. Anderson, S. Xu, and M. Krieger. 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acetylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* **272**: 13242–13249.
30. Webb, N. R., P. M. Connell, G. A. Graf, E. J. Smart, W. J. S. de Villiers, F. C. de Beer, and D. R. van der Westhuyzen. 1998. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 15241–15248.
31. Graf, G. A., S. V. Matveev, and E. J. Smart. 1999. Class B scavenger receptors, caveolae and cholesterol homeostasis. *Trends Cardiovasc. Med.* **9**: 221–225.
32. Fielding, C. J., and P. E. Fielding. 2000. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim. Biophys. Acta.* **1529**: 210–222.
33. Fielding, C. J. 2001. Caveolae and signaling. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**: 281–287.
34. Voisin, G. A., and F. Toullet. 1968. Étude sur l'orchite aspermatogénique auto-immune et les autoantigènes des spermatozoïdes chez le cobayes. *Ann. Inst. Pasteur (Paris).* **114**: 727–755.
35. Tung, K. S. K. 1998. Autoimmune disease of the testis and the ovary. In *The Autoimmune Diseases*. Academic Press, New York. 687–704.
36. Schuppe, H.-C., and A. Meinhardt. 2005. Immune privilege and inflammation of the testis. In *Immunology of Gametes and Embryo Implantation: Immunology of the Male Reproductive System, Male Infertility and Contraception*. U. R. Marker, editor. Karger, Basel, Switzerland. 1–14.
37. Kawasaki, Y., A. Nakagawa, K. Nagaosa, A. Shiratsuchi, and Y. Nakanishi. 2002. Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 27559–27566.
38. Shiratsuchi, A., Y. Kawasaki, M. Ikemoto, H. Arai, and Y. Nakanishi. 1999. Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 5901–5908.
39. Nakagawa, A., K. Nagaosa, T. Hirose, K. Tsuda, K. Hasegawa, A. Shiratsuchi, and Y. Nakanishi. 2004. Expression and function of class B scavenger receptor type I on both apical and basolateral sides of the plasma membrane of polarized testicular Sertoli cells of the rat. *Dev. Growth Differ.* **46**: 283–298.
40. Pelletier, R.-M. 1986. Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*): a seasonal breeder. *Am. J. Anat.* **175**: 91–117.
41. Ing, R. M. Y., S.-X. Wang, A. M. Brennecke, and W. R. Jones. 1985. An improved indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antiserp antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.* **8**: 15–19.
42. Benet-Rubinatz, J. M., P. Martinez, W. A. Lepp, J. Egozcue, P. Andolz, and M. A. Bielsa. 1991. Detection of induced anti-sperm antibodies by an improved enzyme-linked immunosorbent assay. *Int. J. Fertil.* **36**: 48–56.
43. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
44. Herrada, G., and D. J. Wolgemuth. 1997. The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. *J. Cell Sci.* **110**: 1543–1553.
45. Rigotti, A., B. L. Trigatti, M. Penman, H. Reyburn, J. Herz, and M. Krieger. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 12610–12615.
46. Pelletier, R.-M. 1988. Cyclic modulation of the Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *Am. J. Anat.* **183**: 68–102.
47. Franz, H. R., and L. C. Ellis. 2001. Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the mink (*Mustela vison*). *Norw. J. Agric. Sci.* **9**: 122–127.
48. Krieger, M. 1999. Charting the fate of the “good cholesterol”: identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 523–558.
49. Williams, D., M. A. Connelly, R. E. Temel, S. Swanakar, M. C. Phillips, M. de la Llera-Moya, and G. H. Rothblat. 1999. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr. Opin. Lipidol.* **10**: 329–339.
50. Azhar, S., A. Nomoto, and E. Reaven. 2002. Hormonal regulation of microvillar channel formation. *J. Lipid Res.* **43**: 861–871.
51. Reaven, E., Y. Cortez, S. Leers-Sucheta, A. Namoto, and S. Azhar. 2004. Dimerization of the scavenger receptor class B type I: formation, function, and localization in diverse cells and tissues. *J. Lipid Res.* **45**: 513–528.
52. Blottner, S., H. Roelands, A. H. Wagner, and U. D. Wenzel. 1999. Testicular mitosis, meiosis and apoptosis in mink (*Mustela vison*) during breeding and non-breeding seasons. *Anim. Reprod. Sci.* **57**: 237–249.
53. Kozarsky, K. F., M. H. Donahee, J. M. Glick, M. Krieger, and D. J. Rader. 2000. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 721–727.

54. Navazo, M. D., L. Daviet, J. Savill, Y. Ren, L. L. Leung, and J. L. McGregor. 1996. Identification of a domain (155–183) on CD36 implicated in the phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J. Biol. Chem.* **271**: 15381–15385.
55. Devitt, A., O. D. Moffatt, C. Raykundalia, J. D. Capra, D. L. Simmons, and C. D. Gregory. 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature.* **392**: 505–509.
56. Mamon, Y., C. Broccardo, O. Chambenoir, M. F. Luciani, F. Toti, S. Chaslin, J. M. Fressinet, P. F. Devaux, J. McNeish, D. Marguet, et al. 2000. ABCA1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat. Cell Biol.* **2**: 399–406.
57. Platt, N., H. Suzuki, Y. Kurihara, T. Kodama, and S. Gordon. 1996. Role of the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 12456–12460.
58. Morales, C. R., Y. Clermont, and L. Hermo. 1985. Nature and function of endocytosis in Sertoli cells of the rat. *Am. J. Anat.* **173**: 203–217.
59. Korb, L. C., and J. M. Ahearn. 1997. Clq binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J. Immunol.* **158**: 4525–4528.
60. Shiratsuchi, A., M. Umeda, Y. Ohba, and Y. Nakanishi. 2006. Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 2354–2358.
61. Henson, P. M., D. L. Bratton, and V. A. Fadok. 2001. The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 627–633.
62. Reaven, E., L. Zhan, A. Nomoto, S. Leers-Sucheta, and S. Azhar. 2000. Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and a selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis. *J. Lipid Res.* **41**: 343–356.
63. Eckhardt, E. R. M., L. Cai, J. Shetty, Z. Zhao, A. Szanto, N. R. Webb, and D. R. van der Westhuyzen. 2006. HDL endocytosis by scavenger receptor SR-BII is clathrin-dependent and requires a carboxy-terminal dileucine motif. *J. Biochem. (Tokyo).* **281**: 4348–4353.
64. Sundqvist, C., L. C. Ellis, and A. Bartke. 1988. Reproductive endocrinology of the mink (*Mustela vison*). *Endocr. Rev.* **9**: 247–266.
65. Benton, L., L-X. Shan, and M. P. Hardy. 1995. Differentiation of adult Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**: 61–68.
66. Eckhardt, E. R. M., L. Cai, N. R. Webb, and D. R. van der Westhuyzen. 2004. HDL uptake by scavenger receptor SR-BII. *J. Biol. Chem.* **279**: 14372–14381.
67. Reaven, E., S. Leers-Sucheta, A. Nomoto, and S. Azhar. 2001. Expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) promotes microvillar channel formation and selective cholesteryl ester transport in a heterologous and reconstituted system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 1613–1618.
68. Williams, D., J. S. Wong, and R. L. Hamilton. 2002. SR-BI is required for microvillar channel formation and the localization of HDL particles to the surface of adrenocortical cells *in vivo*. *J. Lipid Res.* **43**: 544–549.
69. de la Llera-Moya, M., G. H. Rothblat, M. A. Connelly, G. Kellner-Weibel, S. W. Sakr, M. C. Phillips, and D. L. Williams. 1999. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.* **40**: 575–580.
70. Kellner-Weibel, G., M. de la Llera-Moya, M. A. Connelly, G. Stoudt, A. E. Christian, M. P. Haynes, D. L. Williams, and G. H. Rothblat. 2000. Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. *Biochemistry.* **39**: 221–229.
71. Pelletier, R-M., and D. S. Friend. 1983. Development of membrane differentiations in the guinea pig spermatid during spermiogenesis. *Am. J. Anat.* **167**: 119–141.
72. Pelletier, R-M., and D. S. Friend. 1983. The Sertoli cell junctional complex: structure and permeability to filipin in the neonatal and adult guinea pig. *Am. J. Anat.* **168**: 213–228.
73. Pelletier, R-M., and D. S. Friend. 1986. Sertoli cell junctional complexes in gossypol-treated neonatal and adult guinea pigs. *J. Androl.* **7**: 127–139.
74. Pelletier, R-M., and M. L. Vitale. 1994. Filipin vs enzymatic localization of cholesterol in guinea pig, mink, and mallard duck testicular cells. *J. Histochem. Cytochem.* **42**: 1539–1554.
75. Savill, J., and V. Fadok. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* **407**: 784–788.
76. Silver, D. 2002. A carboxyl-terminal, PDZ-interacting domain of scavenger receptor B, type I is essential for cell surface expression in liver. *J. Biol. Chem.* **277**: 34042–34047.

Annexe 2: Article 2

8

A revised and improved method for the isolation of seminiferous tubule-enriched fractions that preserves the phosphorylated and glycosylated forms of proteins

Casimir D. Akpovi and R.-Marc Pelletier

Abstract

An improved technique to generate high yields of relatively pure seminiferous tubule-enriched fractions from mouse testis by manual isolation is described. Our laboratory had previously developed an isolation method based on mild enzymatic digestion to separate individual constituents of each compartment of the testis namely, the interstitial tissue and the seminiferous tubules. Although the method had the advantage of allowing production of seminiferous tubule-enriched fractions in large amounts, we show here that this approach does not allow optimal preservation of the integrity of the proteins in the samples, in particular of the phosphorylated and/or glycosylated forms of the proteins. In an attempt to solve this problem, we developed a novel mechanical approach to generate interstitial tissue- and seminiferous tubule-enriched fractions that does not require the use of enzymatic digestion. This approach has the advantages of providing relatively pure seminiferous tubule-enriched fractions in large quantities and in a short amount of time. In addition, and more significantly, the approach allows a more faithful detection of the phosphorylated and glycosylated forms of the proteins.

Key Words: Testis; seminiferous tubule; tissue fraction; isolation; protein; phosphorylated forms; glycosylated forms.

1. Introduction

The testis is made up of loops of convoluted seminiferous tubules surrounded by interstitial tissue composed of loose connective tissue containing Leydig cells that secrete testosterone into the bloodstream (*Christensen, 1975*). The seminiferous tubules are lined with a stratified epithelium containing germ cells at various stages of development (*Leblond et Clermont, 1952*) and the supporting Sertoli cells (*Jégou, 1993*). Despite fundamental anatomical and functional differences that distinguish the two cellular compartments of the testis (*Halley, 1960*), most studies use whole testis extracts rather than seminiferous tubule- or interstitial tissue-enriched fractions to conduct their analyses (*Benahmed et coll., 1983; Bravo et coll., 1994; Xie et coll., 2006*). Currently available methods to generate tissue-enriched fractions are few in numbers and time consuming or still based on the use of enzymes.

Christensen and collaborators (*Christensen et Mason, 1965*) have proposed an elegant method to separate the interstitial tissue from the seminiferous tubules. Although the interstitial tissue-enriched fractions generated were of relatively good purity, their approach was very time consuming, requiring more than three hours to complete and yielded only reduced amounts of tissue fractions from one single testis.

Our laboratory has reported an isolation method based on mild enzymatic digestion of the testis (*Pelletier et coll., 1999; Kabbaj et coll., 2001*). The method had the advantage of allowing the isolation of significantly larger amounts of seminiferous tubule-enriched fractions.

Here in, we describe an improved method that: 1) provides relatively pure seminiferous tubule-enriched fractions; 2) does not require the use of enzymatic digestion; 3) is rapid of execution; 4) provides large amounts of enriched-tissue fraction in which 5) the integrity of the proteins is preserved.

2. Materials

2.1 Animals

Adult mice, aged more than 60 days, were purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada). They were housed at room temperature with 12h:12h light-dark cycle. Food and

water were provided *ad libitum*. Animals were anesthetised by i.p injection of 0.9 ml/kg body weight of sodium phenobarbital (Somnotol; MCI Pharmaceutical, Mississauga, ON, Canada) and 0.15 ml/kg body weight of a solution of 0.3 g/ml chloral hydrate in sterile saline. The protocol was approved by Université de Montréal Animal Care Committee.

2.2 Mild enzymatic digestion

2.2.1 Reagents

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), ethylene glycol-bis- (-aminoethyl ether) --- N,N,N', N-tetraacetic acid (EGTA), sodium chloride (NaCl), sodium fluoride (NaF), sodium orthovanadate (Na₃VO₄), sodium pyrophosphate dehydrate (Na₄P₂O₇), potassium chloride (KCl), potassium phosphate (KH₂PO₄) and soybean trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).

Aprotinin, leupeptin and collagenase D (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada).

Minimum essential medium (MEM) (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada).

2.2.2 Buffers

1. Phosphate buffered saline (PBS): 137mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH 7.4 (*see Note 1*). Store at room temperature.
2. Buffer A: PBS containing 2 mM PMSF, 1 mM EGTA, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 4mM Na₃VO₄, 80mM NaF and 20 mM Na₄P₂O₇ (*see Note 1*). Store at 4°C.

2.3 Manual isolation technique

2.3.1 Reagents

The same reagents as for the mild enzymatic digestion technique are used except for collagenase D and soybean trypsin inhibitor but with the addition of potassium bisperoxol (1, 10- phenanthroline) oxovanadate (bpV (phen)) (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Protect from light (*see Note 2*).

2.3.2 Buffers

1. Phosphate buffered saline (PBS)
2. Buffer B: buffer A plus 10 μ M potassium bisperoxol (1, 10- phenanthroline) oxovanadate (bpV (phen)). Add bpV (phen) just prior to use, the product is unstable in solution (*see Note 2*).

2.4 Electrophoresis and Western blotting

2.4.1 Reagents

1. Urea, bovine serum albumin (BSA), Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, β -mercaptoethanol, 3',3'',5',5'' tetrabromophenol-sulfonphthalein (bromophenol blue) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).
2. Sodium dodecyl Sulfate (SDS), Bio-Rad Protein Assay, nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).
3. Lumi-lightplus chemiluminescence detection kit (Roche, Laval, QC, Canada)
4. Film-classic Blue (EBA 45) (Universal X-ray Company of Canada Ltd, Dorval, QC, Canada).

2.4.2 Buffers

1. Tris-buffered saline with Tween (TBST): 140 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4 and 0.05% Tween-20. Store at 4°C
2. Blocking agent and antibody dilution buffer: 3% (w/v) fat free dry milk in TBST. Can be stored at 4°C for not more than 3 days.
3. Western blot sample dilution buffer: 8 mM urea, 3% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 7 mM Tris-HCl (pH 7.6), and 0.005% bromophenol blue. Heat to facilitate dissolution. Store at 4°C.

2.4.3 Antibodies

1. A rabbit polyclonal antibody IgG that recognizes all forms (phosphorylated and non-phosphorylated) of Cx43 (Pan-Cx43) (Sigma-Aldrich, Windsor, ON, Canada).

2. A rabbit polyclonal antibody IgG to Scavenger receptor class B type I (SR-BI) (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA).
3. A rabbit anti-mouse myosin light chain (MLC) monoclonal IgM (Sigma, St-Louis, MO, USA).
4. Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG and peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgM (Jackson ImmunoRes Lab, Mississauga, ON, Canada).

3. Methods

3.1 Testis collection

1. Clean the anesthetised animals' fur with 70% ethanol to minimize contamination.
2. Make an incision in the abdomen using curved scissors.
3. Cut the skin from the abdomen to the thorax with scissors.
4. Open the abdominal wall.
5. Remove testes.
6. Place testes in a glass Petri dish containing cold PBS on ice.
7. Remove the fat pad and the epididymis under a dissecting microscope and rinse the testes in cold PBS.
8. The *tunica albuginea* and the testicular artery are removed.

3.2 Mild enzymatic digestion technique

1. Decapsulated testes are placed in 50-ml Erlenmeyer flask containing 0.25 mg/ml of collagenase D and 0.1 mg/ml of soybean trypsin inhibitor in MEM (10 ml/5 pairs of testis).
2. Place the mixture in a water shaker bath set at 80 cycles/min at 37°C for 2 X 20 min. The seminiferous tubules readily disperse.
3. The reaction is stopped by addition of an equal volume of MEM.
4. Transfer the mixture into 15 ml plastic conical tubes.
5. Allow to deposit 30 min on ice. The seminiferous tubules will settle by gravity, while the interstitial cells will occupy the supernatant.

6. Further separation is achieved by centrifugation at low speed (80 g) for 15 min at 4°C. The two cellular compartments of the testis will show distinct colors, thus rendering identification easy: the tubules are whitish and the interstitial tissue brownish.
7. The resulting seminiferous tubule-enriched fraction in the pellet, and the interstitial tissue-enriched fraction in the supernatant are washed three times 10 min in PBS or in buffer A separately and recovered by centrifugation at 250 g for 10 min at 4°C.
8. Each tissue-enriched fraction is suspended in equal volume of PBS or buffer A
9. Aliquot and store at -80°C.

3.3 *Manual isolation technique*

1. Place the decapsulated testes in cold buffer (PBS, buffer A or buffer B) (*see Note 1*) in a glass Petri dish (2 ml/1 pair of testis) on ice.
2. Dice the testis into 2-4 pieces with clean razor blades
3. Use two pairs of No.5 Dumont stainless steel forceps to separate and detach the tubules from the interstitium. This isolation usually takes approximately 20 min per testis when mouse is used as animal model. The isolation time will vary with the species used.
4. Check if the seminiferous tubules are completely detached from the interstitial tissue under dissecting microscope with illumination from above (*see Note 3*).
5. Once the isolation is completed, allow the product of isolation to decant in a 1.5 ml Eppendorf by 2 testes or in a 15 ml plastic conical tube if more testes are isolated (*see Note 4*).
6. Allow to deposit an additional 30 min on ice.
7. Separation is followed by a centrifugation at 80 g for 15 min at 4°C. Three superimposed segments are obtained (**Fig. 1**).
8. The supernatant (upper segment in **Fig. 1**) contains few round and elongated spermatids that have escaped from the broken ends of the tubules. The middle segment in figure 1 contains mainly interstitial tissue (**Fig. 2A**) (*see Note 6*). The lower segment in figure 1 contains essentially seminiferous tubules (**Fig. 2B**). Because the upper segment contains only few round and elongated spermatids, that segment is added to the lower one before washing.

9. Washing: The interstitial tissue- and the seminiferous tubule-enriched fractions are washed three times with the appropriate buffer (PBS, buffer A or B) and recovered by centrifugation at 250 g for 10 min at 4°C.
10. Each tissue-enriched fraction is suspended independently in an equal volume of either buffer A, or buffer B or PBS (*see Notes 1 and 5*).
11. Aliquot and store at -80°C.

3.4 To use or not to use mild enzymatic digestion

As pointed out in the introduction, testicular tissue fractions can be use with or without the use of mild enzymatic digestion. The use of mild enzymatic digestion (eg, collagenase) favours a rapid dismantling of the testis parenchyma. However, the use of enzymes does not allow for optimal preservation of the protein's integrity particularly of the phosphorylated (**Fig. 3A**) and glycosylated (**Fig. 3B**) forms of the proteins that once exposed to enzymes, even to mild enzymatic digestion, are no longer detectable by Western blot analyses.

4. Notes

1. For *in vitro* proteins dephosphorylation studies, a buffer without anti-phosphatase (Buffer A) or PBS should be used because buffer contains anti-phosphatase could inactivate the phosphatase used for the reaction.
2. Potassium bisperoxol (1, 10-phenanthroline) oxovanadate (bpV (phen)) is sold in powder form and must be suspended, aliquoted and stored at -20 °C in a container opaque to light. Avoid repeated freezing and thawing. For this reason the aliquots should be made for single use only.
3. To better appreciate the product of the isolation, it is recommended to place a piece of black paper between the ice and the Petri dish. The tissue can also be viewed under a dissecting microscope, with illumination from above.
4. Use the least possible amount of buffer (about 2 ml/1 pair of testis) to facilitate the manual isolation. However, add buffer to the isolated product and suspend before allowing to sediment.

5. The use of buffer containing anti-phosphatase (Buffer B) is indicated for proteins with phosphorylated forms that need to be preserved.
6. The technique described in this study favours the isolation of the seminiferous tubules by allowing generating relatively pure seminiferous tubule-enriched fractions in large quantities. However, the technique does not favour interstitial tissue-enriched fractions which usually appear contaminated by detached germ cells contained in the supernatant.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Eloísa M. Carbajal for her collaboration to this projet. This work was supported in part by NSERC Grant and by Population Council ICMC grant to RMP.

References

1. Ghristensen, A. K. (1975) Leydig cells, in: *Handbook of Physiology* (Hamilton, D.W., and Greep, R. O., eds.), American Physiological Society, Washington, DC, pp. 57-94.
2. Leblond, C.P. and Clermont, Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N Y Acad. Sci.* **55**, 548-573.
3. Jégou, B. (1993) The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int. Rev. Cytol.* **147**, 25-96.
4. Halley, J.B. (1960) Relation of Leydig cells in the human testicle to the tubules and testicular function. *Nature* **185**, 865-866.
5. Benahmed, M., Reventos, J., and Saez, J.M. (1983) Role of plasma lipoproteins in the function of steroidogenic tissues. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **44**, 43-50.
6. Bravo, E., Botham, K.M., Mindham, M.A., Mayes, P.A., Marinelli, T., and Cantafora, A. (1994) Evaluation *in vivo* of the differential uptake and processing of high-density lipoprotein unesterified cholesterol and cholesteryl ester in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1215**, 93-102.

7. Xie, C., Richardson, J.A., Turley, S.D., and Dietschy, J.M. (2006) Cholesterol substrate pools and steroid hormone levels are normal in the face of mutational inactivation of NPC1 protein. *J. Lipid Res.* **47**, 953-963.
8. Christensen, A.K. and Mason, N.R. (1965) Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone-4-14c *in vitro*. *Endocrinology* **76**, 646-656.
9. Pelletier, R., Trifaro, J.M., Carbajal, M.E., Okawara, Y., and Vitale, M.L. (1999) Calcium-dependent actin filament-severing protein scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis, and spermatozoa. *Biol. Reprod.* **60**, 1128-1136.
10. Kabbaj, O., Holm, C., Vitale, M.L., and Pelletier, R.M. (2001) Expression, activity, and subcellular localization of testicular hormone-sensitive lipase during postnatal development in the Guinea pig. *Biol. Reprod.* **65**, 601-612.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1: Schematic representation of the isolation product following 30 min of sedimentation. The seminiferous tubules deposit quickly at the bottom of the tube. The interstitial tissue deposits less rapidly forming the next layer. The supernatant contained isolated germ cells, mainly elongated spermatids that had escaped from the cut ends of the seminiferous tubules.

Figure 2: Characterisation of the enriched fractions. (A) The interstitial tissue-enriched fractions show contamination by round and elongated spermatids (Ryeom et coll.) that had escaped from the broken ends of the tubules. (B) In contrast, the isolated seminiferous tubules show virtually no residual interstitial tissue on their surfaces. The fractions were viewed and photographed with an inverted microscope Leica DMRIB equipped with Zeiss camera and Northern Eclipse program (A: 120X; B: 240X).

Figure 3: The manual isolation technique allows the preservation of the protein's integrity. Ten µg of total proteins of seminiferous tubule fractions were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The lower part (<35 kDa) of the

membrane is cut and incubated with anti-MLC (1:5 000), while the middle part (around 40 kDa) is incubated with anti-Cx43 (1:20 000) that recognizes all forms (phosphorylated and non-phosphorylated) of Cx43 (Pan-Cx43), and the upper part of the membrane is incubated with anti-SR-BI (1:2 000). **A)** In the sample obtained through the manual isolation, all the Cx43 phosphorylated isoforms are preserved. In contrast, in the sample that has been processed using mild enzymatic digestion, the intensity of Cx43 bands is decreased and some of the bands could no longer be detected. **B)** The intensity of the band of the glycosylated form of SR-BI is significantly lower in the sample that has been processed with a mild enzymatic digestion than in the sample obtained through manual isolation. MLC, whose band intensity did not change with the different experimental conditions, was used as an internal loading control. The positions of the non-phosphorylated (NP) and phosphorylated (P) forms of Cx43 are indicated.

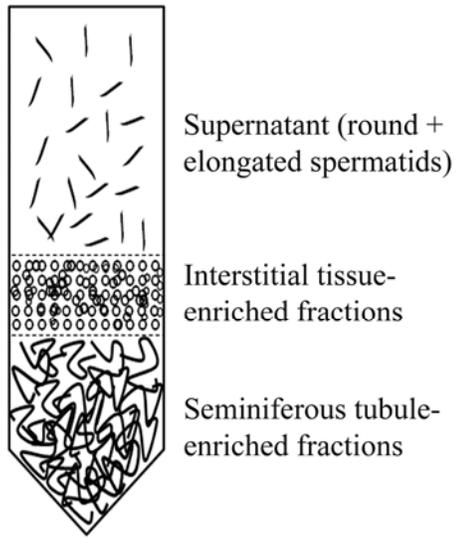


Figure 1

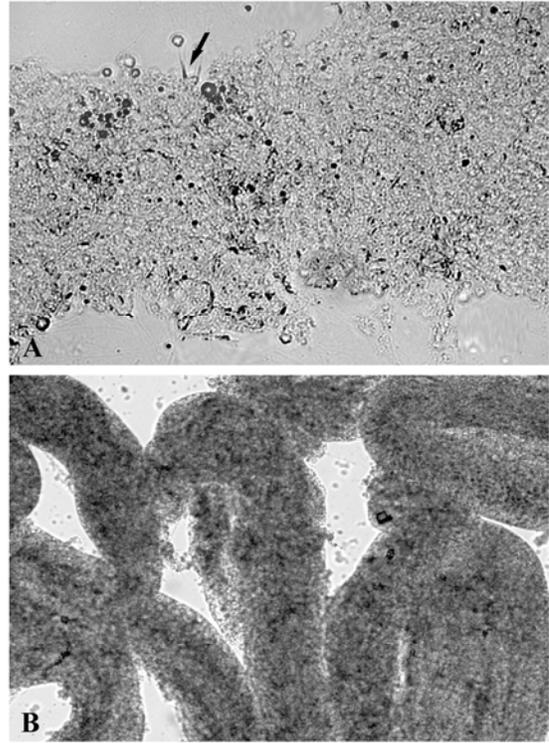
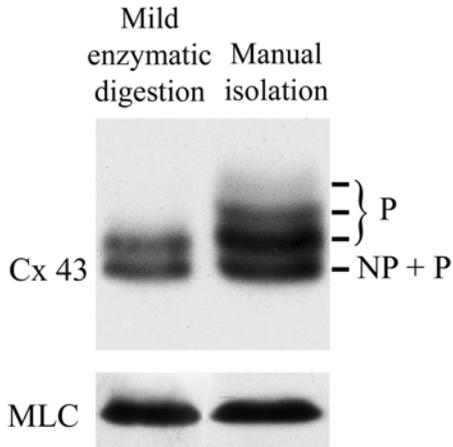


Figure 2

A Connexin 43 phosphorylated forms



B SR-BI glycosylated form

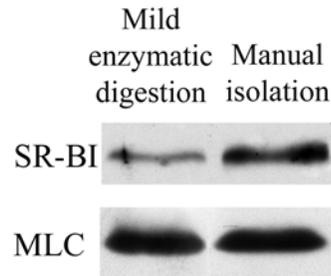


Figure 3