

Université de Montréal

**Étude du rôle de la lipase hormono-sensible dans le métabolisme du
cholestérol dans le testicule de cobaye et de vison**

Par

Ouafae Kabbaj

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Docteur (Ph. D.)
en pathologie et biologie cellulaire
option : biologie cellulaire

Septembre 2003

© Ouafae Kabbaj, 2003



W

4

U58

2004

v. 117

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

**Étude du rôle de la lipase hormono-sensible dans le métabolisme du
cholestérol dans le testicule de cobaye et de vison :**

Présentée par
Ouafae Kabbaj

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Président rapporteur	Dr L. Gaboury
Directeur de recherche :	Dr R-M. Pelletier
Codirecteur de recherche :	Dr M.L. Vitale
Membre du jury :	Dr L. Ghitescu
Examineur externe :	Dr L. Brissette
Représentant du doyen :	Dr F. Dubé

SOMMAIRE

Dans les tubules séminifères, le cholestérol est un constituant des membranes des cellules germinales alors que dans le tissu interstitiel, le cholestérol est en plus le précurseur de la testostérone. Puisque le rôle du cholestérol est différent dans les deux compartiments testiculaires, nous avons étudié dans ce projet la modulation du métabolisme du cholestérol par la lipase hormono-sensible ("hormone-sensitive lipase") (HSL) dans chacun des deux compartiments testiculaires. Afin d'analyser l'effet de la présence des cellules germinales sur la modulation de l'hydrolyse du cholestérol, nous avons étudié l'expression et l'activité de la HSL durant le développement post-natal chez le cobaye (espèce à reproduction continue) et chez le vison (espèce à reproduction saisonnière) et aussi chez le vison adulte durant le cycle reproductif annuel.

Nos résultats ont montré la présence d'une protéine de 104-kDa correspondant à la HSL dans les fractions enrichies en tubules séminifères (STf) et dans les fractions enrichies en tissu interstitiel (ITf) des deux espèces et à tous les âges étudiés. Le taux de cette protéine dans les STf et les ITf augmentait avec le développement testiculaire chez le cobaye et le vison mais il diminuait durant la régression testiculaire saisonnière chez le vison. Nous avons détecté deux autres isoformes de 110- et de 120-kDa mais ce, uniquement dans les STf de cobaye adulte, suggérant que l'expression de ces protéines soit liée à la présence de certaines classes de cellules germinales. Dans les STf, la fraction lysosomiale de la HSL pourrait venir des cellules germinales et importée à la cellule de Sertoli. Chez le vison, en plus de la protéine de 104-kDa, nous avons détecté une protéine de 108-kDa dans les STf à tous les âges étudiés et dans les ITf durant le développement et la régression testiculaires. Dans les STf de vison, le taux d'expression de la protéine de 108-kDa variait de la même manière que celui de la vimentine durant le développement et le cycle reproductif annuel, ce qui suggère que cette isoforme de la

HSL soit exprimée, comme la vimentine, par les cellules de Sertoli et non par les cellules germinales. L'activité enzymatique de la HSL chez le cobaye et le vison variait de la même manière que le rapport cholestérol libre (CL)/cholestérol estérifié (CE) et d'une manière différente du taux des triglycérides montrant que la HSL testiculaire agit sur le cholestérol esterifié plutôt que sur les triglycérides. Nous avons montré que l'expression de chaque isoforme de la HSL varie différemment dans chaque compartiment testiculaire et nous avons remarqué que la diminution du taux du CE dans les STf était observée au début de la spermatogenèse, alors que dans les ITf cette diminution se produisait à la fin de la puberté. Ces résultats indiquent que la modulation du métabolisme du cholestérol est différente dans chaque compartiment testiculaire. Nous avons ensuite montré chez le vison durant le cycle reproductif annuel, que le taux et l'activité la HSL dans les STf présentaient un maximum au moment où le taux de la FSH dans le sérum était le plus élevé alors que dans les ITf, l'activité de la HSL était maximale durant la période où le taux sérique de la testostérone était élevé et celui de la prolactine était bas. Ceci montre que la HSL est régulée par des hormones différentes dans chacun des deux compartiments testiculaires.

Par immunohistochimie sur des coupes de testicules, nous avons localisé la HSL dans les cellules de Sertoli, les spermatides et dans le tissu interstitiel. Dans la cellule de Sertoli, nous avons montré que la distribution de la HSL était dépendante des stades du cycle de l'épithélium séminifère. La HSL que nous avons détectée dans les ITf était exprimée essentiellement par les macrophages et elle pourrait être impliquée dans la formation de la testostérone. La HSL était présente et active dans les spermatozoïdes épидидymaires de cobaye, de vison et de bœuf. La HSL était aussi présente et active dans les spermatozoïdes éjaculés de bœuf suggérant que la HSL intervienne dans le métabolisme du cholestérol durant la maturation épидидymaire des spermatozoïdes. L'immunofluorescence de la HSL dans les spermatozoïdes épидидymaires de cobaye et de vison a montré la localisation de la HSL dans le segment équatorial, à l'endroit de contact spermatozoïde-ovule suggérant un rôle éventuel de la HSL dans ce contact.

Mots clés : Cholestérol, lipase hormono-sensible (HSL), testicule, tubules séminifères, reproduction, cellule de Sertoli, hormones, cobaye, vison.

SUMMARY

In seminiferous tubules, cholesterol is a component of all germ cell membranes, and in interstitial tissue, cholesterol is the precursor of testosterone. Because the role of cholesterol is different in the two testicular compartments, we have studied, in this project, the hormone-sensitive lipase (HSL) modulation of cholesterol metabolism in each compartment of the testis. To analyse the impact of germ cell presence on cholesterol hydrolyse modulation, we have studied HSL expression and HSL enzymatic activity during post-natal development in continual (Guinea pig) and seasonal (mink) breeder and also in mink during the annual reproductive cycle.

Our results show the presence of a 104-kDa protein corresponding to HSL in Guinea pig and mink seminiferous tubule enriched fractions (STf) and in interstitial tissue enriched fractions (ITf) in all age groups studied. The level of this protein increased in STf and ITf during testicular development in Guinea pig and mink but decreased during testicular regression in mink. Two additional isoforms of 110- and 120-kDa were detected only in adult Guinea pig STf suggesting that the expression of those two isoforms is related to the presence of some classes of germ cell. In the STf, the lysosomal HSL fraction likely originates from germ cells and may be exported to the Sertoli cell. In mink, in addition to the 104-kDa HSL protein, a protein of 108-kDa was detected in STf in all age groups studied and in ITf during development and testicular regression. In mink STf, the 108-kDa protein level varied in the same manner than vimentin concentration during development and the annual reproductive cycle, suggesting that the 108-kDa protein, like vimentin, was expressed in Sertoli and not in germ cells. The expression of both HSL isoforms varied differently in each testicular compartment. HSL activity correlated with free (FC)/esterified cholesterol (EC) ratios but not with triglyceride levels indicating that testicular HSL acts as a cholesterol esterase rather than a triglyceride lipase. In addition, EC in STf and ITf decreases was

observed respectively in the onset of spermatogenesis and in the end of puberty. Those results indicate that cholesterol metabolism modulation was different in each testicular compartment. In the mink, HSL level and activity were maximal in STf when FSH serum level was high and in ITf when serum testosterone level was high and serum prolactin was low showing that HSL was regulated by distinct hormones in each testicular compartment.

In testis sections, we have localised HSL by immunocytochemistry in Sertoli cells, spermatids and interstitial tissue. We have shown that HSL expression varied with spermatogenic activity and that HSL distribution in Sertoli cells was stage-dependent. The HSL detected in ITf was expressed essentially by macrophages and may be implicated in testosterone production. HSL was present and active in Guinea pig, mink and bovine epididymal spermatozoa as well as in bovine ejaculated spermatozoa suggesting that this enzyme may be implicated in cholesterol metabolism during spermatozoa epididymal maturation. HSL immunofluorescence localization in the equatorial segment of Guinea pig and mink epididymal spermatozoa is consistent with an eventual role of HSL in spermatozoa-oocyte interaction.

Keys words: Cholesterol, hormone-sensitive lipase (HSL), testis, seminiferous tubules, reproduction, Sertoli cell, hormones, Guinea pig, mink.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES FIGURES	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVII
REMERCIEMENTS	XIX
1. INTRODUCTION	1
2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
2.1 Le cholestérol	4
2.1.1 Biosynthèse du cholestérol.....	6
2.1.2 Transport plasmatique du cholestérol.....	6
2.1.3 Récepteurs aux lipoprotéines impliqués dans la captation du cholestérol ..	10
2.1.3.1 Récepteur de LDL (ou récepteur apo B/E).....	10
2.1.3.2 Récepteur des particules résiduelles de chylomicrons ou "LDL-receptor related protein" (LRP) ou la protéine apparentée au récepteur de LDL.....	11
2.1.3.3 Récepteurs "scavengers" (éboueurs)	12
2.1.4 Transport intracellulaire du cholestérol.....	14
2.1.5 Structure des gouttelettes lipidiques.....	16

2.2	Le cholestérol dans le testicule	16
2.2.1	Origine et rôle du cholestérol dans le tissu interstitiel	17
2.2.2	Origine et rôle du cholestérol dans les tubules séminifères	19
2.2.2.1	Rôle éventuel des lipoprotéines dans l'apport exogène du cholestérol aux tubules séminifères,	23
2.2.2.2	Rôle du cholestérol dans les tubules séminifères	24
2.3	Le cholestérol dans les spermatozoïdes	24
2.4	Les enzymes du métabolisme du cholestérol.....	25
2.4.1	La lipase hormono-sensible (HSL).....	26
2.4.1.1	Régulation de la HSL dans l'organisme.....	27
2.4.1.2	Rôle de la HSL dans le testicule.....	28
2.4.2	L'acyl-Coenzyme A :cholestérol acyl transférase (ACAT).....	31
2.4.2.1	Régulation de l'ACAT dans l'organisme.....	32
2.4.2.2	L'ACAT dans le testicule.....	33
2.4.3	L'hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) réductase.....	34
2.4.3.1	Régulation de l'HMG-CoA réductase dans l'organisme	34
2.4.3.2	L'HMG-CoA réductase dans le testicule	35
2.5	Influence des hormones sur le métabolisme du cholestérol testiculaire.....	37
2.5.1	L'hormone lutéinisante " Luteinising Hormone" (LH).....	37
2.5.2	L'hormone folliculo-stimulante " Follicle-Stimulating Hormone" (FSH)..	38
2.5.3	La testostérone.....	40
2.5.4	La prolactine (PRL).....	40
2.6	La spermatogenèse	41
2.6.1	Les divisions mitotiques des spermatogonies	42
2.6.2	La division méiotique des spermatocytes.....	42
2.6.3	La spermiogenèse	43

3. JUSTIFICATION DES MODÈLES ANIMAUX UTILISÉS DANS L'ÉTUDE	44
3.1 Le cobaye.....	44
3.2 Le vison.....	45
3.3 Le bœuf.....	46
4. ÉTUDE DE LA HSL	47
4.1 Objectifs et hypothèse du présent travail.....	47
4.2 Résultats	50
4.2.1 Résumé des résultats obtenus dans les deux articles inclus dans cette thèse	50
4.2.1.1 Expression de la protéine et activité de la HSL dans les STf et les ITf. .	50
4.2.1.2 Variation du rapport cholestérol libre (CL)/cholestérol estérifié (CE) et des triglycérides (TG) dans les STf et les ITf	52
4.2.1.3 Variation des hormones.....	53
4.2.1.4 Immunohistochimie de la HSL dans des coupes de testicule et dans les canaux excréteurs	54
4.2.1.5 Immunofluorescence de la HSL dans les Spz ép	55
4.2.1.6 Comparaison de l'activité de la HSL dosée à 34 et à 37°C.....	55
4.2.2 Article 1	57
4.2.3 Article 2.....	71
4.3 Discussion	87
4.3.1 Variation du taux de la protéine et de l'activité de la HSL au cours du développement testiculaire chez le cobaye et le vison et chez le vison adulte au cours du cycle reproductif annuel	87

4.3.1.1	Variation du taux de la protéine et de l'activité de la HSL dans les STf et les ITf chez le cobaye.....	88
4.3.1.1.1	Variation du taux et de l'activité de la HSL dans les STf de cobaye .	88
4.3.1.1.2	Présence de la HSL dans les lysosomes	89
4.3.1.1.3	Variation du taux et de l'activité de la HSL dans les ITf de cobaye ..	90
4.3.1.2	Variation du taux de la protéine et de l'activité de la HSL dans les STf et les ITf de vison.....	91
4.3.1.3	Activité de la HSL mesurée à 34 et 37 °C dans les STf et les ITf de cobaye et de vison	93
4.3.2	Rôle de la HSL testiculaire : relation avec le cholestérol et les triglycérides	93
4.3.3	Localisation de la HSL dans le testicule et dans les canaux excréteurs	96
4.3.4	La HSL dans les spermatozoïdes.....	97
4.3.5	Relation du taux de la protéine et de l'activité de la HSL avec les variations des hormones (LH, FSH, testostérone et PRL)	98
4.3.5.1	La LH	98
4.3.5.2	La FSH	99
4.3.5.3	La testostérone.....	99
4.3.5.4	La PRL	100
5.	RÉSULTATS ADDITIONNELS PRÉLIMINAIRES.....	101
5.1	Étude de la HSL dans les spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés de bœuf	101
5.1.1	Préparation des spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés de bœuf.....	101
5.1.2	Méthodes	101
5.1.3	Résultats	102
5.1.4	Discussion	108
5.2	Études préliminaires de l'ACAT et de l'HMG-CoA réductase	110

5.2.1	Étude préliminaire de l'ACAT	110
5.2.1.1	Analyse par immuno-buvardage de l'ACAT dans les STf et les spermatozoïdes épидидymaires de vison	110
5.2.1.2	Résultats	110
5.2.1.3	Discussion	113
5.2.2	Étude préliminaire de l'HMG-CoA réductase.....	113
5.2.2.1	Analyse par immuno-buvardage de l'HMG-CoA réductase dans les STf de vison	113
5.2.2.2	Résultats	116
5.2.2.3	Discussion	116
6.	CONCLUSION.....	118
7.	PERSPECTIVES.....	122
8.	BIBLIOGRAPHIE	124

LISTE DES TABLEAUX

	Page
<u>Introduction</u>	
Tableau I : Composition en apolipoprotéines (en pourcentage) des lipoprotéines plasmatiques.....	9
 <u>Article 1</u>	
Table 1 : Distribution of marker enzyme activities in tubule subcellular fractions...63	63
 <u>Résultats additionnels préliminaires</u>	
Tableau I : Taux du cholestérol libre (CL) et du cholestérol estérifié (CE) et l'activité de la HSL dans les spermatozoïdes épидидymaires (Spz ép) et les spermatozoïdes éjaculés (Spz éj) de bœuf.....	107

LISTE DES FIGURES

	Page
<u>Thèse</u>	
Figure 1 : Synthèse et estérification/hydrolyse du cholestérol.....	5
Figure 2 : Transport plasmatique du cholestérol.....	8
Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation des différents types cellulaires du tubule séminifère.....	20
Figure 4 : Représentation de l'activité d'endocytose de la cellule de Sertoli.....	21
Figure 5 : Régulation de la HSL	39
Figure 6 : Représentation schématique du métabolisme du cholestérol dans la cellule de Sertoli.....	121
 <u>Article 1</u>	
Figure 1 : Control for anti-rat HSL immunoreactivity in guinea pig tissues.....	62
Figure 2 : Western blot analyses of HSL in ITf and STf enriched fractions during postnatal development.....	62
Figure 3 : The HSL activity during postnatal development in ITf and STf.....	62
Figure 4 : The HSL activity and relative HSL protein levels during postnatal testicular development.....	63
Figure 5 : Western blot analysis of HSL in subcellular fractions obtained from STf of adult testes.....	63
Figure 6 : Testicular FC and EC levels and HSL activity during postnatal testicular development.....	64
Figure 7 : Triglyceride (TG) levels and HSL activity in the STf and ITf	

during postnatal testicular development.....	65
Figure 8: Serum testosterone concentration during testicular development.....	65
Figure 9: Immunohistochemical localization of HSL in developing testes.....	66
Figure 10: Immunolocalization of HSL in the interstitial tissue of the adult	
testis and adult testicular excurrent ducts	67
Figure 11: Immunofluorescence localization of HSL in epididymal spermatozoa.....	67

Article 2

Figure 1 : Validation of the specificity of anti-h HSL antibodies in mink tissues	77
Figure 2 : Western blots analyses of HSL in STf and ITf during development and the annual reproductive cycle and in epididymal spermatozoa	77
Figure 3 : HSL protein levels and HSL activity in STf and ITf	78
Figure 4 : Free and esterified cholesterol levels and HSL activity in STf and ITf.....	79
Figure 5 : Triglyceride levels and HSL activity in STf and ITf	80
Figure 6 : Immunolocalization of HSL in pubertal and adult testes harvested in February.....	81
Figure 7 : Immunofluorescence studies of HSL in testicular macrophages.....	82
Figure 8 : Immunolocalization of HSL during testicular regression.....	83
Figure 9 : Immunofluorescence localization of HSL in epididymal spermatozoa.....	84
Figure 10: Serum LH, FSH, prolactin, and testosterone profiles during development and in adulthood during the annual reproductive cycle.....	84

Résultats additionnels préliminaires

Figure 1 : Analyse par immuno-buvarpage de la HSL dans les spermatozoïdes épididymaires (Spz ép) et les spermatozoïdes éjaculés (Spz éj) bovins....	104
---	-----

Figure 2 : Activité de la HSL dans les spermatozoïdes épидидymaires (Spz ép) et les spermatozoïdes éjaculés (Spz éj) bovins.....	106
Figure 3 : Analyse par immuno-buvarlage de l'ACAT dans les STf et les spermatozoïdes épидидymaires (Spz ép) de vison.....	112
Figure 4 : Analyse par immuno-buvarlage de l'HMG-CoA réductase dans les STf de vison.....	115

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACAT:	acyl coenzyme A: cholestérol acyl transférase
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
Apo :	apolipoprotéine
ATP:	adénosine triphosphate
CD36 :	" cluster of differentiation 36 "
CE:	cholestérol estérifié
CL:	cholestérol libre
ELISA:	" enzyme linked immunoassay "
FSH:	" follicle stimulating hormone "
GnRH:	" gonadotropine-releasing hormone "
hCG:	" human chorionic gonadotropin "
HDL :	" high density lipoprotein "
HMG-CoA:	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
HSL :	" hormone-sensitive lipase "
ITf :	" interstitial tissue enriched fractions "
J:	jour
Kb :	kilobases
kDa:	kilodalton
LDL :	" low density lipoprotein "
LH:	" luteinising hormone "
LH-RH:	" luteinising hormone-releasing hormone "
MM :	masse moléculaire
PMSF :	" phenylmethylsulfonylfluoride "
PRL:	prolactine
Spz:	spermatozoïde
Spz ép :	spermatozoïdes épididymaires

Spz éj :	spermatozoïdes éjaculés
SR-BI :	" scavenger receptor, class B, type I "
SR-BII :	" scavenger receptor, class B, type II "
STf :	" seminiferous tubules enriched fractions "
TG :	triglycérides
VLDL :	" very low density lipoprotein "

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier premièrement mon directeur de recherche, le Dr R.-Marc Pelletier, qui m'a acceptée d'abord dans son laboratoire, qui m'a encouragée et qui m'a supportée durant les moments difficiles par lesquels je suis passée. Je le remercie pour sa grande disponibilité, son aide et ses bons conseils. Je le remercie aussi d'avoir accepté de corriger ma thèse à distance.

Je voudrais ensuite remercier Dr Maria L. Vitale, pour sa co-direction effective de cette thèse, pour sa disponibilité et pour ses conseils au cours des nombreuses discussions que nous avons eues tout au long de ce travail.

Je remercie Dr Jean Davignon et Dr Suzanne Lussier-Cacan de l'Institut de Recherche Clinique de Montréal qui m'ont permit de faire la chromatographie en phase gazeuse dans leur laboratoire, et Mme Lucie Boulet qui m'a appris cette technique d'une façon consciencieuse. Je remercie aussi Dr Jacques Paiement, et Mme Line Roy pour leur aide dans la réalisation du fractionnement cellulaire.

Mes remerciements à Dr Jack Rose (Department of Biological sciences, Idaho State University, USA) pour la génération de résultats de la PRL chez le vison.

Un merci tout spécial au Dr Urs Maag du département de mathématique de l'Université de Montréal, pour la réalisation de toutes les analyses statistiques utilisées dans cette thèse.

Je tiens à remercier également Dr Eloisa Carbaral pour ses bons conseils tout le long de mon travail au laboratoire. Je remercie aussi ma collègue et amie Suk-Run Yoon pour la réalisation de l'immunofluorescence des spermatozoïdes.

Je voudrais témoigner ma profonde gratitude au Dr Allegría Kessous, directrice des études supérieures pour son soutien, j'en suis très reconnaissante.

1. INTRODUCTION

Le testicule est formé de deux compartiments anatomiquement et fonctionnellement distincts : les tubules séminifères et le tissu interstitiel. Le compartiment tubulaire et le compartiment interstitiel contiennent tous les deux du cholestérol. Le cholestérol testiculaire existe sous deux formes : le cholestérol libre dans les membranes cellulaires et le cholestérol estérifié contenu dans des gouttelettes lipidiques (Pelletier et Vitale, 1994). Ces gouttelettes lipidiques sont présentes dans les cellules de Leydig (Loisel, 1903; Christensen, 1975), les cellules de Sertoli (McEnery et Nelson, 1950; Fawcett, 1975; Kerr et De Kretser, 1975) et les cellules germinales (Montagna et Hamilton, 1951; Kerr et De Kretser, 1975; Pelletier et Vitale, 1994). Si le métabolisme du cholestérol a été largement étudié dans le tissu interstitiel du fait de son rôle précurseur de la testostérone, dans les tubules séminifères il a reçu peu d'attention. Les tubules séminifères du testicule sont le lieu de formation de millions de cellules germinales dont les membranes cellulaires contiennent du cholestérol. De plus, les tubules séminifères possèdent une barrière hémato-testiculaire qui empêcherait le libre passage du cholestérol du sang vers les tubules (Setchell et Waites, 1975). Dans les tubules séminifères, le taux du cholestérol libre reste relativement constant malgré le départ cyclique de millions de spermatozoïdes (Renston et coll., 1975). Il existerait dans la cellule de Sertoli des facteurs qui assureraient l'homéostasie du cholestérol tubulaire. Le métabolisme intracellulaire du cholestérol fait intervenir trois enzymes principales: 1) La lipase hormono-sensible (HSL) qui hydrolyse le cholestérol estérifié en cholestérol libre (Yeaman, 1990), 2) l'acyl-CoA : cholestérol acyl transférase (ACAT) impliquée dans l'estérification du cholestérol quand celui-ci est présent en excès par rapport aux besoins de la cellule (Chang et coll., 1997) et 3) la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase, l'enzyme limitante dans la biosynthèse du cholestérol (Goldstein et Brown, 1990).

Le cholestérol estérifié contenu dans les gouttelettes lipidiques des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli serait considéré comme une forme de réserve du cholestérol libre qui pourrait être utilisé pour la biosynthèse de la testostérone ou être transféré aux cellules germinales pour participer à la formation de leurs membranes cellulaires notamment celles du spermatozoïde. L'hydrolyse du cholestérol estérifié est une étape indispensable préalable à son utilisation.

La HSL est une enzyme indispensable à la spermatogenèse puisque la suppression du gène de la HSL cause la stérilité chez des souris mâles (Osuga et coll., 2000; Chung et coll., 2001), mais la relation de la HSL avec l'activité spermatogénétique n'est pas établie. Dans ce projet, nous avons analysé la variation de l'expression et de l'activité de la HSL en fonction de l'apparition des cellules germinales qui se produit lors du développement testiculaire chez le cobaye et le vison. Nous avons étudié aussi la corrélation entre la disparition saisonnière des cellules germinales durant la régression testiculaire chez le vison et la variation de l'expression et de l'activité de la HSL.

Les études antérieures réalisées sur la HSL ont été effectuées sur des testicules entiers sans distinction entre les tubules séminifères et le tissu interstitiel (Holm et coll., 1987; Kraemer et coll., 1991; Kraemer et coll., 1993a; Stenson Holst et coll., 1994; Stenson Holst et coll., 1996). Or, l'utilisation du cholestérol est différente dans les deux compartiments testiculaires : la production des spermatozoïdes par les tubules et de la testostérone par les cellules de Leydig. Pour cette raison, nous avons d'abord préparé des fractions enrichies en tubules séminifères (STf) et en tissu interstitiel (ITf). Nous avons ensuite analysé la variation du taux et de l'activité de la HSL dans les STf et les ITf en fonction de l'activité spermatogénétique chez le cobaye et chez le vison. Nous avons déterminé sa localisation, sa relation avec le rapport cholestérol libre/cholestérol estérifié dans les STf et les ITf ainsi que la relation entre l'activité de cette enzyme et la

concentration sérique de la testostérone et des hormones hypophysaires qui agissent sur les cellules testiculaires.

Nos résultats ont montré que le taux d'expression des isoformes de la HSL était différent durant le développement chez le cobaye et le vison et chez le vison adulte durant le cycle reproductif annuel aussi bien dans les STf que dans les ITf. L'activité de la HSL variait de la même manière que le rapport cholestérol libre/cholestérol estérifié dans les STf et les ITf. Dans les ITf, la HSL était exprimée par les macrophages. La HSL que nous avons détectée dans les spermatozoïdes pourrait être nécessaire au métabolisme du cholestérol durant leur maturation épидидymaire et éventuellement à leur fonction.

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 LE CHOLESTÉROL

Le cholestérol est une molécule de vingt sept (27) atomes de carbone ($C_{27} H_{45} OH$). La molécule porte une chaîne hydrocarbonée sur le carbone 17 et un OH polaire hydrophile sur le carbone 3. L'hydroxyle en position 3 peut être estérifié par un acide gras (figure 1). Dans la cellule, le cholestérol peut exister sous deux formes : le cholestérol libre dans les membranes cellulaires et le cholestérol estérifié dans des gouttelettes lipidiques (Johnson et coll., 1997; Liscum et Munn, 1999). Le cholestérol libre est un constituant de toutes les membranes cellulaires qui participe au maintien de l'homéostasie fonctionnelle des membranes (Yeagle, 1985; Yeagle, 1989). Dans les membranes cellulaires, la molécule de cholestérol libre s'intercale entre les molécules de phospholipides et confère une rigidité aux membranes cellulaires en réduisant la mobilité des chaînes carbonées des phospholipides à la température de 37°C. Ainsi, à la température normale du corps, plus la membrane cellulaire contient du cholestérol, plus elle est rigide, plus elle est stable et plus elle est imperméable. En conférant une rigidité à la membrane cellulaire, le cholestérol régularise le passage de solutés à travers la bicouche membranaire (Yeagle, 1985; Yeagle, 1989). En plus de participer au maintien des membranes cellulaires, le cholestérol est aussi le précurseur des hormones stéroïdes (Gwynne et Strauss, 1982; Benahmed et coll., 1983) et de la vitamine D.

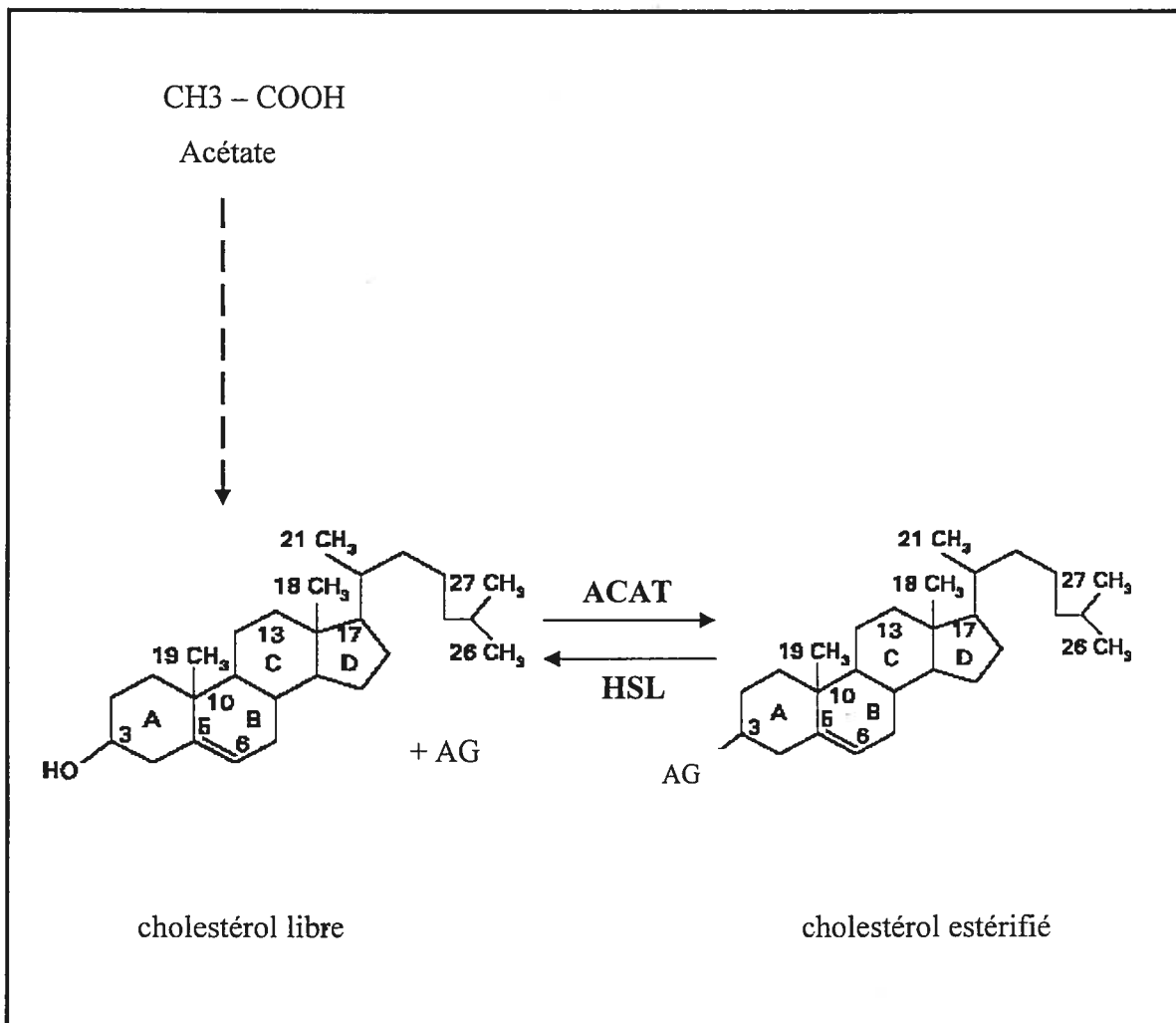


Figure 1 : Synthèse et estérification/hydrolyse du cholestérol : Le cholestérol est synthétisé à partir de l'acétate par une série de réactions enzymatiques. L'enzyme la plus importante de cette voie est l'HMG-CoA réductase. L'ACAT permet l'estérification du cholestérol par un acide gras (AG) et la HSL hydrolyse le cholestérol estérifié en cholestérol et en acide gras.

2.1.1 Biosynthèse du cholestérol

Dans la cellule, le cholestérol est synthétisé à partir de l'acétate par une série de réactions enzymatiques. L'enzyme la plus importante de cette voie est l'HMG-CoA réductase parce que c'est à son niveau que s'exerce le contrôle de la voie de biosynthèse du cholestérol. La synthèse du cholestérol est initiée dans le cytosol puis poursuivie dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse (Faust et coll., 1988). Le cholestérol nouvellement synthétisé est soit transporté à la membrane plasmique ou à la membrane des mitochondries afin d'être converti en hormones stéroïdes (Vahouny et coll., 1987; Lin et coll., 1995) soit transporté au réticulum endoplasmique rugueux pour être transformé en cholestérol estérifié (Sviridov, 1999). La synthèse *de novo* du cholestérol à partir de l'acétate s'effectue dans toutes les cellules de l'organisme, cependant, elle est beaucoup plus active dans les cellules en division rapide, où ce composé est utilisé pour la formation de nouvelles membranes (Mathé et Lutton, 1984). La synthèse de cholestérol est aussi importante dans les cellules qui ne lient pas les lipoprotéines de faible densité ("low density lipoproteins", LDL) comme par exemple les fibroblastes de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale. En effet ces cellules ont une activité élevée de l'HMG-CoA réductase (Mathé et Lutton, 1984).

2.1.2 Transport plasmatique du cholestérol

Le cholestérol étant peu soluble en milieu aqueux, il est transporté dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéines qui permettent sa solubilisation (Corvilain, 1997). Les lipoprotéines sont des macromolécules formées de lipides et de protéines appelées apolipoprotéines (apo). Le noyau central des lipoprotéines est constitué de lipides neutres (triglycérides, cholestérol estérifié) enveloppés d'une couche superficielle formée de lipides polaires (phospholipides, cholestérol non estérifié) et d'apolipoprotéines. Cette enveloppe assure la solubilité et la stabilité des lipoprotéines

dans le plasma (Corvilain, 1997) Les lipoprotéines sont classées en quatre classes en fonction de leurs rôles et de leurs propriétés physiques. Chaque classe de lipoprotéine exerce un rôle spécifique dans le métabolisme du cholestérol (figure 2) (Fielding et Fielding, 1995). Les chylomicrons transportent le cholestérol alimentaire de l'intestin vers le foie. Les lipoprotéines de très faible densité ("very low density lipoproteins", VLDL) sont synthétisées par le foie pour l'exportation du cholestérol. Les LDL sont un produit final du catabolisme des VLDL et transportent le cholestérol aux tissus périphériques. Les lipoprotéines de haute densité ("high density lipoproteins", HDL) assurent le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Le rôle général des lipoprotéines est donc de livrer le cholestérol et d'autres lipides aux cellules des tissus périphériques en fonction de leurs besoins et de ramener l'excès du cholestérol cellulaire au foie (Beucler et coll., 1986; Corvilain, 1997; Beisiegel, 1998). Chaque lipoprotéine contient une ou plusieurs apolipoprotéine(s). Quatre groupes principaux d'apolipoprotéines A, B, C, et E peuvent être individualisés au sein des lipoprotéines, les autres apolipoprotéines D, F, G et H sont peu abondantes et moins bien connues. Certaines existent sous différentes formes polymorphiques. Les apo A (A-I et A-II) représentent 82 % des protéines des HDL, les apo B (B-100) sont pratiquement les seuls constituants protéiques des LDL. Les apo C et E sont réparties dans les VLDL et les HDL. Les chylomicrons contiennent des apo A, B-48, C et E (tableau I) (Beucler et coll., 1987). En plus d'assurer le transport des lipides, certaines apolipoprotéines sont connues pour être soit des activatrices, soit des inhibitrices des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines (apo A et apo C) (Corvilain, 1997), d'autres apolipoprotéines servent de ligands pour les récepteurs cellulaires des lipoprotéines (apo A-I, apo B-100, apo E) (Ducobu, 1997). L'interaction des lipoprotéines et des cellules fait intervenir de nombreux récepteurs spécifiques qui jouent un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines (Ducobu, 1997).

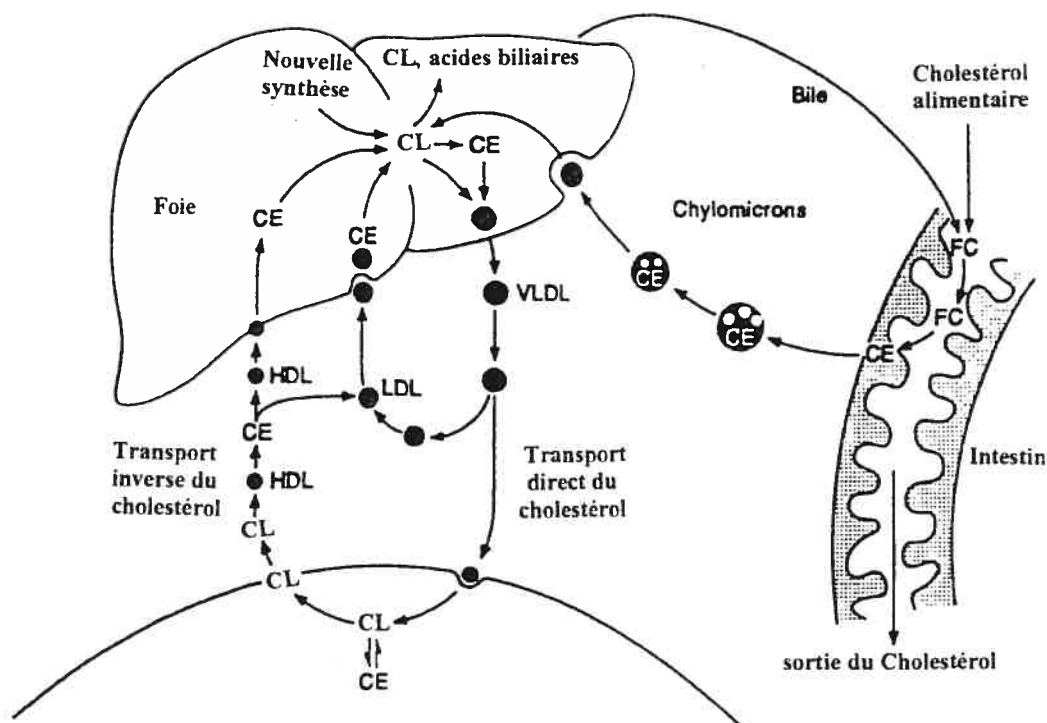


Figure 2 : Transport plasmatique du cholestérol : Le cholestérol alimentaire est transporté vers le foie par les chylomicrons. Le cholestérol alimentaire et le cholestérol synthétisé par le foie seront ensuite distribués vers les tissus périphériques par les VLDL et les LDL. Le cholestérol en excès des tissus périphériques, via l'efflux du cholestérol médié par les HDL, sera capté par le foie et les autres types de lipoprotéines (VLDL et LDL), c'est ce qu'on appelle transport inverse du cholestérol.

CE = cholestérol estérifié ; CL = cholestérol libre ; HDL = lipoprotéine de haute densité ; LDL = lipoprotéine de faible densité ; VLDL = lipoprotéine de très faible densité.

Tirée et traduite de : "Fielding, C.J. and Fielding, P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36:211-228, 1995" (Fielding et Fielding, 1995).

Apo	Chylomicrons	VLDL	LDL	HDL
A-I	8	-	-	60
A-II	4	-	-	22
B-48	22	-	-	-
B-100	-	37	98	-
C-I	14	3	2	10
C-II	14	7		
C-III	34	40		
D	2	-	-	5
E	2	13	-	3

Tableau I : Composition en apolipoprotéines (en pourcentage) des lipoprotéines plasmatiques.

Tiré de : "Beucler, I., Salmon, S., and Polonovski, J. Rôle des lipoprotéines dans le transport et le métabolisme des lipides. *Cah Nutr Diet* 22:277-286, 1987" (Beucler et coll., 1987).

2.1.3 Récepteurs aux lipoprotéines impliqués dans la captation du cholestérol

Les récepteurs des lipoprotéines sont des protéines membranaires qui reconnaissent spécifiquement une ou plusieurs apolipoprotéines (Ducobu, 1997). Ils interagissent par un mécanisme de haute affinité avec les particules de lipoprotéines circulantes (Ducobu, 1997). L'expression des récepteurs à la surface des cellules dépend de leur besoin en cholestérol. Par exemple, les cellules de Leydig de porc en culture possèdent des récepteurs spécifiques de grande affinité aux lipoprotéines, avec environ 80 000 sites par cellule (Benahmed et coll., 1981). Les récepteurs aux lipoprotéines impliqués dans la captation du cholestérol par les cellules sont : le récepteur de LDL, le récepteur des particules résiduelles de chylomicrons et les récepteurs "scavengers" ou éboueurs.

2.1.3.1 Récepteur de LDL (ou récepteur apo B/E)

Découvert par les Drs Brown et Goldstein (Brown et Goldstein, 1974), le récepteur de LDL est le récepteur de lipoprotéines le mieux caractérisé. Il permet la régulation du taux plasmatique du cholestérol (Basu et coll., 1978; Brown et Goldstein, 1986). Le récepteur de LDL lie l'apo B et l'apo E. Ce récepteur est abondant dans le foie, les gonades et les surrénales. Les récepteurs de LDL sont agglomérés dans des puits mantelés de clathrine ("clathrin-coated pits") le long de la membrane plasmique (Fielding et Fielding, 1996). Ces puits recouverts de clathrine sont des invaginations de la membrane plasmique stabilisées à leur face cytoplasmique par des molécules de clathrine. Contrairement aux cavéoles, qui facilitent l'exocytose du cholestérol libre de la cellule, les puits recouverts de clathrine sont pauvres en cholestérol libre (Fielding et Fielding, 1996). Après liaison avec les LDL, les puits recouverts de clathrine s'invaginent à l'intérieur de la cellule pour former des vésicules enveloppées de clathrine; après endocytose, le

récepteur est recyclé et les LDL sont dégradées dans les lysosomes (Brown et Goldstein, 1986).

Des études ont montré que les puits mantelés de clathrine étaient présents au niveau de la membrane plasmique des spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires (Gerard et coll., 1991). Les puits mantelés de clathrine permettent l'internalisation de certaines substances comme la "Sterol binding protein" (SBP) par les cellules germinales (Gerard et coll., 1991). Les vésicules mantelées de clathrine permettent le transport des enzymes lysosomales de l'appareil de Golgi à l'acrosome des spermatides matures en formation chez le rat (Griffiths et coll., 1981). Le cholestérol coexiste avec les vésicules entourées de clathrine au niveau de l'appareil de Golgi dans les spermatides de cobaye (Burgos et Gutierrez, 1986) mais aucune étude n'a montré jusqu'à présent le rôle des puits mantelés de clathrine dans le transfert du cholestérol au niveau des tubules séminifères.

2.1.3.2 Récepteur des particules résiduelles de chylomicrons ou "LDL-receptor related protein" (LRP) ou la protéine apparentée au récepteur de LDL

La LRP permet l'élimination par le foie des particules résiduelles de chylomicrons et des lipoprotéines qui contiennent l'apo E (Beisiegel, 1995). Elle lie l'apo E mais pas l'apo B, elle est internalisée dans la cellule comme le récepteur des LDL puis recyclée vers la membrane pour y capter d'autres ligands. Il semble que cette protéine puisse capter aussi d'autres ligands d'origines différentes, qui sont entre autres, l'alpha 2 macroglobine, des protéases, l'activateur tissulaire de plasminogène (Ducobu, 1997). La LRP est présente principalement dans le foie mais également dans le cerveau, le placenta et le tissu adipeux (Ducobu, 1997). Dans le testicule, la protéine (LRP-1) existe dans les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et les macrophages du tissu interstitiel (Igdoura et coll., 1997). Dans

les cellules de Sertoli, la LRP permettrait la captation de l'activateur du plasminogène impliqué dans le passage des spermatocytes préleptotène à travers les jonctions serrées de la cellule de Sertoli entre le compartiment basal et adluminal (Lacroix et coll., 1981; Parvinen, 1982). L'activateur de plasminogène serait aussi impliqué dans le détachement des spermatides de la cellule de Sertoli au moment de la spermiation (Lacroix et coll., 1981; Wright et coll., 1981). Dans le tissu interstitiel du testicule, la LRP permettrait plutôt la captation de cholestérol par les cellules de Leydig et par les macrophages (Igdoura et coll., 1997).

2.1.3.3 Récepteurs "scavengers" (éboueurs)

Les récepteurs "scavengers" ont été découverts dans les plaques d'athérome de patients qui souffrent d'hypercholestérolémie familiale homozygote (Goldstein et coll., 1979; Brown et Goldstein, 1986). Leurs macrophages ne possèdent pas de récepteur de LDL, mais ces macrophages peuvent fixer les LDL acétylées, oxydées ou autrement modifiées (Goldstein et coll., 1979). Les récepteurs "scavengers" sont en mesure de lier différents types de ligands comme les LDL natives et modifiées, les HDL, les molécules endommagées, les cellules apoptotiques et les pathogènes exogènes (Krieger, 1997). Plusieurs types de récepteurs "scavengers" ont été identifiés et subdivisés en classe A, B, C, D et E en fonction de la séquence de leur ADN complémentaire. A l'intérieur de chaque classe, plusieurs types ont été définis. Dans la classe B, on peut citer le récepteur "scavenger" classe B type I (SR-BI) et type II (SR-BII) et le "cluster of differentiation 36" (CD36). SR-BI et SR-BII dérivent du même gène par épissage alternatif (Freeman et coll., 1991; Krieger, 1997). Le SR-BI et son isoforme SR-BII sont distincts des autres récepteurs "scavengers" par leur capacité de se lier avec les HDL avec une forte affinité et de capter le cholestérol estérifié à partir de ces lipoprotéines (Acton et coll., 1996). Il s'agit d'une captation sélective non accompagnée de dégradation de la lipoprotéine. Les HDL s'attachent aux récepteurs SR-BI ou SR-BII, livrent une partie de leur cholestérol

estérifié aux cellules; puis se dissocient des cellules et continuent de circuler dans le sang (Steinberg, 1996; Webb et coll., 1998). Le SR-BI a été décrit dans le foie, les testicules, les ovaires et les glandes surrénales (Acton et coll., 1996; Steinberg, 1996; Webb et coll., 1997; Webb et coll., 1998). Le SR-BII a été identifié dans les testicules, le foie, les glandes surrénales et le tissu adipeux de souris et dans certaines lignées cellulaires humaines (Webb et coll., 1997; Webb et coll., 1998). Le taux de la protéine de SR-BII dans ces tissus est faible et représente 5 à 12 % de la protéine de SR-BI (Webb et coll., 1997). SR-BI et SR-BII lient les HDL avec la même affinité, mais SR-BII transfère le cholestérol des HDL avec une efficacité quatre fois moins importante que SR-BI dans les cellules CHO ("Chinese hamster ovary") transfectées par SR-BI ou SR-BII (Webb et coll., 1998). Une étude a montré que le SR-BI subissait une régulation hormonale et que les hormones qui font augmenter le taux de l'AMPc, induisaient l'expression du SR-BI dans les testicules de souris (Cao et coll., 1999). Une autre étude a montré que le traitement de rats par l'"human chorionic gonadotropin" (hCG) pendant plusieurs jours, provoquait une augmentation de l'expression de SR-BI dans la cellule de Leydig et une augmentation de la captation sélective du cholestérol estérifié par ces cellules, par contre l'expression de SR-BII ne changeait pas (Reaven et coll., 2000), suggérant que les régulations de SR-BI et SR-BII seraient différentes.

La suppression du gène de SR-BI chez la souris provoque la stérilité chez les femelles du fait que le SR-BI est nécessaire au développement des ovules (Trigatti et coll., 1999), par contre les mâles conservent une fertilité normale (Rigotti et coll., 1997). Ces souris SR-BI^{-/-} ont une diminution du contenu cellulaire en cholestérol dans les surrénales et une augmentation de la cholestérolémie (Rigotti et coll., 1997). Inversement, la surexpression de SR-BI augmente l'entrée sélective du cholestérol estérifié des HDL dans le foie et les surrénales de souris (Wang et coll., 1998).

Le CD36 est exprimé par une variété de cellules comme les macrophages, les plaquettes, le placenta, les cellules endothéliales (Greenwalt et coll., 1992) et les cellules

adipeuses (Kuniyasu et coll., 2002). Le CD36 est localisé aussi au niveau des spermatides, des spermatozoïdes et dans les cellules endothéliales des capillaires du testicule (Zibara et coll., 2002). L'augmentation du taux du cholestérol circulant provoque l'augmentation de l'expression du CD36 par le testicule (Zibara et coll., 2002).

Dans les tubules séminifères, le CD36 (Shiratsuchi et coll., 1997) et le SR-BI (Shiratsuchi et coll., 1999) jouent un rôle dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules germinales apoptotiques par la cellule de Sertoli. Le SR-BI joue aussi un rôle dans la reconnaissance dans l'ovaire des cellules granuleuses apoptotiques (Svensson et coll., 1999).

2.1.4 Transport intracellulaire du cholestérol

Le cholestérol intracellulaire a deux origines possibles: le cholestérol peut être synthétisé *de novo* par la cellule dans le réticulum endoplasmique et il peut provenir du milieu extracellulaire apporté par les lipoprotéines. Deux types de lipoprotéines peuvent surtout apporter le cholestérol aux cellules : les LDL (Brown et Goldstein, 1986; Liscum et Munn, 1999; Sviridov, 1999) et les HDL (Acton et coll., 1996; Steinberg, 1996; Liscum et Munn, 1999; Sviridov, 1999). Dans le cas des LDL, celles-ci sont internalisées puis dégradées dans les lysosomes après liaison à un récepteur membranaire *via* le récepteur aux LDL (Brown et Goldstein, 1986). Le cholestérol est alors hydrolysé en cholestérol libre par une "cholestérol estérase" acide lysosomale. Ce cholestérol libre est ensuite à nouveau estérifié par l'ACAT avant d'être stocké sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules (Johnson et coll., 1997; Sviridov, 1999). Dans le cas des HDL, leur liaison aux récepteurs scavengers est suivie d'un transfert direct du cholestérol estérifié dans le cytoplasme où il s'accumule sous la forme de gouttelettes lipidiques (Steinberg, 1996; Reaven et coll., 2000).

Le cholestérol libre endogène ou exogène doit être transporté vers les membranes cellulaires; il doit être aussi transporté vers le réticulum endoplasmique rugueux afin d'être converti en cholestérol estérifié par l'ACAT (Tabas et coll., 1988). D'un autre côté, le cholestérol libre de la membrane plasmique est transporté continuellement à l'intérieur de la cellule (De Grella et Simoni, 1982; Kaplan et Simoni, 1985). Le transport intracellulaire du cholestérol entre les divers sites cellulaires implique des voies différentes et complexes. Le cholestérol est transporté dans la cellule au moins par trois façons : 1) transfert spontané, 2) transfert à l'aide de vésicules et 3) transport par des protéines de transport de lipides appelées 'sterol carrier protein' (SCP); ces mécanismes fonctionnent séparément ou conjointement pour transporter le cholestérol (Reinhart, 1990).

De plus, dans les cellules qui fabriquent les stéroïdes, le cholestérol doit être transporté aux mitochondries où commence la synthèse des hormones stéroïdes (Yago et coll., 1970). Le transport des gouttelettes lipidiques aux mitochondries fait intervenir des éléments du cytosquelette. En effet, les gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme de ces cellules s'attachent aux filaments intermédiaires et plus précisément à la vimentine (Almahbobi et Hall, 1990). Les mitochondries sont elles aussi attachées aux filaments intermédiaires (Almahbobi et coll., 1992). La stimulation hormonale des cellules stéroïdogènes en provoquant une augmentation de Ca^{++} /calmoduline conduit à une réorganisation du cytosquelette. Celle-ci facilite le transport du cholestérol estérifié aux mitochondries (Hall, 1997; Hall et Almahbobi, 1997). Dans ces cellules stéroïdogènes, une autre protéine appelée "steroidogenic acute regulatory protein" (StAR) permet le transfert du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne des mitochondries (Clark et coll., 1994). Cette protéine permet aussi la régulation de la stéroïdogénèse (Sugawara et coll., 1995).

Les résultats cités plus haut démontrent que le cholestérol se trouve dans un état dynamique dans la cellule. La contribution des différentes voies de transport du cholestérol dépend des sources et de la destination du cholestérol, des besoins de la cellule en cholestérol et du type cellulaire.

2.1.5 Structure des gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques sont des structures sphériques dont l'intérieur est composé de triglycérides et de cholestérol estérifié entourés par une monocouche de phospholipides, de cholestérol libre (Prattes, 2000) et un certain nombre de protéines, comme les périlipines (Servetnick et coll., 1995; Wang et Fong, 1995), l'"adipocyte differentiation-related protein" (ADRP), nommée aussi adipophilin (Heid et coll., 1998) et la cavéoline-2 (Fujimoto et coll., 2001). La capsule protéique joue un rôle dans la structure et la fonction de la gouttelette lipidique. Les périlipines et l'ADRP protègent les lipides contenus à l'intérieur de la gouttelette lipidique contre l'action de la HSL (Fong et coll., 1996; Londos et coll., 1999; VanMeer, 2001). La cavéoline-2 serait impliquée dans le transport du cholestérol libre de, ou vers, la gouttelette lipidique (Pol et coll., 2001). Les gouttelettes lipidiques sont entourées aussi par la vimentine qui forme une sorte de cage (Fong et coll., 1996) qui servirait à éviter le contact des gouttelettes lipidiques avec d'autres gouttelettes ou avec d'autres organelles (Murphy et Vance, 1999).

2.2 LE CHOLESTÉROL DANS LE TESTICULE

Les compartiments tubulaire et interstitiel du testicule contiennent tous les deux du cholestérol mais l'origine et le rôle du cholestérol sont différents dans les deux compartiments.

2.2.1 Origine et rôle du cholestérol dans le tissu interstitiel

Le tissu interstitiel remplit l'espace contenu entre les tubules séminifères. Il renferme entre autres, des nerfs, des fibroblastes, des macrophages, des vaisseaux sanguins et lymphatiques et les cellules de Leydig responsables de la biosynthèse de l'hormone mâle, la testostérone à partir du cholestérol. La cellule de Leydig contient du réticulum endoplasmique rugueux et lisse, des mitochondries et des gouttelettes lipidiques dont le nombre varie selon l'espèce (Christensen, 1975).

Dans le tissu interstitiel, les macrophages sont nombreux. On les retrouve dans la proportion d'un macrophage pour quatre cellules de Leydig chez le rat adulte (Bergh, 1985). Les macrophages se trouvent en étroite association avec les cellules de Leydig (Miller et coll., 1983; Niemi et coll., 1986). Les macrophages peuvent capter le cholestérol par deux mécanismes, soit par endocytose de lipoprotéines plasmatiques via des récepteurs scavengers SR-BI et SR-BII (Goldstein et coll., 1979; de Villiers et Smart, 1999), soit par la phagocytose de cellules entières ou de fragments de membranes contenant du cholestérol (Silverstein et coll., 1977). Le cholestérol estérifié est ensuite hydrolysé dans les lysosomes. Le cholestérol libre est re-estérifié par l'ACAT puis s'accumule dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques (Brown et Goldstein, 1983). Les macrophages peuvent donc accumuler de grandes quantités de cholestérol estérifié dans des gouttelettes lipidiques (Brown et Goldstein, 1983). Malgré le fait que les gouttelettes lipidiques apparaissent inertes au microscope électronique, leur cholestérol estérifié oscille dans un état dynamique d'hydrolyse et de re-estérification (Brown et Goldstein, 1983); ce qui suppose que l'ACAT et la HSL soient très actives dans les macrophages.

Dans le tissu interstitiel, le cholestérol utilisé pour la production de la testostérone possède trois origines 1) le cholestérol apporté aux cellules de Leydig par les lipoprotéines plasmatiques en particulier les LDL via le récepteur à apo B/E

(Benahmed et coll., 1981) et les HDL via les récepteurs "scavengers" de classe B, type I (SR-BI) (Reaven et coll., 2000). L'utilisation préférentielle des LDL ou des HDL par les cellules de Leydig varie selon les espèces. Chez l'homme et le porc, le cholestérol provient surtout de l'endocytose des esters de cholestérol contenus dans les LDL (Benahmed et coll., 1983). Au contraire, chez le rat, les HDL constituent la source majeure d'esters de cholestérol (Schreiber et coll., 1982). La captation du cholestérol des lipoprotéines par les cellules de Leydig est régulée entre autre par la LH (Gwynne et Strauss, 1982; Reaven et coll., 2000). 2) Les cellules de Leydig sont capables de synthétiser *de novo* du cholestérol à partir de l'acétyl CoA. Benahmed et coll. en 1981, ont montré que la capacité de synthèse *de novo* du cholestérol par les cellules de Leydig était limitée et ne répondait qu'à 25 % des besoins de la cellule chez le porc (Benahmed et coll., 1981). Cependant, des études effectuées chez le rat (Morris et Chaikoff I.L., 1959), le cobaye (Werbin et Chaikoff I.L., 1961) et l'homme (Gwynne et Strauss, 1982) ont montré que la cellule de Leydig synthétisait la majorité du cholestérol utilisé dans la production de la testostérone et que seulement une faible partie du cholestérol provenait du plasma. 3) Le cholestérol peut provenir aussi de l'hydrolyse du cholestérol estérifié contenu dans les gouttelettes lipidiques (Gwynne et Strauss, 1982; Yeaman, 1990).

Quelle que soit la source du cholestérol, nouvellement synthétisé ou capté par les lipoprotéines plasmatiques, celui-ci est estérifié puis accumulé dans des gouttelettes lipidiques des cellules de Leydig. Dans la cellule de Leydig de souris, les gouttelettes lipidiques diminuent en nombre après la stimulation à la LH et deviennent abondantes après hypophysectomie (Hafiez et Bartke, 1972; Aoki et Massa, 1975). La production de la testostérone par les cellules de Leydig dépend à la fois de la LH et de la prolactine qui se lie à ses récepteurs spécifiques sur les cellules de Leydig et augmente la sensibilité des récepteurs de la LH à la LH (Zipf et coll., 1978; Purvis et coll., 1979). En plus de cette voie dépendante de la LH pour la synthèse de la testostérone, les macrophages sont capables de convertir le cholestérol en 25-hydroxycholestérol, celui-ci est capté et converti en testostérone par les cellules de Leydig (Nes et coll., 2000).

2.2.2 Origine et rôle du cholestérol dans les tubules séminifères

Les tubules séminifères sont de petits tubes creux dont l'intérieur est tapissé d'un épithélium séminifère. Celui-ci est formé de deux types de cellules : les cellules germinales et les cellules de Sertoli. Les cellules de Sertoli nourrissent et soutiennent les cellules germinales au cours de leur développement. La cellule de Sertoli contient entre autres organites, des lysosomes, des phagosomes, des gouttelettes lipidiques (Johnson, 1970; Fawcett, 1975) (figure 3). Le nombre et la taille des gouttelettes lipidiques dans la cellule de Sertoli varient en fonction des stages du cycle de l'épithélium séminifère chez le rat (Kerr et De Kretser, 1975), la souris (Dietert, 1966), le vison (Onstad, 1967) et l'homme (Paniagua et coll., 1987). Chez le rat, le maximum de gouttelettes lipidiques s'observe après la libération des spermatozoïdes matures (Lacy, 1967; Lacy et Pettitt, 1970; Kerr et De Kretser, 1975). En effet, la cellule de Sertoli, assurerait la phagocytose des corps résiduels ainsi que des cellules germinales en dégénérescence (Lacy, 1962; Black, 1971; Russell, 1980). Les phagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes dans la cellule de Sertoli (Petrie et Morales, 1992) (figure 4). Une partie des lipides contenus dans la cellule de Sertoli juste après la spermiation proviendrait de la phagocytose des corps résiduels libérés par les spermatozoïdes matures et une autre partie proviendrait d'une biosynthèse *in situ* (Carreau et coll., 1994). L'inhibition de la spermatogenèse s'accompagne souvent d'une accumulation de gouttelettes lipidiques dans la cellule de Sertoli (Chung et Hamilton, 1975). La destruction des cellules germinales par l'irradiation aux rayons X provoque une augmentation des gouttelettes de lipides dans la cellule de Sertoli (Lacy, 1967). Chez le vison, le nombre des gouttelettes lipidiques est élevé dans la cellule Sertoli au début de la régression testiculaire quand les spermatozoïdes pachytène occupent encore les tubules ; ce nombre diminue considérablement lorsque la régression testiculaire est complète (Pelletier, 1986).

Les gouttelettes lipidiques sont présentes aussi dans les cellules germinales (Kerr et De Kretser, 1975; Pelletier et Vitale, 1994). Une partie des gouttelettes lipidiques

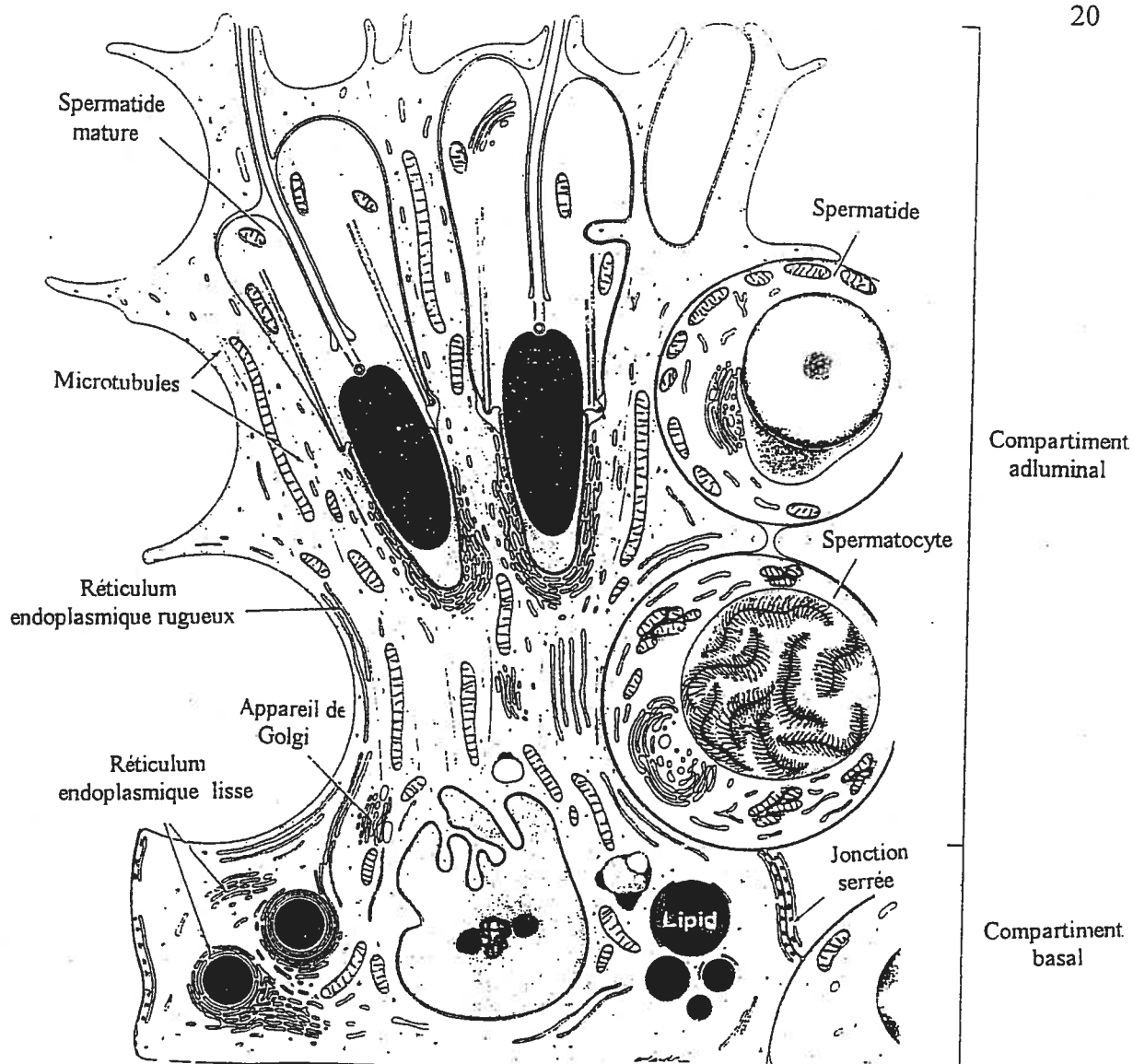


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation des différents types cellulaires du tubule séminifère. La coupe montre les différents types cellulaires qui composent le tubule séminifère. Les jonctions serrées inter-sertoliennes délimitent le compartiment basal, où se situent les spermatogonies et les jeunes spermatocytes primaires (non représentés ici) et le compartiment adluminal contenant les spermatocytes plus âgés et les spermatides. On remarque la présence de gouttelettes lipidiques à la base de la cellule de Sertoli.

Tirée et traduite de : "Fawcett, D.W. *In Male Fertility and Sterility*. Sero symposium: 1973" (Fawcett, 1973).

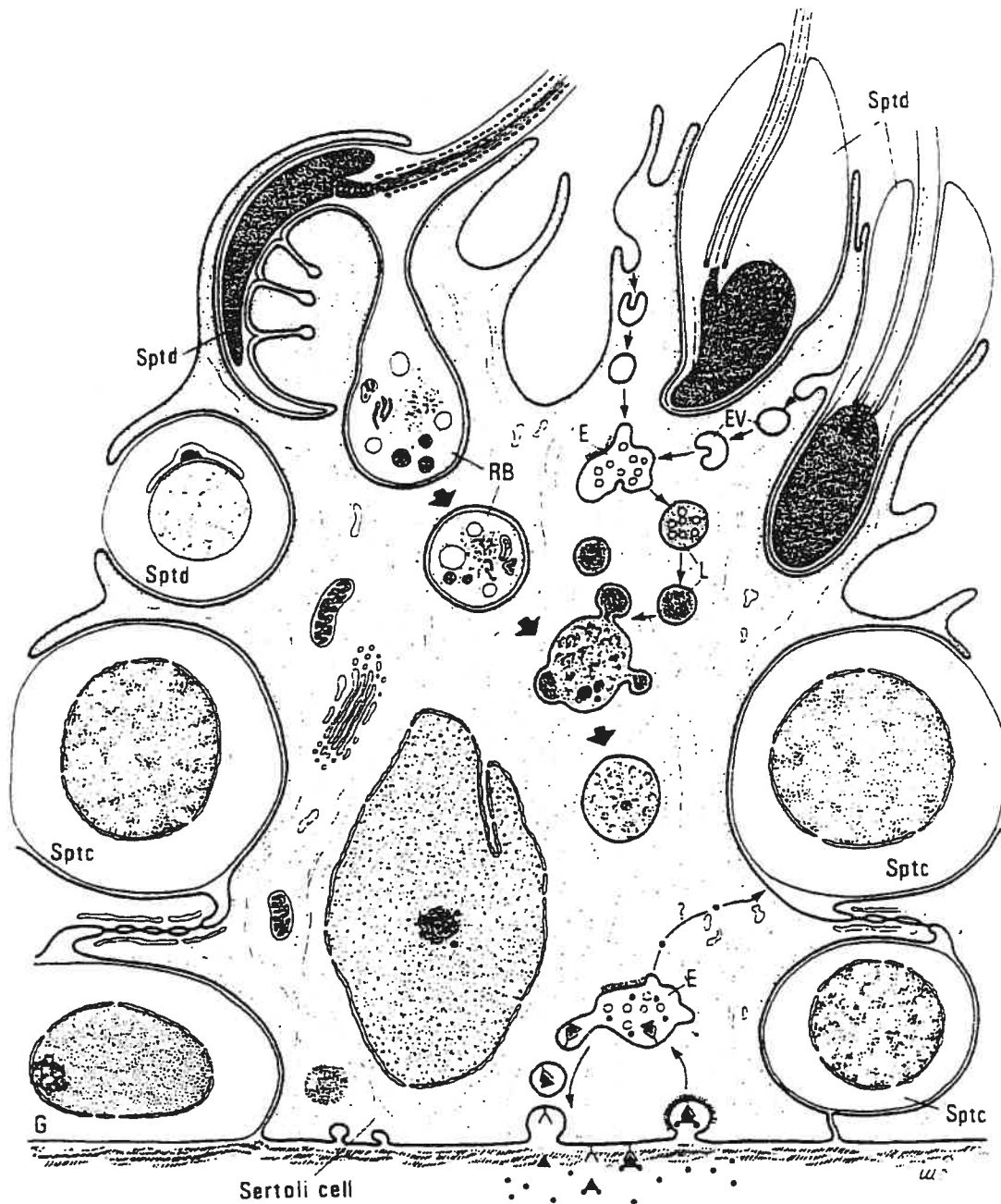


Figure 4 : Représentation de l'activité d'endocytose de la cellule de Sertoli.
 À l'apex, la cellule de Sertoli phagocyte les corps résiduels (RB) qui se détachent des spermatides matures au moment de la spermiation, ces corps résiduels fusionnent avec les lysosomes (L). G = spermatogonie, Sptc = spermatocyte, Sptd = spermatide.

Tirée de : "Petrie, R. and Morales, C.R. Receptors-mediated endocytosis of testicular transferrin by germinal cells of the rat testis. *Cell Tiss Res* 267:45-55, 1992" (Petrie et Morales, 1992).

contenue dans les cellules germinales est libérée dans la lumière des tubules séminifères avec les spermatozoïdes durant la spermiation tandis qu'une autre partie est réabsorbée par la cellule de Sertoli (Pelletier et Vitale, 1994).

Dans le testicule, une barrière hémato-testiculaire permet un tri très sélectif des éléments du sang passant dans les tubules séminifères. Cette barrière se compose de l'endothélium des vaisseaux sanguins et lymphatiques, de cellules myoïdes périlitubulaires, d'une matrice extracellulaire et des jonctions occlusives inter- sertoliennes (Pelletier et Byers, 1992; Pelletier, 2001). Les jonctions occlusives inter- sertoliennes divisent l'épithélium séminifère en compartiment basal incluant les spermatogonies et des jeunes spermatocytes de premier ordre et en compartiment luménal contenant les spermatocytes de premier ordre plus âgés ou des spermatocytes de second ordre et les spermatides (figure 3). Certaines substances comme l'eau, les acides aminés, les sucres et l'urée traversent plus facilement la barrière hémato-testiculaire, d'autres comme le sodium, le potassium et le chlore la traversent difficilement ; enfin, d'autres substances comme l'albumine et le cholestérol du sang ne la traverseraient pas du tout (Setchell et Waites, 1975; Heshmati et coll., 1984).

L'origine du cholestérol dans les tubules séminifères n'est pas entièrement résolue. Une étude a montré que la cellule de Sertoli en culture était capable de synthétiser du cholestérol à partir de l'acétate (Wiebe et Tilbe, 1979). Comme la cellule de Sertoli phagocyte des corps résiduels et des cellules germinales en dégénérescence (Lacy, 1962; Black, 1971; Russell, 1980), elle pourrait aussi recycler leur cholestérol. Enfin le cholestérol pourrait éventuellement provenir des lipoprotéines plasmatiques.

2.2.2.1 Rôle éventuel des lipoprotéines dans l'apport exogène du cholestérol aux tubules séminifères

On possède peu d'information sont connues concernant l'apport exogène du cholestérol aux tubules séminifères à partir des lipoprotéines plasmatiques. Setchell et Waites en 1975 ont révélé dans un article de révision que la barrière hémato-testiculaire empêcherait le libre passage du cholestérol du sang vers les tubules (Setchell et Waites, 1975). Par contre, Fofana et coll. ont montré que la barrière hémato-testiculaire, empêchait le passage des LDL mais permettait le passage des HDL dont la taille est plus petite que celle des LDL (Maboundou et coll., 1995; Fofana et coll., 1996; Fofana et coll., 2000). Ils ont montré aussi que la cellule de Sertoli du rat adulte était capable de capter *in vitro* et *in vivo* le cholestérol des HDL (Fofana et coll., 2000). En culture, la présence de HDL dans le milieu de culture diminue la synthèse endogène du cholestérol par les cellules de Sertoli (Maboundou et coll., 1995; Fofana et coll., 1996). De la même manière, les cellules folliculaires ovariennes utilisent le cholestérol des HDL et les follicules sont séparés des vaisseaux sanguins par une barrière hémato-folliculaire qui empêcherait le passage des LDL mais laisserait passer les HDL (Le Goff, 1995).

Le SR-BI est présent dans les testicules de souris (Acton et coll., 1996; Webb et coll., 1997) et exprimé dans la cellule de Sertoli de rat (Shiratsuchi et coll., 1999). Le récepteur SR-BII est aussi présent dans un homogénat de testicules entiers de souris (Webb et coll., 1997; Webb et coll., 1998); mais aucune étude n'a montré jusqu'à présent l'expression du récepteur SR-BII dans les cellules Sertoli. Puisque SR-BI est exprimé dans les cellules de Sertoli chez le rat (Shiratsuchi et coll., 1999), et puisque ce récepteur est capable de capter le cholestérol à partir des HDL (Acton et coll., 1996; Steinberg, 1996; Webb et coll., 1997; Webb et coll., 1998), il pourrait être impliqué dans la captation du cholestérol par la cellule de Sertoli, comme c'est le cas pour la cellule de Leydig (Reaven et coll., 2000) et pour l'ovaire (Reaven et coll., 1999; Svensson et coll., 1999).

2.2.2.2 Rôle du cholestérol dans les tubules séminifères

Le rôle du cholestérol dans les tubules séminifères n'est pas encore bien connu. Comme la membrane des spermatozoïdes contient du cholestérol (Go et Wolf, 1983), celui-ci interviendrait dans la formation des membranes cellulaires des cellules germinales. En plus, la cellule de Sertoli produit de la testostérone, mais les quantités qu'elle produit ne sont pas physiologiquement significatives (Mahmoud et coll., 1985).

2.3 LE CHOLESTÉROL DANS LES SPERMATOZOÏDES

Les spermatozoïdes sont capables de synthétiser *in vitro* le cholestérol à partir de l'acétate (Johnson et coll., 1967; Gunasegaram et coll., 1995). Ils peuvent aussi estérifier le cholestérol et hydrolyser le cholestérol estérifié *in vitro* (Johnson, 1970). Chez une même espèce, le contenu en cholestérol des spermatozoïdes est différent dans les spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés. En effet, durant le passage épидидymaire, le contenu en cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes est modifié (Johnson, 1970; Parks et Hammerstedt, 1985; Hall et coll., 1991; Rana et coll., 1991). Certaines études ont montré que durant le passage épидидymaire, le cholestérol de la membrane plasmique augmentait dans les spermatozoïdes de chèvre (Rana et coll., 1991) et du sanglier (Seki et coll., 1992). Cependant, d'autres études ont montré que le contenu en cholestérol diminuait dans les spermatozoïdes de bélier (Parks et Hammerstedt, 1985) et du sanglier (Nikolopoulou et coll., 1985); de même Scott et coll. ont montré que le taux du cholestérol total des spermatozoïdes testiculaires était approximativement le double de celui des spermatozoïdes éjaculés chez le bélier (Scott et coll., 1967).

La modification du rapport cholestérol/phospholipides dans les membranes cellulaires influence leur fluidité et leur fonctions, notamment leur perméabilité (Yeagle,

1985; Yeagle, 1989). La proportion du cholestérol par rapport aux autres lipides dans la membrane plasmique des spermatozoïdes détermine leur fertilité (Davis, 1980; Go et Wolf, 1983; Sugkrarook et coll., 1991). Ceci suggère que durant la maturation épидидymaire, le cholestérol soit une molécule clé qui entraîne une modification des caractéristiques de la membrane plasmique du spermatozoïde qui détermine sa fertilité (Go et Wolf, 1983; Parks et Hammerstedt, 1985).

Du fait de l'importance du cholestérol dans la maturation des spermatozoïdes, quelques études ont suggéré une relation entre le cholestérol membranaire des spermatozoïdes et certains cas d'infertilité. Ainsi Sugkrarook et coll. en 1991 rapportaient que le rapport cholestérol/phospholipides des spermatozoïdes d'hommes présentant une infertilité inexplicée était deux fois plus élevé que celui observé dans les spermatozoïdes de sujets fertiles (Sugkrarook et coll., 1991). Toutefois, il ne semble pas y avoir de corrélation directe entre le niveau du cholestérol sanguin et celui des membranes cellulaires des spermatozoïdes suggérant que le contenu en cholestérol des spermatozoïdes soit régulé localement à l'intérieur du système reproducteur mâle (Grizard et coll., 1995) probablement, par la barrière hémato-testiculaire.

Les changements dans la proportion en cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes durant la maturation nécessiteraient des modifications du métabolisme du cholestérol à l'intérieur des spermatozoïdes qui feraient intervenir des enzymes spécifiques du métabolisme du cholestérol.

2.4 LES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU CHOLESTÉROL

Le cholestérol libre est contenu dans les membranes cellulaires. Dans certains organes qui ont un grand besoin en cholestérol, comme les gonades et les surrénales, les

cellules contiennent des gouttelettes lipidiques. Du fait de son caractère hydrophobe, le cholestérol libre intracellulaire est normalement maintenu à un taux faible et constant. Tout apport supplémentaire en cholestérol libre qui serait toxique pour la cellule (Warner et coll., 1995) est estérifié et mis en réserve dans des gouttelettes lipidiques. En cas de besoin, le cholestérol estérifié est utilisé après son hydrolyse en cholestérol libre. Ce qui explique la présence d'une régulation importante du pool du cholestérol intracellulaire. Trois enzymes principales sont impliquées dans le métabolisme du cholestérol intracellulaire, la HSL, l'ACAT et l'HMG-CoA réductase.

2.4.1 La lipase hormono-sensible (HSL)

La HSL est une enzyme qui libère le cholestérol à partir du cholestérol estérifié (Cook et coll., 1982). De plus, elle mobilise des acides gras en contrôlant la vitesse de la lipolyse dans les adipocytes et en fournissant des substrats oxydables à l'organisme par l'hydrolyse des triglycérides intracellulaires (Cook et coll., 1982). C'est une enzyme cytoplasmique dont l'activité maximale s'exerce à pH 7 (Stralfors et coll., 1987). La HSL a été identifiée à la "cholestérol ester hydrolase" (CEH) neutre par plusieurs études (Cook et coll., 1982 ; Cook et coll. 1983; Cordle et coll., 1986; Small et coll., 1989; Yeaman, 1990; Small et coll., 1991; Kraemer et coll., 1993a). La HSL a été localisée dans le tissu adipeux, qui est le tissu le plus riche en cette enzyme, les testicules, les surrénales, les ovaires, le placenta, le cœur, le muscle lisse et squelettique et les macrophages (Holm et coll., 1987; Kraemer et coll., 1993a). Dans les gonades et les surrénales, l'enzyme hydrolyse essentiellement le cholestérol estérifié alors que dans le tissu adipeux, elle hydrolyse les triglycérides (Trzeciak et Boyd, 1973; Beins et coll., 1982; Cook et coll., 1982). Cette différence de fonction de la HSL selon les tissus où elle se trouve serait en relation avec le fait que les gouttelettes lipidiques des cellules stéroïdogènes sont riches en cholestérol estérifié, alors que les gouttelettes lipidiques des cellules adipeuses sont plutôt riches en triglycérides (Atshaves et coll., 2001).

2.4.1.1 Régulation de la HSL dans l'organisme

La HSL dépend d'un contrôle hormonal d'où le nom lipase hormono-sensible ou "hormone-sensitive lipase". Dans le tissu adipeux, l'activité de cette enzyme est régulée par son état de phosphorylation/déphosphorylation, état qui est modifié par l'augmentation hormonale de l'AMPc (Small et coll., 1991; Kraemer et coll., 1993a). La forme phosphorylée de la HSL est la forme active (Small et coll., 1991). Quand le taux AMPc augmente dans la cellule, il se produit une phosphorylation de la HSL. La protéine kinase A catalyse la phosphorylation de la HSL en deux sites : la phosphorylation du premier site (ser 563, chez le rat) est corrélée avec l'activation de l'enzyme (Yeaman, 1990). La phosphorylation du second site (ser 565, chez le rat) altère indirectement l'activité de la HSL en rendant le premier site inaccessible à la protéine kinase A (Garton et Yeaman, 1990). La phosphorylation des deux sites est mutuellement exclusive ; si le second site est phosphorylé, le premier site devient inaccessible à la protéine kinase A (Yeaman, 1990). Il se pourrait que les phosphorylations provoquent un changement conformationnel de la HSL qui faciliterait son accès aux substrats contenus dans la gouttelette lipidique (Contreras et coll., 1996).

Après l'action de l'AMPc et la phosphorylation de la HSL, il se produit une translocation de l'enzyme du cytosol vers son substrat à la surface des gouttelettes lipidiques (Egan et coll., 1992). Cette translocation serait facilitée par une famille de protéines associées aux gouttelettes lipidiques : les périlipines (Londos et coll., 1995; Clifford et coll., 2000). Lorsque la cellule n'est pas stimulée, les périlipines entourent la gouttelette lipidique. La phosphorylation des périlipines par la protéine kinase A rompt leur ancrage et provoque leur libération dans le cytoplasme. La HSL parallèlement activée par la protéine kinase A accède aux gouttelettes lipidiques (Clifford et coll., 1997; Clifford et coll., 2000).

Certaines phosphatases permettent aussi une régulation réversible de la HSL. La HSL phosphorylée est un bon substrat pour les phosphatases 1, 2A et 2C (Olsson et Belfrage, 1988; Wood et coll., 1993). Ces phosphatases exercent une activité plus importante au second site qu'au premier (Wood et coll., 1993). La balance entre l'action des kinases et celle des phosphatases détermine le niveau d'activation de l'enzyme.

Des études ont montré que la quantité de l'ARNm de la HSL variait durant le développement dans certains tissus chez le rat ; ainsi, une augmentation de l'ARNm de la HSL de 25 fois et de 9 fois le niveau fœtal était observée dans les testicules et dans les surrénales respectivement durant le développement postnatal ; mais aucune variation n'était observée dans le tissu adipeux (Kraemer et coll., 1991; Kraemer et coll., 1993a). D'après ces résultats, ces auteurs ont suggéré que la régulation de la HSL variait selon les tissus avec une régulation post-translationnelle par phosphorylation, dans les tissus où elle agit sur les triglycérides comme dans le tissu adipeux, et une régulation pré-translationnelle dans les tissus où elle agit sur le cholestérol comme dans le testicule (Kraemer et coll., 1991).

2.4.1.2 Rôle de la HSL dans le testicule

La HSL a été décrite dans la cellule de Sertoli chez le rat (Stenson Holst et coll., 1994; Stenson Holst et coll., 1996) et chez l'homme (Blaise et coll., 2001). La protéine de la HSL est exprimée dans les cellules germinales (spermatogonie B, spermatocytes de premier ordre, spermatides rondes et spermatides allongées) chez le rat, la souris et l'homme (Blaise et coll., 1999; Blaise et coll., 2001; Mairal et coll., 2002). L'expression de la HSL est plus élevée dans les spermatides allongées (Blaise et coll., 2001; Mairal et coll., 2002). La HSL est aussi présente dans les corps résiduels libérés par les spermatides matures chez la souris et le rat (Blaise et coll., 2001) et dans les

spermatozoïdes épидидymaires de souris (Blaise et coll., 1999) et de rat (Stenson Holst et coll., 1996). Dans les cellules de Leydig, la présence de la HSL est controversée. Certains auteurs n'ont pas détecté la HSL dans le tissu interstitiel du testicule de rat (Stenson Holst et coll., 1994; Stenson Holst et coll., 1996). Par contre, d'autres auteurs ont montré que la HSL était exprimée dans les cellules de Leydig humaines (Mairal et coll., 2002). Une activité de la HSL a été rapportée aussi dans le tissu interstitiel de rat adulte (Renston et coll., 1977; Durham et Grogan, 1984).

Plusieurs études ont montré que la HSL exprimée dans les testicules avait une masse moléculaire (MM) plus élevée que celle de la HSL exprimée dans le tissu adipeux de la même espèce (Holm et coll., 1987; Kraemer et coll., 1993a; Stenson Holst et coll., 1994). La HSL des adipocytes est une protéine de MM estimée à 84-kDa chez le rat (Kraemer et coll., 1993a), à 88-kDa chez l'humain (Holm et coll., 1989) et à 82-kDa chez la souris (Holm et coll., 1989). Dans le cœur, les surrénales, les poumons et les ovaires, l'enzyme a une MM de 84-88-kDa chez le rat (Holm et coll., 1987; Kraemer et coll., 1993a). Dans le testicule de rat, Holm et coll. en 1987 ont identifié une isoforme de la HSL de 86-kDa et deux autres isoformes de MM plus élevées dont ils n'avaient pas déterminé précisément la MM (Holm et coll., 1987). Kraemer et coll., en 1993, ont rapporté la présence d'une isoforme de 102-kDa dans les testicules de rat prépubère et de deux isoformes additionnelles de 113- et 127-kDa chez le rat pubère (Kraemer et coll., 1993a). Mais Stenson et coll., en 1996, ont détecté une seule forme de la HSL de 130-kDa dans les testicules de rat et de 116-kDa dans les testicules de l'homme (Stenson Holst et coll., 1996).

La taille de l'ARNm de la HSL dans le testicule diffère de celle retrouvée dans les autres tissus. Chez le rat, l'ARNm de la HSL du tissu adipeux est de 3.3 kb, celui-ci est traduit en une protéine de 84-kDa ; alors que l'ARNm de la HSL dans les testicules est de 3.9 kb, celui-ci est traduit en une protéine de 130-kDa, mais les deux isoformes dérivent du même gène (Stenson Holst et coll., 1994; Stenson Holst et coll., 1996). La

différence de taille entre la HSL testiculaire et la HSL adipocytaire est due à la présence à la partie N-terminale d'une séquence de 300 acides aminés additionnels spécifiques de la HSL testiculaire et codée par un exon en amont du gène (Stenson Holst et coll., 1996) ; toutefois, les deux enzymes conservent une activité catalytique semblable, puisque le site catalytique est situé à la partie C-terminale (Osterlund et coll., 1996). Blaise et coll. en 1999 ont montré chez la souris que l'isoforme testiculaire de la HSL était codée par dix exons : neuf exons communs aux testicules et au tissu adipeux et un exon spécifique aux testicules (Blaise et coll., 1999).

Mairal et coll. en 2002 ont montré que la forme longue de la HSL, de 3,9 kb spécifique au testicule était exprimée par les cellules germinales haploïdes, alors que la forme courte, de 3,3 kb était exprimée dans la cellule de Sertoli, les spermatogonies, les spermatocytes pachytène. Les deux ARNm de la HSL sont le produit de la transcription du même gène par deux (2) promoteurs différents selon le type de cellules testiculaires (Mairal et coll., 2002). Blaise et coll. en 2001 ont suggéré que la forme de la HSL spécifique au testicule pourrait être nécessaire à la différenciation des cellules germinales durant la spermiogenèse (Blaise et coll., 2001).

Enfin, le rôle de la HSL a été confirmé par délétion du gène de la HSL chez la souris (Osuga et coll., 2000; Chung et coll., 2001). Des souris HSL^{-/-} présentaient une absence complète de l'activité d'hydrolyse du cholestérol estérifié, accompagnée d'une augmentation significative du taux du cholestérol estérifié dans un homogénat de testicule entier (Osuga et coll., 2000). Chez ces souris, les autres tissus stéroïdogènes étaient peu affectés, du fait que les taux circulants des hormones stéroïdes étaient normaux. Ces souris mâles étaient stériles (Osuga et coll., 2000; Chung et coll., 2001). Cette stérilité était due à une oligospermie. L'épididyme de ces souris contenait des spermatocytes et quelques spermatozoïdes immatures et immobiles. Leurs cellules de Sertoli étaient chargées de cholestérol estérifié (Osuga et coll., 2000).

L'activité de la HSL subit une régulation hormonale au niveau du testicule. Le traitement de rat sexuellement immature par la hCG provoque une augmentation du taux de la protéine et de l'activité de la HSL dans les testicules (Kraemer et coll., 1993b). Durham et Grogan en 1984 ont montré l'existence de deux formes de la HSL, une forme présente dans la cellule de Sertoli et une autre forme présente dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig. La forme présente dans la cellule de Sertoli augmentait de 20 fois après injection de la FSH chez des rats hypophysectomisés. Cette forme n'était pas sensible à la LH. Par contre, la forme présente dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig était sensible à la LH et à la FSH (Durham et Grogan, 1984). L'existence de ce mécanisme de régulation par la FSH et la LH suggère que la HSL testiculaire serait impliquée dans la libération du cholestérol nécessaire à la production de la testostérone et à l'issue de la spermatogenèse.

2.4.2 L'acyl-Coenzyme A :cholestérol acyl transférase (ACAT)

L'ACAT est une enzyme intracellulaire qui catalyse la formation du cholestérol estérifié à partir du cholestérol et de longues chaînes d'acide gras. C'est une protéine intégrale du réticulum endoplasmique rugueux (Balasubramaniam et coll., 1978; Venkatesan et coll., 1980; Chang et coll., 1997) qui régularise le taux du cholestérol libre intracellulaire (Chang et coll., 1997). Le cholestérol estérifié par l'ACAT est stocké à l'état soluble sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytosol. Quand l'apport en cholestérol augmente, son estérification par l'ACAT augmente. Dans les macrophages de souris, l'inhibition de l'ACAT, provoque une augmentation du cholestérol libre et la mort cellulaire (Warner et coll., 1995). Le cholestérol estérifié est en équilibre rapide avec le cholestérol libre grâce à l'activité de la HSL (Brown et Goldstein, 1983).

L'ACAT se trouve dans une variété de tissus incluant le cerveau, le rein, le foie, le cœur, le muscle squelettique, les macrophages et les tissus stéroïdogènes (surrénales,

testicules et ovaires) chez l'homme, le lapin et la souris (Uelmen et coll., 1995; Meiner et coll., 1997) mais l'ARNm de l'ACAT est plus abondant dans les tissus stéroïdogènes et les macrophages que dans les autres tissus (Chang et coll., 1997). La masse moléculaire de l'ACAT est de 50-kDa chez l'homme (Chang et coll., 1995; Lee et coll., 1998) et de 46-kDa chez la souris (Meiner et coll., 1997).

Les souris ACAT^{-/-} mâles et femelles sont fertiles et grandissent normalement (Meiner et coll., 1996). Même si elles affichent une réduction du cholestérol estérifié dans les glandes surrénales et dans les macrophages du péritoine, leur foie contient de grandes quantités du cholestérol estérifié et l'activité d'estérification du cholestérol n'est pas diminuée. Ceci suggère l'existence de plus d'une enzyme d'estérification du cholestérol dans les tissus des mammifères (Meiner et coll., 1996).

2.4.2.1 Régulation de l'ACAT dans l'organisme

Plus le cholestérol libre augmente dans la cellule, plus l'ACAT est activée, sans que le taux de l'ARNm de l'ACAT augmente, ce qui suggère que l'activité de l'ACAT dépendrait du taux du cholestérol libre (Cheng et coll., 1995; Matsuda et coll., 1996). Le mécanisme par lequel le cholestérol active l'ACAT n'est pas connu. Comme l'ACAT est une enzyme allostérique, il est possible que la fixation du cholestérol à l'ACAT induise des changements de conformation capables d'activer l'enzyme (Monod, 1966; Koshland et Neet, 1968).

La littérature rapporte des données contradictoires au sujet de l'effet de l'AMPc sur l'ACAT. Des études *in vitro* ont montré que l'ACAT était inhibée par des conditions expérimentales qui favoriseraient la phosphorylation dans les surrénales (Suckling et coll., 1983b) mais qu'elle était activée dans les mêmes conditions dans le foie, l'intestin et les glandes mammaires chez le rat (Suckling et coll., 1983a; Shand et West, 1991).

Cependant, d'autres auteurs ne sont pas arrivés à démontrer la modulation de l'activité de l'ACAT par phosphorylation dans le foie humain (Einarsson et coll., 1989). Suckling et Stange, en 1985 ont expliqué cette contradiction de l'effet de l'AMPc sur l'ACAT par le fait que, contrairement au foie, dans les tissus stéroïdogènes l'AMPc n'activait pas l'ACAT, parce que ces tissus contiennent la HSL qui elle, est activée par l'AMPc. L'ACAT et la HSL ne peuvent pas être activées toutes les deux par l'AMPc dans les tissus stéroïdogènes, du fait que ces deux enzymes catalysent des réactions opposées. Les conditions qui favorisent alors l'activation de l'ACAT dans le foie l'inhibent dans les tissus stéroïdogènes. La LH et l'ACTH inhibent l'activité de l'ACAT respectivement dans les gonades et les surrénales (Suckling et Stange, 1985).

2.4.2.2 L'ACAT dans le testicule

L'ACAT a été largement étudiée dans les surrénales (Suckling et Stange, 1985) et dans l'ovaire (Strauss et coll., 1981). Cependant, dans les testicules, seulement quelques rares études ont montré la présence de l'ACAT dans des homogénats de testicules de souris (Uelmen et coll., 1995; Meiner et coll., 1997). Aucune étude n'a montré jusqu'à présent, la régulation ou même la présence de l'ACAT dans les tubules séminifères ou dans les cellules de Leydig.

Du fait que plusieurs fonctions de l'ovaire et du testicule sont similaires, on peut extrapoler la régulation de l'ACAT dans l'ovaire et dans le testicule. Ainsi, quand l'apport exogène en cholestérol est réduit, l'activité de l'ACAT dans les ovaires diminue de plus de 80% (Schuler et coll., 1981). L'inhibition de la stéroïdogénèse, produit une augmentation de l'activité de l'ACAT et l'accumulation du cholestérol estérifié (Schuler et coll., 1981). La stimulation du tissu ovarien par la LH provoque une réduction de l'estérification du cholestérol (Flint et coll., 1973) en diminuant l'activité de l'ACAT (Schuler et coll., 1981). Le mode d'action de la LH sur l'ACAT n'est pas connu. Il est

possible que la diminution du taux du cholestérol libre qui induit la diminution de l'activité de l'ACAT, ou que l'augmentation de la progestérone qui joue un rôle d'inhibiteur allostérique de l'ACAT (Flint et coll., 1973). La PRL est nécessaire au maintien de l'activité d'estérification du cholestérol dans les ovaires de rat (Behrman et coll., 1970). L'action de la PRL sur l'ACAT serait secondaire à son effet sur l'augmentation de la captation du cholestérol apporté par les lipoprotéines (Strauss et coll., 1981) ou sur son action sur la HSL (Klemcke et Brinkley, 1980).

2.4.3 L'hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) réductase

L'HMG-CoA réductase est une glycoprotéine de 97-kDa (Liscum et coll., 1983), riche en mannose. C'est une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique lisse (Roïtelman et coll., 1992). Elle catalyse la conversion de l'HMG-CoA en mévalonate, précurseur de stérol, une étape limitante dans la biosynthèse du cholestérol. Cette enzyme est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux et agirait dans le réticulum endoplasmique lisse (Liscum et coll., 1983).

2.4.3.1 Régulation de l'HMG-CoA réductase dans l'organisme

Le contrôle de l'HMG-CoA réductase est assuré par la régulation de sa transcription, de sa traduction, de l'état de sa phosphorylation et de la vitesse de sa dégradation (Meigs et Simoni, 1997). Le taux de l'HMG-CoA réductase dépend des besoins de la cellule en cholestérol (Correll et Edwards, 1994). Lorsque la concentration du cholestérol apporté par les LDL diminue, la quantité de la protéine de l'HMG-CoA réductase augmente grâce à une élévation de sa synthèse accompagnée d'une diminution de la vitesse de sa dégradation. Lorsque l'on ajoute des LDL à des cellules en culture,

ces effets sont inversés. C'est ce qu'on appelle la régulation par rétroaction (Goldstein et Brown, 1990).

L'HMG-CoA réductase existe sous deux formes, une forme active, déphosphorylée et une forme inactive phosphorylée. L'HMG-CoA réductase est phosphorylée (inactivée) en position Ser 871 grâce à une protéine kinase, dépendante de l'AMPc (Sato et coll., 1993). L'AMPc n'a pas un effet direct sur l'activité de l'HMG-CoA réductase. En effet, l'élévation du taux de l'AMPc empêche l'activation de l'HMG-CoA réductase en stimulant sa phosphorylation et en inhibant sa déphosphorylation (Botham, 1992).

2.4.3.2 L'HMG-CoA réductase dans le testicule

L'HMG-CoA réductase est active dans les cellules de Leydig (Charreau et coll., 1981). L'HMG-CoA réductase agit aussi dans les cellules germinales à différents stades de leur développement. Cette activité a été mesurée dans les spermatocytes leptotène, zygotène, et pachytène, les spermatides rondes et matures (Potter et coll., 1981). L'HMG-CoA réductase est aussi présente dans les corps résiduels (Potter et coll., 1981). Aucune étude n'a montré jusqu'à présent l'existence de l'HMG-CoA réductase dans les cellules de Sertoli. Puisque les cellules de Sertoli en culture ont la capacité de synthétiser le cholestérol à partir de l'acétate (Wiebe et Tilbe, 1979), elles devraient posséder les enzymes nécessaires à cette synthèse, notamment l'HMG-CoA réductase.

Ness et Nazian ont montré que l'ARNm de l'HMG-CoA réductase possédait deux isoformes spécifiques au testicule. Dans un homogénat de testicule de rat adulte, trois isoformes de 4,8, 4,2 et 4 kb, de l'HMG-CoA réductase ont été détectées. Par contre, dans le foie, l'intestin grêle, les reins, le cerveau et les poumons de rat adulte, seule l'isoforme de 4,8 kb a été détectée (Nazian et coll., 1991; Ness et Nazian, 1992). Durant le développement testiculaire chez le rat, le taux des isoformes de 4 et 4,2 kb

augmentait d'une façon marquée avec une légère diminution du taux de l'isoforme de 4,8 kb (Ness et Nazian, 1992). L'activité totale de l'HMG-CoA réductase dans le testicule augmentait durant le développement testiculaire jusqu'à l'âge de 26 jours puis diminuait par la suite (Ness et Nazian, 1992). Cette variation de l'activité de l'HMG-CoA réductase dans le testicule pourrait correspondre à la variation de l'activité de cette enzyme dans les cellules germinales (Potter et coll., 1981). En effet, le dosage de l'activité de l'HMG-CoA réductase dans des populations de cellules germinales purifiées a montré que le maximum d'activité se trouvait dans les spermatocytes pachytène de souris, et surtout dans les spermatocytes pachytène de souris prépubères (Potter et coll., 1981). Cette activité diminue dans les spermatides arrondies et les stades suivants. La même étude a montré que le taux de synthèse du cholestérol augmentait de 4 à 5 fois quand les spermatocytes se développaient du stade preleptotène au stade pachytène et diminuait dans les spermatozoïdes (Potter et coll., 1981).

Le taux de l'ARNm total de l'HMG-CoA réductase augmente dans un homogénat de testicules après injection de la LH ou de la FSH chez des rats immatures hypophysectomisés (Nazian et coll., 1991). Dans la cellule de Leydig de rat adulte, la LH active l'HMG-CoA réductase et la biosynthèse du cholestérol ; le contrôle de la synthèse de la testostérone par la LH se fait par l'intermédiaire de l'HMG-CoA réductase (Charreau et coll., 1981). L'activité de l'HMG-CoA réductase dans les cellules de Leydig n'est pas régulée par le cholestérol exogène contrairement aux autres tissus stéroïdogènes où l'activité de cette enzyme est régulée par feed-back en réponse au cholestérol apporté par les lipoprotéines ; cette enzyme est plutôt modulée par la LH (Charreau et coll., 1981).

2.5 INFLUENCE DES HORMONES SUR LE MÉTABOLISME DU CHOLESTÉROL TESTICULAIRE

Certaines hormones ont un effet sur la synthèse du cholestérol ou sur le rapport cholestérol libre/cholestérol estérifié dans plusieurs tissus comme le foie (Edwards, 1973), l'intestin (Field et coll., 1990), les glandes surrénales (Faust et coll., 1988) et l'ovaire (Strauss et coll., 1981). Dans la section suivante nous aborderons l'effet de la LH, la FSH, la testostérone et de la prolactine sur le métabolisme du cholestérol testiculaire.

2.5.1 L'hormone lutéinisante " Luteinising Hormone" (LH)

La LH influence le métabolisme du cholestérol dans la cellule de Leydig. La stimulation de la cellule de Leydig en culture par la LH provoque une chute du cholestérol estérifié dans ces cellules (Pokel et coll., 1972; Moyle et coll., 1973). L'hypophysectomie ou l'utilisation d'inhibiteurs de gonadotropine chez la souris provoque une accumulation de gouttelettes lipidiques contenant du cholestérol dans le cytoplasme des cellules de Leydig (Hafiez et Bartke, 1972; Aoki et Massa, 1975). Le traitement de rat sexuellement immature par injection quotidienne de l'hCG provoque une augmentation graduelle de l'activité de la HSL dans un homogénat de testicules de rat (Kraemer et coll., 1993b). La LH se lie spécifiquement à son récepteur situé sur la membrane plasmique des cellules de Leydig, la LH active l'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine G ; l'AMPc ainsi généré, active alors une protéine kinase A qui module l'activité et l'expression des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse (Gasnier, 1999). D'un autre côté la HSL est par activée par phosphorylation par la protéine kinase A dans le tissu adipeux (Stralfors et coll., 1987) et dans les macrophages

(Escary et coll., 1998). Toutefois le mécanisme exact de l'effet de la LH sur l'hydrolyse du cholestérol ou sur la HSL dans le tissu interstitiel n'est pas démontré jusqu'à présent.

La LH influence le métabolisme du cholestérol en inhibant aussi l'activité de l'ACAT dans l'ovaire de rat *in vivo* (Suckling et Stange, 1985) et en augmentant la captation du cholestérol extracellulaire puisqu'elle stimule l'expression du récepteur SR-BI par les cellules de Leydig de rat *in vivo* (Reaven et coll., 2000).

2.5.2 L'hormone folliculo-stimulante " Follicle-Stimulating Hormone" (FSH)

Peu d'études concernent l'effet de la FSH sur le métabolisme du cholestérol. Dans la cellule de Sertoli, la FSH influencerait le métabolisme du cholestérol puisque l'activité de la HSL augmente dans la cellule de Sertoli jusqu'à 20 fois en réponse au traitement à la FSH chez le rat hypophysectomisé (Durham et Grogan, 1984). Dans la cellule de Sertoli, la FSH est le principal régulateur du taux d'AMPc (Griswold, 1993). Puisque la HSL est activée par l'AMPc (Hardie et coll., 1989; Yeaman, 1990), il est plausible que la FSH régule l'activité de la HSL. La HSL serait un moyen par lequel la FSH stimulerait la libération du cholestérol dans la cellule de Sertoli devant être utilisé au cours de la spermatogenèse (figure 5). La FSH influencerait aussi la synthèse *de novo* du cholestérol puisque l'injection de la FSH chez des rats immatures hypophysectomisés augmente le taux de l'ARNm de l'HMG-CoA réductase dans un homogénat de testicules (Nazian et coll., 1991).

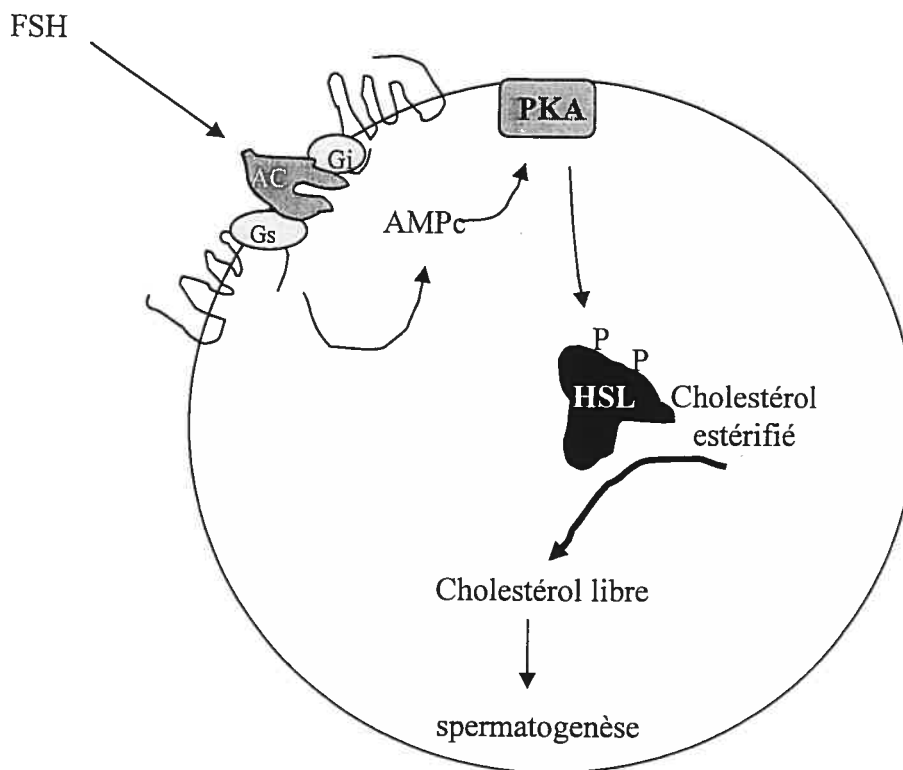


Figure 5 : Régulation de la HSL: La FSH active la protéine Gs et l'adénylate cyclase, ce qui génère de l'AMPc qui à son tour active la protéine kinase A. La protéine kinase A catalyse la phosphorylation de la HSL, ce qui en augmente l'activité (Stralfors et coll., 1987). La HSL hydrolyse le cholestérol estérifié. Je suggère que le cholestérol libre généré soit utilisé dans la spermatogenèse. P = périlipine.

Tirée et modifiée à partir de: "Saltiel, A.R. Another hormone-sensitive triglyceride lipase in fat cells? *Proc Natl Acad Sci USA* 97:535-537, 2000" (Saltiel, 2000).

2.5.3 La testostérone

La testostérone est formée à partir du cholestérol dans le tissu interstitiel du testicule. La testostérone est aussi synthétisée dans les glandes surrénales mais en quantité relativement faible par rapport à celle produite dans les testicules. La testostérone agit dans plusieurs tissus et entre autres dans les tubules séminifères. Avec la FSH, elle assure l'initiation de la spermatogenèse et son maintien chez l'adulte (Griswold, 1993). La testostérone se lie à ses récepteurs spécifiques situés à l'intérieur du noyau de la cellule de Sertoli (Sanborn et coll., 1981) où elle est impliquée dans la modification de la transcription des gènes (Saez et coll., 1985; Mills, 1990).

La cellule de Sertoli est une cellule sensible aux effets de la testostérone, qui avec la FSH induisent une modification de sa morphologie et de sa fonction. La cellule de Sertoli sert d'intermédiaire entre la cellule de Leydig et les cellules germinales qui dépendent de la testostérone pour leur maturation spermatogénétique bien qu'elles n'en possèdent pas elles-mêmes le récepteur (Josso et Rey, 1995).

Peu d'informations sont connues concernant l'effet de la testostérone sur le métabolisme du cholestérol. Une étude a montré que le traitement du tissu testiculaire de rat avec la testostérone *in vitro* augmentait la capacité de ce tissu à synthétiser le cholestérol à partir de l'acétate et augmentait l'estérification du cholestérol libre par les cellules de ce tissu (Johnson, 1970).

2.5.4 La prolactine (PRL)

On a proposé que la PRL affectait le rapport entre le cholestérol libre et le cholestérol estérifié (Bartke, 1969; Sheriff, 1986). La PRL provoque une accumulation du cholestérol estérifié dans un homogénat de testicule de souris (Bartke, 1969; Bartke,

1971a ; Bartke, 1971b) et de rat (Sheriff, 1986). La PRL agit sur certaines cellules testiculaires. Des récepteurs à la PRL ont été identifiés sur les cellules de Leydig (Orgebin-Christ et Djiane, 1979), au niveau des macrophages (Demoraes et coll., 1995) et à la surface des spermatozoïdes (Perryman et Thorner, 1981). L'effet de la PRL sur le cholestérol testiculaire est différent selon la cellule testiculaire considérée. La PRL favorise l'accumulation de cholestérol libre dans les cellules germinales, par contre, elle diminue le cholestérol total dans les cellules de Leydig matures de singe (Gunasekar et coll., 1991). La PRL n'a pas d'effet sur le cholestérol dans les cellules de Sertoli chez le singe (Gunasekar et coll., 1991). Le mécanisme de l'effet de la PRL sur la HSL n'est pas bien connu, puisqu'on a suggéré que la PRL participerait aussi à la régulation de l'ACAT (Behrman et coll., 1970). L'effet de la PRL sur le rapport entre le cholestérol libre et estérifié pourrait être médié par son effet sur l'ACAT. Par contre, cette hormone est sans effet sur l'activité de l'HMG-CoA réductase (Sheriff, 1986) suggérant que la PRL n'agirait pas sur la synthèse du cholestérol.

2.6 LA SPERMATOGENÈSE

La spermatogenèse est une longue série de transformations cytologiques qui se déroule dans les tubules séminifères et qui conduit d'une cellule germinale souche à une cellule très différenciée, le spermatozoïde (Clermont, 1967). La spermatogenèse peut se diviser en trois phases distinctes : 1) les divisions mitotiques des spermatogonies, 2) la division méiotique des spermatocytes et 3) la spermiogenèse qui correspond à la métamorphose des spermatides rondes issues de la méiose en spermatozoïdes.

2.6.1 Les divisions mitotiques des spermatogonies

Les spermatogonies ou cellules souches, sont présentes à la base de l'épithélium séminifère. Avant la puberté, les spermatogonies se multiplient par mitose presque sans arrêt. Au moment de la puberté, la spermatogenèse commence, et chaque division mitotique donne naissance à deux cellules filles différentes. La spermatogonie A reste près de la base du tubule séminifère pour perpétuer la lignée des cellules germinales. La spermatogonie B est poussée vers la lumière du tubule, où elle se transforme en un spermatocyte de premier ordre qui va migrer en traversant la barrière hémato-testiculaire.

2.6.2 La division méiotique des spermatocytes

La méiose est la succession de deux divisions cellulaires qui conduit à la formation de quatre cellules haploïdes pour une cellule diploïde entrant en méiose. La première division méiotique est caractérisée par la longueur de sa prophase. Les spermatocytes I passent au stade leptotène ou premier stade de la prophase de la première division méiotique. Ce stade est suivi du stade zygotène puis du stade pachytène dont la durée est particulièrement longue par rapport aux autres stades. Au cours de ce stade le volume du noyau et du cytoplasme de la cellule augmente considérablement. Après le stade pachytène, le stade diplotène et diacinèse suivent en succession rapide. Les spermatocytes de deuxième ordre formés au cours de la première division méiotique subissent rapidement la seconde division de la méiose et donnent naissance à des petites cellules rondes au gros noyau sphérique qu'on appelle spermatides rondes situées près de la lumière du tubule.

2.6.3 La spermiogenèse

La spermiogenèse est un processus complexe par lequel les spermatides rondes se transforment en spermatides allongées ou matures. Ce processus comprend le développement, à partir de l'appareil de Golgi, de l'acrosome qui contient des enzymes protéolytiques nécessaires au spermatozoïde lors de son interaction avec l'ovule, la formation de la pièce intermédiaire du spermatozoïde à partir des mitochondries enroulées en spirales serrées et la formation du flagelle, qui permet la mobilité. Le cytoplasme qui jusqu'à maintenant formait une gouttelette le long du flagelle se détache de la spermatide allongée et forme le corps résiduel qui sera phagocyté par la cellule de Sertoli (Lacy, 1962 ; Russell, 1980). A la fin de la spermiogenèse, les spermatides allongées sont libérées dans la lumière du tubule séminifère.

Il faut noter que dans les tubules séminifères, les cellules germinales ne sont pas distribuées au hasard, mais elles sont plutôt organisées de façon rigoureuse en associations cellulaires distinctes. Chaque type d'association définit un stage du cycle de l'épithélium séminifère. Ces associations cellulaires sont de compositions constantes et peuvent être identifiées selon les caractéristiques cytologiques des jeunes spermatides (Leblond et Clermont, 1952). Le nombre des stages du cycle varie selon les espèces et il est constant pour une espèce donnée, ainsi 12 stages du cycle ont été décrits chez le cobaye (Clermont, 1960) et chez le vison (Pelletier, 1986). Chaque stage est associé à plusieurs événements morphologiques et biochimiques importants de la spermatogenèse. Ainsi, le stage VIII est le stage où les spermatides matures sont libérées dans la lumière tubulaire chez le cobaye (Clermont, 1960) et chez le vison (Pelletier, 1986).

3. JUSTIFICATION DES MODÈLES ANIMAUX UTILISÉS DANS L'ÉTUDE

Dans cette étude, nous avons utilisé deux espèces animales différentes au point de vue de leur reproduction, le cobaye, animal à reproduction continue et le vison, animal à reproduction saisonnière. En plus nous avons examiné les spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés de bœuf.

3.1 LE COBAYE

L'objectif de cette étude de la HSL dans le testicule était de déterminer s'il y avait variation de l'expression de la protéine de la HSL et de l'activité de cette enzyme en fonction de l'activité spermatogénétique. Afin d'étudier l'effet de l'apparition des cellules germinales lors du développement testiculaire sur la HSL, nous avons utilisé un animal à reproduction continue : le cobaye (*Cavia porcellus*). L'épithélium séminifère de cette espèce animale n'est pas différent de celui des autres espèces de mammifères (Clermont, 1960). Dans le tissu interstitiel, les gouttelettes lipidiques, qui sont caractéristiques de l'espèce, sont très abondantes chez le cobaye, la souris et l'homme et rares chez le rat adulte (Christensen, 1975). Le rat n'est pas un bon modèle animal pour l'étude des rôles des lipides dans la reproduction ; par contre le cobaye a été largement utilisé par plusieurs laboratoires, pour l'étude de la reproduction et en particulier par notre laboratoire (Clermont, 1960; Pelletier et Friend, 1983a; Pelletier et Friend, 1983b; Pelletier et Vitale, 1994; Pelletier, 1995b; Pelletier et coll., 1997). Les 12 stages du cycle de l'épithélium séminifère chez cet animal ont été décrits depuis 1960 (Clermont, 1960). Chez cette espèce, la spermatogenèse commence à environ 11 jours après la naissance et

elle est complète à 42-45 jours après la naissance (Noller et coll., 1977). La durée totale de cycle spermatogénétique chez le cobaye est de 8,45 jours (Noller et coll., 1977).

3.2 LE VISON

Le vison (*Mustela vison*) est aussi un modèle animal pour l'étude de la reproduction qui a été, largement utilisé par notre laboratoire (Pelletier, 1986; Pelletier et Shivers, 1986; Pelletier, 1988; Pelletier, 1994; Pelletier et Vitale, 1994; Pelletier, 1995a; Pelletier, 1995b). Le vison se caractérise par un cycle de reproduction annuel et présente une régression testiculaire saisonnière durant laquelle il y a disparition progressive des spermatides et des spermatocytes. C'est pour cette raison, que nous avons choisi cet animal, afin d'établir si la disparition des cellules germinales (qui est un phénomène inverse du développement) était accompagnée de modification du métabolisme du cholestérol testiculaire. Notre laboratoire a défini la méthode pour l'identification des 12 stages du cycle de l'épithélium séminifère chez cette espèce, ainsi que le calendrier des populations des cellules germinales présentes dans les tubules à chaque mois du cycle reproductif annuel (Pelletier, 1986). Chez le vison, la naissance se produit en général au début du mois de mai, la période néonatale dure environ 90 jours. La puberté commence vers 91 jours et prend fin à environ 252-254 jours. A ce moment là, il y a apparition des spermatozoïdes dans l'épididyme. Au cours d'une année, le vison adulte passe par une phase active de la spermatogenèse d'une durée de huit mois qui commence par la division des spermatogonies au mois d'août et se termine à la fin du mois de mars et par une phase inactive de la spermatogenèse, où il y a une régression testiculaire d'une durée de quatre mois, allant du mois d'avril à fin juillet (Pelletier, 1986). Le vison adulte produit les spermatozoïdes à partir de fin janvier jusqu'à fin mars (Pelletier, 1986).

3.3 LE BŒUF

Nous avons voulu analyser la présence de la HSL dans les spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés. Comme nous ne pouvons pas provoquer l'éjaculation chez le cobaye ni chez le vison, nous avons utilisé les spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés de bœuf (*Bos taurus*).

4. ÉTUDE DE LA HSL

4.1 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE DU PRÉSENT TRAVAIL

Les tubules séminifères du testicule sont le lieu de formation de millions de cellules germinales dont les membranes cellulaires contiennent du cholestérol. Pourtant le métabolisme du cholestérol a été très peu étudié dans les tubules contrairement au tissu interstitiel du testicule. Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années au métabolisme du cholestérol dans les tubules séminifères. On s'est demandé comment les tubules séminifères parvenaient à satisfaire leur grand besoin en cholestérol nécessaire à la production cyclique de spermatozoïdes. Les travaux antérieurs de notre laboratoire ont montré la localisation ultrastructurale du cholestérol dans les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et les cellules germinales (Pelletier et Vitale, 1994). Ils ont mis en évidence la présence dans les tubules de deux pools du cholestérol : le cholestérol libre dans les membranes cellulaires et le cholestérol estérifié dans les gouttelettes lipidiques. Ces gouttelettes lipidiques étaient présentes aussi bien dans les cellules de Sertoli, les cellules germinales, les cellules de Leydig et toutes les autres cellules testiculaires (Pelletier et Vitale, 1994).

Le pool de cholestérol estérifié représente une réserve pour la cellule et peut être réutilisé après l'hydrolyse par la HSL. Par ailleurs la cellule de Sertoli en culture a la capacité de synthétiser du cholestérol à partir de l'acétate (Wiebe et Tilbe, 1979) dont l'enzyme limitante de cette voie est l'HMG-CoA réductase. L'excès du cholestérol libre dans la cellule est estérifié par l'ACAT. Il faut noter que malgré le départ cyclique de millions de spermatozoïdes, le taux du cholestérol libre dans le testicule reste relativement constant, ce qui suggère l'existence de facteurs qui assureraient

l'homéostasie du cholestérol dans les tubules et suggérerait un rôle régulateur de la HSL, de l'ACAT et de l'HMG-CoA réductase dans ce processus. La HSL est une enzyme indispensable à la spermatogenèse, puisque les souris $HSL^{-/-}$ mâles sont stériles sans que leur stéroïdogénèse soit affectée et les rares spermatozoïdes qui sont présents chez ces souris ne sont ni matures ni mobiles, et leur cellules de Sertoli accumulent de grande quantité de cholestérol estérifié (Osuga et coll., 2000).

Les études antérieures sur la HSL dans le testicule ont été faites sur le testicule entier sans distinction entre les tubules séminifères et le tissu interstitiel (Holm et coll., 1987; Kraemer et coll., 1991; Kraemer et coll., 1993a; Stenson Holst et coll., 1996) bien que l'origine et le rôle du cholestérol soient différents dans ces deux compartiments : le cholestérol est utilisé pour la production des spermatozoïdes par les tubules et de la testostérone par les cellules de Leydig. Pour ces raisons, nous avons séparé, dans la présente étude, les tubules séminifères du tissu interstitiel par digestion enzymatique douce pour obtenir des préparations enrichies en tubules séminifères (STf) et en tissu interstitiel (ITf). Notre hypothèse est que la HSL régule le rapport CL/CE différemment dans les deux compartiments testiculaires. Si notre hypothèse s'avère vraie, la régulation du rapport CL/CE serait en relation avec les événements particuliers qui se produisent dans chaque compartiment testiculaire durant le développement testiculaire : la méiose durant la puberté et le pic de la testostérone qui se produit chez l'adulte. Chez le vison adulte durant la régression testiculaire, la régulation du rapport CL/CE dans chacun des deux compartiments testiculaires serait en relation avec la disparition des cellules germinales. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré les variations du taux et de l'activité de la HSL dans les STf et dans les ITf au cours de l'apparition des cellules germinales qui se produit durant le développement testiculaire chez le cobaye et chez le vison et aussi chez le vison adulte au cours de la disparition progressive des cellules germinales qui se produit durant la régression testiculaire saisonnière.

Puisque les changements testiculaires au cours du développement et au cours du cycle reproductif annuel du vison sont accompagnés par des variations des concentrations sériques de la testostérone et des hormones hypophysaires qui agissent sur les cellules testiculaires (LH, FSH et PRL) et comme la HSL est une enzyme sensible aux hormones, nous avons comparé la variation du taux et de l'activité de la HSL dans chaque compartiment testiculaire, avec les taux sériques de ces hormones. L'utilisation de vison comme modèle animal permet la distinction entre les facteurs qui régulent le métabolisme du cholestérol testiculaire durant le développement testiculaire de ceux qui agissent durant le cycle reproductif annuel dans le testicule de l'adulte.

4.2 RÉSULTATS

4.2.1 Résumé des résultats obtenus dans les deux articles inclus dans cette thèse

4.2.1.1 Expression de la protéine et activité de la HSL dans les STf et les ITf.

Nous avons étudié les variations du taux de la protéine et l'activité de la HSL dans les STf et les ITf durant le développement testiculaire chez le cobaye et chez le vison et aussi au cours de la régression testiculaire saisonnière chez le vison. Pour cela, nous avons utilisé le cobaye de 6, 11, 21 jours après la naissance et le cobaye adulte (de plus de 54 jours). Nous avons utilisé le vison durant la puberté (150 et 200 jours après la naissance) et le vison adulte durant la phase active de la spermatogenèse et plus précisément durant la période de production des spermatozoïdes (en février et mars) et durant la régression testiculaire saisonnière (en avril, mai, juin), ainsi qu'au mois d'août, qui marque le début du cycle reproductif suivant. Nous avons aussi analysé la présence de la protéine de la HSL et dosé l'activité de l'enzyme dans les spermatozoïdes épидидymaires (Spz ép) des deux espèces.

Chez le cobaye, nous avons détecté une bande de 104-kDa de la HSL dans les STf et les ITf. La masse moléculaire de cette protéine était légèrement plus élevée que celle du tissu adipeux de cobaye, utilisé comme contrôle positif, et qui était de 90-kDa. L'intensité de la bande de 104-kDa augmentait durant le développement testiculaire dans les ITf et les STf. Nous avons détecté deux autres bandes de 110- et 120-kDa, mais ce uniquement dans les STf de l'adulte. Nous n'avons détecté ces deux bandes ni dans les STf de 6, 11 et 21 jours, ni dans les ITf. Dans les spermatozoïdes de cobaye, nous avons détecté deux bandes de 104- et 120-kDa quand nous avons surexposé la membrane de nitrocellulose (article 1, figure 2).

Afin d'analyser la distribution subcellulaire de la HSL, nous avons réalisé un fractionnement des composants cellulaires des STf du cobaye adulte. Nous avons séparé les différentes fractions cellulaires en noyau, mitochondries, lysosomes, réticulum endoplasmique lisse (sER) et rugueux et le cytosol. Dans la fraction du cytosol et des lysosomes, nous avons détecté une bande de 104-kDa de la HSL. Les bandes de 110- et 120-kDa détectées dans le STf de l'adulte furent détectées uniquement dans la fraction lysosomiale. À part des traces de la HSL de MM de 104-kDa trouvées dans le sER, nous n'avons détecté aucune bande dans les autres fractions (article 1, figure 5).

Nous avons déterminé que la HSL était active dans les STf et les ITf à tous les âges étudiés. Cette activité augmentait durant le développement testiculaire. L'activité de la HSL était plus élevée dans les ITf que dans les STf durant tous les âges étudiés. Nous avons établi que la HSL était active aussi dans les Spz ép de cobaye (article 1, figure 3). L'activité de la HSL augmentait d'une façon parallèle au taux de l'isoforme de 104-kDa de la HSL à tous les âges étudiés à l'exception des STf de l'adulte où le taux de la protéine de 104-kDa de la HSL était plus grand que son activité. Cette augmentation était plus importante lorsque nous avons considéré les trois bandes de 104-, 110- et 120-kDa dans les STf de l'adulte (article 1, figure 4).

Chez le vison, nous avons détecté une bande de 104-kDa dans les STf et les ITf à tous les âges étudiés. La masse moléculaire de cette bande était plus élevée que celle détectée dans le tissu adipeux de vison qui était de 90-kDa. L'intensité de la bande de 104-kDa augmentait durant le développement testiculaire mais elle diminuait durant la régression testiculaire dans les STf et les ITf (article 2, figures 2 et 3). Nous avons détecté une autre bande de 108-kDa à tous les âges dans les STf mais son intensité était plus faible au mois de février et mars par rapport aux autres âges étudiés. Dans les ITf, nous avons détecté la bande de 108-kDa durant le développement et la régression testiculaires (article 2, figures 2 et 3). La vimentine est une protéine du cytosquelette qui n'est pas exprimée par les cellules germinales. Dans les STf, la vimentine présentait un

profil similaire à celui de la bande de 108-kDa de la HSL durant le développement et durant tout le cycle reproductif annuel (article 2, figure 2).

Chez le vison, la HSL était active dans les STf et les ITf à tous les âges étudiés. L'activité de la HSL était significativement plus élevée dans les ITf que dans les STf pendant le développement et aux mois de février et mars. La HSL était plus active durant la phase active de la spermatogenèse que durant la régression testiculaire dans les STf et les ITf (article 2, figure 3). La HSL était aussi active dans les Spz ép.

4.2.1.2 Variation du rapport cholestérol libre (CL)/cholestérol estérifié (CE) et des triglycérides (TG) dans les STf et les ITf

La HSL agit sur le cholestérol et sur les triglycérides selon le tissu où elle se trouve (Cook et coll., 1982). Afin de déterminer si la HSL testiculaire hydrolysait préférentiellement le cholestérol estérifié ou les triglycérides, nous avons déterminé les concentrations du CL, du CE et des TG dans les STf et les ITf de cobaye et de vison à tous les âges étudiés. Nous avons ensuite comparé le rapport CL/CE et la concentration des TG à l'activité de la HSL déterminée dans les mêmes échantillons.

Chez le cobaye, le rapport CL/CE augmentait durant le développement testiculaire dans les STf et les ITf et atteignait une valeur maximale chez l'adulte. Le rapport CL/CE corrélait avec l'activité de la HSL dans les STf ($r = 0,80$; $P < 0,01$; $n = 10$) et dans les ITf ($r = 0,71$; $P < 0,05$; $n = 10$). Les TG ne variaient pas significativement durant le développement et il n'y avait pas de corrélation entre les TG et l'activité de la HSL dans les STf ($r = -0,27$) et les ITf ($r = -0,34$).

Chez le vison, le rapport CL/CE augmentait durant le développement testiculaire dans les STf et les ITf et atteignait une valeur maximale en février dans les STf et en mars dans les ITf. Ce rapport diminuait durant la régression testiculaire. La variation du

rapport CL/CE suivait celle de l'activité de la HSL dans les STf et les ITf (article 2, figure 4). Le rapport CL/CE corrélait avec l'activité de la HSL dans les STf ($r = 0,85$; $P < 0,001$; $n = 22$). Il n'y avait pas de corrélation entre le taux des TG et l'activité de la HSL dans les STf et les ITf (article 2, figure 5).

4.2.1.3 Variation des hormones

Comme son nom l'indique, la HSL est sensible aux hormones, nous avons comparé le taux de la protéine et l'activité de la HSL dans les STf et les ITf avec les concentrations sériques de la LH, la FSH, la PRL et la testostérone. Nous avons déterminé la concentration de la testostérone plasmatique dans le sérum de cobaye et de vison à tous les âges étudiés (article 1, figure 8 et article 2, figure 10). En plus, nous avons dosé la LH, la FSH et la PRL dans le sérum de vison à tous les âges étudiés (article 2, figure 10).

Chez le cobaye, le taux sérique de la testostérone augmentait significativement chez l'adulte par rapport à la puberté. Le taux sérique de la testostérone corrélait avec l'activité de la HSL dans les ITf ($r = 0,91$; $P < 0,001$; $n = 12$) et dans les STf ($r = 0,60$; $P < 0,05$; $n = 12$). La concentration de la testostérone corrélait aussi avec le taux de la protéine de la HSL dans les ITf ($r = 0,89$; $P < 0,001$; $n = 12$) et dans les STf ($r = 0,97$; $P < 0,001$; $n = 12$).

Chez le vison, le taux sérique de la LH était plus élevé au début de la puberté puis diminuait par la suite. Chez l'adulte, le taux sérique de la LH était élevé durant la phase active de la spermatogenèse et diminuait au début du cycle reproductif annuel suivant (article 2, figure 10). Chez le vison adulte durant le cycle reproductif annuel, le taux sérique de la FSH, était élevé durant la phase active de la spermatogenèse et durant la première moitié de la régression testiculaire, mais il diminuait durant la deuxième

moitié de la régression testiculaire. Le taux sérique de la PRL était faible durant la puberté. Chez l'adulte, le taux sérique de la PRL était faible durant la phase active de la spermatogenèse mais augmentait significativement durant la première moitié de la régression testiculaire puis diminuait fortement durant la deuxième moitié de la régression testiculaire. Durant le cycle reproductif annuel de l'adulte, le taux de la testostérone était élevé durant la phase active de la spermatogenèse et diminuait fortement durant le reste du cycle reproductif annuel.

4.2.1.4 Immunohistochimie de la HSL dans des coupes de testicule et dans les canaux excréteurs

Nous avons réalisé l'immunohistochimie de la HSL sur des coupes de testicules de cobaye et de vison durant le développement testiculaire et chez le vison durant la phase active de la spermatogenèse et pendant la régression testiculaire. Nous avons réalisé aussi l'immunohistochimie de la HSL dans les canaux excréteurs (tubules droits, rete testis, épидидyme) de cobaye.

Chez le cobaye, les résultats ont montré que la HSL était présente dans la cellule de Sertoli avant et après la puberté. Dans la cellule de Sertoli de l'adulte, la distribution de la HSL variait avec les stages du cycle. La HSL s'accumulait à la base de la cellule de Sertoli après la libération des spermatides matures. La HSL était présente dans les spermatides matures. Dans le tissu interstitiel, la HSL était détectée dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (article 1, figure 9).

Dans les canaux excréteurs, le marquage était plus fort dans les cellules des tubules droits et dans le rete testis et moins intense dans l'épididyme (article 1, figure 10).

Chez le vison, nous avons détecté la HSL dans la cellule de Sertoli durant la puberté. Chez l'adulte, le marquage était présent dans la cellule de Sertoli à tous les stades du cycle de l'épithélium séminifère. Cependant, la distribution était variable selon les stades du cycle ; la HSL était accumulée à la base de la cellule de Sertoli dans les stades qui suivaient la libération des spermatides matures. Dans les cellules germinales, le marquage était présent dans les spermatides allongées. Par immunofluorescence, nous avons montré la présence de la HSL dans les macrophages de vison (article 2, figure 7). La HSL que nous avons détecté dans le tissu interstitiel (article 2, figure 6) était due à sa présence dans les macrophages et dans l'endothélium des vaisseaux sanguins. La HSL était présente dans la cellule de Sertoli durant la régression testiculaire en avril, juin et au début du cycle reproductif suivant en août (article 2, figure 8).

4.2.1.5 Immunofluorescence de la HSL dans les Spz ép

L'immunofluorescence de la HSL dans les Spz ép de cobaye (article 1, figure 11) et de vison (article 2, figure 9) a montré que la HSL était localisée au niveau du segment équatorial de la tête du spermatozoïde.

4.2.1.6 Comparaison de l'activité de la HSL dosée à 34 et à 37°C

Normalement, les testicules des mammifères descendent dans le scrotum, s'ils restent dans l'abdomen (cryptorchidie), ils sont soumis à une température plus élevée que dans le scrotum, ce qui entraîne la stérilité. Des études ont rapporté que la cryptorchidie modifiait le rapport CL/CE (Johnson, 1970) et qu'elle diminuait l'activité de la HSL (Hoffmann et coll., 1989). Nous avons voulu vérifier s'il existait une différence entre l'activité de la HSL à 34°C (température scrotale) et à 37°C (température corporelle). Nous avons testé cette possibilité dans les STf et les ITf du

cobaye (article 1, figure 3) et du vison (résultats non publiés) aux différents âges étudiés. Les résultats n'ont montré aucune différence significative entre l'activité de la HSL dosée à 34 et celle dosée à 37°C dans les deux espèces.

4.2.2 Article 1

Expression, Activity, and Subcellular Localization of Testicular Hormone-Sensitive Lipase During Postnatal Development in the Guinea Pig

Ouafae Kabbaj, Cecilia Holm, María L. Vitale and R.-Marc Pelletier, *Biol of
Reprod* 65 : 601-612 ; 2001.

Contribution des auteurs

Ouafae Kabbaj :

- J'ai isolé les STf des ITf.
- J'ai réalisé le fractionnement subcellulaire et j'ai mis au point les techniques biochimiques pour analyser les fractions obtenues.
- J'ai effectué les électrophorèses et les immuno-buvardages.
- J'ai mis au point la technique pour le dosage de la HSL.
- J'ai réalisé l'immunohistochimie.
- J'ai séparé le CL et le CE par chromatographie sur couche mince (TLC) et j'ai déterminé la concentration du CL et du CE par chromatographie en phase gazeuse (GLC).
- J'ai déterminé la concentration des TG dans les STf et les ITf par méthode colorimétrique.
- J'ai déterminé la concentration de la testostérone sérique par la méthode ELISA.
- J'ai participé aux analyses statistiques.
- J'ai participé à la rédaction de l'article.

Cecilia Holm a fourni les anticorps anti-HSL et elle a lu cet article.

María L. Vitale a contribué à l'élaboration des photos de microscopie de fluorescence des spermatozoïdes et elle a contribué à l'interprétation des résultats et à la rédaction de l'article.

R.-Marc Pelletier a isolé les testicules et les spermatozoïdes épидидymaires du cobaye et il a préparé les tissus pour l'immunohistochimie. Il a analysé au microscope les résultats de l'immunohistochimie et de l'immunofluorescence et il a contribué principalement à la rédaction de l'article.

Expression, Activity, and Subcellular Localization of Testicular Hormone-Sensitive Lipase During Postnatal Development in the Guinea Pig¹

Ouafae Kabbaj,³ Cecilia Holm,⁴ María L. Vitale,³ and R.-Marc Pelletier^{2,3}

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire,³ Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

Department of Cell and Molecular Biology,⁴ Lund University, Lund S-223 62, Sweden

ABSTRACT

The present work reports on testicular hormone-sensitive lipase (HSL), the biological significance of which has been documented in male fertility. The HSL protein levels and enzymatic activity were measured, respectively, by densitometry of immunoreactive bands in Western blots, performed with antibodies against recombinant rat HSL, and by spectrophotometry in seminiferous tubules (STf) and interstitial tissue (ITf) enriched fractions generated from neonatal, pubertal, and adult guinea pig testes. In addition, HSL was studied in subcellular fractions obtained from STf isolated from adult testes and in epididymal spermatozoa (Spz). A 104-kDa HSL protein was detected in STf and ITf, the expression and activity of which increased with testicular development. Three immunoreactive bands of 104, 110, and 120 kDa were detected in the lysosomal subfraction, and two bands of 104 and 120 kDa were detected in Spz. The HSL activity was positively correlated with free (FC) and esterified (EC) cholesterol ratios in STf and ITf, but not with triglyceride (TG) levels, during testicular development. Immunolabeling localized HSL to elongated spermatids and Sertoli cells, where its distribution was stage-dependent, and within the cells lining the excurrent ducts of the testis. The findings of the 104- and 120-kDa HSL immunoreactive bands and of HSL activity in Spz as well, as the detection of the 104-, 110-, and 120-kDa immunoreactive bands in lysosomes, suggest that part of HSL may originate from germ cells and be imported in Sertoli cells. The HSL protein levels and enzymatic activity in ITf and STf were positively correlated with serum testosterone levels during development. To the best of our knowledge, this study is the first to contribute insights regarding the impact of HSL on FC:EC cholesterol ratios and TG levels in the interstitial tissue and tubules in relation to serum testosterone levels during postnatal development, and regarding the immunolocalization of the enzyme in regions of the male gamete consistent with spermatozoa-oocyte interaction.

male reproductive tract, Sertoli cells, spermatogenesis, testis

INTRODUCTION

Three main enzymes are implicated in the regulation of intracellular cholesterol metabolism. First, hormone-sensitive lipase (HSL) hydrolyzes esterified cholesterol (EC) and

provides free cholesterol (FC) [1]. Second, acyl-coenzyme A:cholesterol acyl transferase is implicated in the esterification of cholesterol when the latter is present at concentrations exceeding metabolic demands [2]. Third, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase is the rate-limiting enzyme of the biosynthetic pathway of cholesterol [3].

The present study is focused on testicular HSL because of the manifest importance of the enzyme in male fertility. The HSL knockout mice (HSL^{-/-}) have been generated to elucidate the role initially attributed to HSL in the development of obesity. However, these studies showed that HSL knockout male mice were sterile rather than obese, suggesting a key role of the enzyme in the testis [4]. A significant rise in cholesterol ester levels concomitantly with the absence of cholesterol esterase activity was reported in HSL^{-/-} mouse testis [4]. These studies attest to the utmost biological significance of the enzyme in the maintenance of adequate cholesterol content in testicular cells.

The HSL is an intracellular enzyme, with an optimum pH of 7, that hydrolyzes cholesterol esters and triacylglycerol depending on its tissue location [5]. Several studies have shown that cholesterol ester hydrolase and HSL are identical proteins [1, 5–10]. Inhibition of cholesterol ester hydrolase causes an increase in the EC concentration of whole-mouse testis extracts and a decrease in the testosterone concentration of peripheral plasma [11]. The activity of HSL is regulated by reversible protein phosphorylation mediated by hormonal activation of the cAMP-dependent protein kinase [1]. The phosphorylated HSL is the active form [1].

Contribution of exogenous cholesterol to the seminiferous tubules requires the participation of factors, either enzymatic or of another nature, to regulate the concentration of the compound to levels that are consistent with the production of viable and fertile male gametes in the tubules. Little information is available regarding the origin, hydrolysis, esterification, synthesis, storage, mobilization, and transport of cholesterol within the tubules, despite the report that important amounts of cholesterol reside within the tubules themselves [12]. To correct this shortage of information, the present study emphasized the physiological significance of HSL-induced hydrolysis of cholesterol inside the tubules. Because previous studies of testicular HSL [10, 13–16] have generally been carried out using whole-testis extracts, those studies provided little information regarding the respective participation of each of the two cellular compartments of the testis. We hypothesize that HSL regulates FC:EC ratios distinctly in the interstitial space and in the neighboring tubules. If the hypothesis is correct, this should allow us to correlate HSL-induced changes in FC:EC ratios with a physiological event typical either of the interstitial tissue or of the tubules and with a particular phase of post-

¹Supported in part by NSERC grant OGP0041653 to R.M.P. and by NSERC grant OGP0194652 to M.L.V.; M.L.V. is also funded by a scholarship from Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

²Correspondence: R.-Marc Pelletier, Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard-Montpetit, Montréal, QC, Canada H3T 1J4. FAX: 514 485 7932;

Received: 14 December 2000.

First decision: 31 January 2001.

Accepted: 5 April 2001.

© 2001 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

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

natal development, namely, a peak in serum testosterone levels in the adult and meiosis during puberty. Here, for the first time, HSL expression and activity were measured in interstitial tissue enriched fractions (ITf) and seminiferous tubule enriched fractions (STf) generated from extracts of whole testes harvested during the neonatal period, puberty, and adulthood. The sublocalization of the enzyme was achieved for the first time using subcellular fractions generated from STf obtained from adult testes. To the best of our knowledge, the present study is the first to contribute insights regarding the impact of HSL on FC:EC ratios and triglyceride (TG) levels in the interstitial tissue and tubules in relation with serum testosterone levels during postnatal development, and regarding immunolocalization of the enzyme in regions of the male gamete consistent with spermatozoa-oocyte interaction.

MATERIALS AND METHODS

Animals

We used testes obtained from 6-day-old neonatal, 11- and 21-day-old pubertal, and adult guinea pigs aged more than 54 days. All guinea pigs were from the Hartley strain and were purchased from Charles River (St-Constant, PQ, Canada). Five animals were used per age group. Animals were anesthetized by i.p. injection of 0.9 ml/kg body weight of sodium phenobarbital (Somnotol; MCI Pharmaceutical, Mississauga, ON, Canada). The protocol was approved by the Université de Montréal Animal Care Committee.

Source of Chemicals

Acetonitrile, BSA, dithioerythritol, glucose-6-phosphate, metrizamide, imidazole, *p*-iodonitrotetrazolium violet (INT), *p*-nitrocatechol, nitrocatechol sulfate, *p*-nitrophenylbutyrate (PNPB), PMSF, sodium succinate, sucrose, soybean trypsin inhibitor, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-rabbit IgG, 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octane (DABCO), and the TG kit were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Antipain, aprotinin, collagenase D, Western blot development kit Lumi-light^{plus}, leupeptin, and pepstatin were obtained from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada). Minimum essential medium (MEM) was from Gibco BRL (Burlington, ON, Canada). The testosterone ELISA kit was purchased from American Laboratory Products Co., Ltd. (Windham, NH). Biotinylated anti-rabbit IgG and horse radish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin were purchased from Amersham Bio/Can Scientific (Mississauga, ON, Canada).

Source of HSL Antibodies

Antibodies against homogenous recombinant rat HSL were generated in rabbits [17]. Rabbit antiserum was affinity-purified against the recombinant rat HSL coupled to a cyanogen bromide (CNBr)-activated Sepharose 4B column (Amersham Pharmacia Biotech, Solna, Sweden). The affinity-purified antibodies were specific for HSL and did not cross-react with other proteins on Western blot analyses of tissue extracts.

Controls

The specificity of HSL antibody was tested using guinea pig adipose tissue obtained from the anterior abdominal wall as a positive control. For negative controls, preimmune serum as well as the primary or secondary antibody alone were used. The HSL antibody was also preadsorbed with rat adipose tissue to ascertain that the HSL immunoreactivity detected in guinea pig tissues corresponded to HSL.

Isolation of STf and ITf

Freshly decapsulated testes were incubated with 0.25 mg/ml of collagenase D and 0.1 mg/ml of soybean trypsin inhibitor in MEM in a water-shaker bath set at 80 cycles/min and 37°C. The reaction was stopped by addition of an equal volume of MEM. The seminiferous tubules were allowed to settle by gravity, whereas interstitial cells occupied the supernatant. Further separation was achieved by centrifugation at 600 rpm in a GS-6R Beckman centrifuge equipped with a GH 3.8 rotor (Beckman, Mississauga, ON, Canada) for 20 min. The STf and ITf obtained were washed

twice in PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 1.5 mM KH₂PO₄ [pH 7.4]) and homogenized on ice with a glass tissue grinder in PBS containing 2 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 µg/ml of leupeptin, and 2 µg/ml of aprotinin. The purity of the tubule and interstitial cell fractions was evaluated by light microscopy.

Subcellular Fractionation

The STf isolated from three adult guinea pig testes were pooled and submitted to a multistep centrifugation protocol as described initially by De Duve et al. [18] and Wattiaux et al. [19]. The STf were homogenized in three volumes of sucrose buffer (0.25 M sucrose, 4 mM imidazol [pH 7.4], and 1 mM PMSF) with a glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 700 × *g* for 10 min using a GS-6R Beckman centrifuge equipped with GH 3.8 rotor. The supernatant was saved, and the pellet was then resuspended and recentrifuged as described above. The process was repeated a third time, and the three supernatants were pooled. The resulting pellet contained the nuclear subfraction. The pooled supernatants were centrifuged at 3000 × *g* for 10 min, and the resulting pellet constituted the heavy mitochondrial subfraction. The supernatant was centrifuged at 82 000 × *g* for 7 min to pellet the light mitochondrial subfraction (IM). The supernatant of this last centrifugation was then centrifuged at 110 000 × *g* for 1 h to pellet the microsomal subfraction (Mc), and the supernatant constituted the cytosolic subfraction. The IM and Mc subfractions were obtained using a Beckman ultracentrifuge XL-70 (Beckman, Palo Alto, CA) equipped with a fixed rotor (type 50 Ti). The IM was resuspended in 30% metrizamide and placed in the bottom of a discontinuous gradient made of 26%, 24%, and 19% (w/v) metrizamide and then centrifuged at 95 000 × *g* for 2 h. Lysosomes were recovered in 19%–24% (w/v) interface [20] and resuspended in an equal volume of sucrose buffer. In addition, the Mc was used for separation of the Golgi apparatus, smooth endoplasmic reticulum (sER), and rough endoplasmic reticulum (rER) subfractions using the method described by Bergeron et al. [21] and Paiement et al. [22]. The Mc was suspended in sucrose to give a final concentration of 1.38 M sucrose; placed under a step-gradient of 1.0, 0.86, and 0.25 M sucrose; and centrifuged at 300 000 × *g* for 1 h. The Golgi subfraction was recovered from 0.25 to 0.86 and 0.86 to 1.0 M interfaces. The residual load-zone fraction contained the sER and the residual pellet the rER. The lysosomes, Golgi apparatus, sER, and rER were obtained using a Beckman ultracentrifuge XL-70 equipped with a SW60 rotor.

Biochemical Characterization of Subcellular Fractions

For biochemical characterization of enriched subfractions, the activities of the following specific enzymes were measured in each different subcellular fraction: arylsulfatase and acid phosphatase (lysosomes), succinate dehydrogenase (mitochondria), and glucose-6-phosphatase (microsomes). For arylsulfatase determination, samples of different subcellular fractions were solubilized in 1% Triton X-100 and incubated with 10 mM of the inorganic substrate *p*-nitrocatechol sulfate for 30 min at 37°C. Arylsulfatase activity was measured by determining the absorbance of the sample at 515 nm and comparison with a nitrocatechol standard curve [20, 23]. Acid phosphatase was assayed as described by Graham [24]. Samples of different subfractions were incubated with *p*-nitrophenyl phosphate as substrate. The reaction was stopped by addition of 0.25 M NaOH. Released phosphate was measured according to the method described by Ames and Dubin [25] using inorganic phosphate as standard. Succinate dehydrogenase was assayed as described by Davis and Bloom [26] and by Graham [24]. Samples of different subcellular fractions were incubated for 10 min at 37°C with sodium succinate as substrate and INT as an artificial electron acceptor. The reaction was stopped by adding ethyl acetate:ethanol:trichloroacetic acid (TCA) (5:5:1, v:v:w). Glucose-6-phosphatase was measured as described by Graham [24]. Samples were incubated with 0.1 M glucose-6-phosphate as substrate for 30 min at 37°C, and the reaction was stopped by addition of ice-cold, 8% (w:v) TCA. Released phosphate was assayed as described above for measurement of acid phosphatase activity.

Epididymal Spermatozoa

Epididymal spermatozoa were flushed from the cauda or tail of epididymides from adult guinea pigs by perfusion of cold PBS. Spermatozoa were washed twice in PBS and recovered by centrifugation at 1000 rpm for 4 min (GS-6R Beckman centrifuge). Spermatozoa were resuspended in 10 mM Tris-HCl (pH 8) containing 1 mM EDTA for 5 min to lyse contaminating epithelial and blood cells [27]. For Western blot analyses, spermatozoa were diluted 1:1 v:v in cold PBS containing 2 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 µg/ml of leupeptin, and 2 µg/ml of aprotinin and then

sonicated while in ice using a sonic dismembrator (model 300; Fisher, Farmington, NY) at maximal setting during three consecutive intervals of 30 sec each. For immunofluorescence studies, spermatozoa were treated with diluted 1:5 v:v in PBS and processed as described below.

Protein Determination

Proteins in the samples were measured according to the method described by Bradford [28] using a Bio-Rad reagent (Bio-Rad, ON, Canada) and BSA as the standard.

Electrophoresis and Western Blots

Proteins in the homogenates were denatured in a buffer containing 8 mM urea, 3% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 7 mM Tris-HCl (pH 7.6), and 0.005% bromophenol blue, followed by heating at 100°C for 2 min. Between 20 and 30 μ g of total proteins were loaded on a 10% polyacrylamide minigel. Electrophoresis was conducted at 100 V for 2 h [29]. Proteins were then electrotransferred onto nitrocellulose membranes [30]. Samples obtained by subcellular fractionation were treated in the same manner. When adipose tissue was used as a positive control, only 5 μ g of total proteins were utilized, because HSL is very abundant in this tissue. Membranes were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline (TBS: 140 mM NaCl and 50 mM Tris-HCl [pH 7.4]) for 60 min at 37°C and then incubated with anti-HSL (1:150 dilution in 5% skim milk-TBS) for 2 h at 37°C. Membranes were thoroughly rinsed and incubated with an anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (1:2000 dilution in 5% skim milk in TBS) as previously described [29]. The membranes were incubated with enhanced chemiluminescence detection reagents before exposure to x-ray films.

Preparation of Tissues for Immunolocalization of HSL

Testes were first fixed by perfusion of 15 ml of PBS (pH 7.4) through the testicular artery, followed by 60 ml of Bouin fixative [31]. Then, tissues were further immersed in the same fixative mixture for 36–48 h at room temperature (RT) [29, 32, 33]. Tissues were dehydrated in ethanol and in xylene before paraffinization. Tissue sections were mounted on glass slides coated with 3-aminopropyltriethoxysilane and exposed to 0.6% hydrogen peroxide (H_2O_2) in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST) to inhibit potential endogenous peroxidase activity.

Immunolabeling

To block nonspecific binding, sections were first incubated for 1 h at RT with 0.5% skim milk in TBST and next incubated overnight at RT with anti-HSL antibodies (1:35 dilution) and then for 1 h with biotinylated anti-rabbit IgG (1:1000 dilution) followed by HRP-conjugated streptavidin (1:200 dilution). The sections were washed in TBST after each incubation and exposed to TBS containing 0.01% H_2O_2 and 0.05% diaminobenzidine tetrachloride (pH 7.7) for 10 min at RT [29, 33]. The sections were washed in water, counterstained with a 0.05% aqueous methylene blue, and mounted in Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). The recording of the stage-dependent distribution of HSL in adult guinea pigs were made using the identification method of the stages of the seminiferous epithelium cycle proposed by Clermont [34].

Immunofluorescence

The spermatozoa were seeded on poly-L-lysine-coated cover slips and air-dried. Spermatozoa were fixed with -20°C methanol for 10 min, dried, and washed twice in PBS before being incubated with 3% skim milk in PBS for 1 h at 37°C as described elsewhere [29] to prevent nonspecific binding. The cells were washed in PBS and incubated with a 1:6 dilution of anti-rat HSL prepared in 1% skim milk in PBS for 1 h at 37°C. The cover slips were washed with PBS, incubated with FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:400 dilution in 1% BSA) in PBS at 37°C for 1 h and washed. Controls included incubation of cell preparations with preimmune serum or with the secondary antibody alone. The cover slips were mounted in PBS:glycerol (1:1) containing 5% DABCO before being viewed with a Carl Zeiss (Thornwood, NY) fluorescence Axiophot. Pictures were taken with TMAX 400 ASA Kodak films (Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

HSL Activity

The HSL activity was assayed using PNPB as substrate [35]. The STF, ITf, and adipose tissue were homogenized on ice in 0.25 M sucrose,

1 mM EDTA (pH 7.0), 1 mM dithioerythreitol, 20 μ g/ml of leupeptin, 2 μ g/ml of antipain, and 1 μ g/ml of pepstatin. Ten to twenty μ g of total proteins of each sample were incubated with PNPB (diluted in acetonitrile) and buffer (0.1 M NaH_2PO_4 , 0.9% NaCl, and 1 mM dithioerythreitol [pH 7.25]) for 10 min at 37°C. The addition of 3.25 ml of methanol:chloroform:heptane mixture (10:9:7) stopped the reaction. After centrifugation at $800 \times g$ for 20 min, the absorbance of the supernatant was measured at 400 nm in a spectrophotometer (UV 160; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The enzymatic activity was expressed in units, with one unit being equivalent to the release of 1 μ mol of *p*-nitrophenol per minute. All samples were analyzed in triplicate, and HSL activity was related to the total protein concentration of the sample.

Determination of FC and EC Concentrations in STF and ITf

Lipids in the samples were extracted in hexane:isopropanol (3:2, v:v) containing the internal standard stigmaterol and stigmateryl oleate at RT. Lipids extracts were dried under N_2 , resuspended in chloroform, and separated on silica G, 250- μ m, thin-layer chromatographic (TLC) plates with hexane:diethyl ether: NH_4OH (c) (80:20:1) as solvent. The separated lipids were visualized by briefly placing the TLC plate in a chamber of iodine vapors. Areas corresponding to the separated cholesterol and cholesteryl esters were labeled, and the iodine was allowed to sublime. The areas containing cholesterol, which also contained the stigmaterol internal standard, were scraped into a glass tube containing chloroform:methanol (2:1). The mixture was then vortexed, centrifuged at low speed, and the supernatant removed and saved for future analyses. The cholesteryl ester bands, which also contained the stigmateryl oleate internal standard, were scraped into a glass tube and hydrolyzed in KOH by heating at 80°C for 30 min. After cooling, 0.5 ml of H_2O and 1 ml of hexane were added, the mixture was vortexed, and the phases were separated by low-speed centrifugation. The upper hexane layer containing the cholesterol (and the internal standard stigmaterol) was removed and saved for future analyses [36].

The cholesterol samples were analyzed by gas-liquid chromatography (6890 series; Hewlett-Packard, Boise, ID) as described by Brown et al. [37] using a Supelco SPB 1701 column (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Average elution time for cholesterol and stigmaterol were 17 and 22.5 min, respectively. Quantification was performed by reference to the internal standard stigmaterol. The sensitivity of the method was 4 ng of cholesterol.

Determination of TG Concentrations in STF and ITf

Quantification of TG from the STF and ITf was carried out using a TG kit (Sigma-Aldrich) according to the protocol of the manufacturer. Briefly, TG were hydrolyzed to glycerol and free fatty acids by incubation with a lipase. The glycerol produced was measured by coupled enzyme reactions catalyzed by glycerol kinase, glycerol phosphate oxidase, and peroxidase. The sensitivity of the method was 0.01 g/L of glycerol.

Serum Testosterone Concentration

Serum levels of testosterone were measured by ELISA using commercially available kits according to the recommendation of the manufacturer (American Laboratory Products). The sensitivity of the method was 0.07 ng/ml.

Data Analysis and Statistical Analysis

The relative HSL protein content of scanned immunoreactive bands in Western blots was estimated by densitometry (Scion Image Software; Scion Corporation, Frederick, MD). The bands were scanned using a laser scanner (Astra 1200S; Umax Data System Inc., Hsinchu, Taiwan, ROC). Descriptive statistics are presented in the form of figures with mean \pm SEM. Pearson correlation coefficients were calculated for subsets of variables that were observed in the same animals. Analysis of variance for repeated measures was carried out, with age as the between-subjects factors and variables of the same type and scale as the within-subject factors (FC and EC, or HSL activity in STF and ITf). For variables of different types (e.g., FC and TG, EC and TG, or HSL activity and testosterone), a multivariate one-way design was used, with age as the factor and the variables as the components of the response vector. Post-hoc comparisons (*t*-tests) between age groups were performed with the Bonferroni (Dunn) method. When necessary, logarithmic transformation were applied. The significance level of 0.05 was used. All analyses were carried out with the SAS software (SAS Institute, Cary, NC).

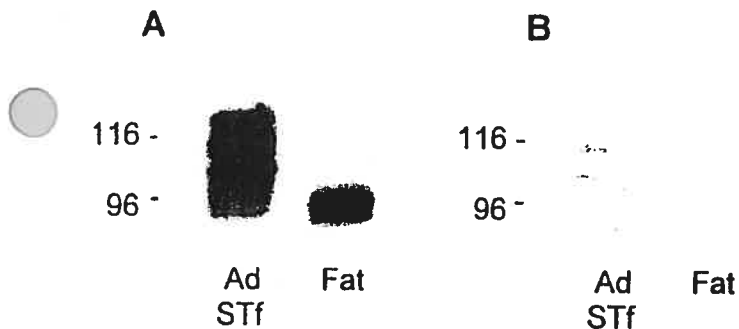


FIG. 1. Control for anti-rat HSL immunoreactivity in guinea pig tissues. Samples of adult (Ad) guinea pig STf and adipose tissue (Fat) were homogenized, and 20 μ g of total STf proteins and 5 μ g of total adipose tissue proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blotting. The membrane was incubated with anti-rat HSL (A) or with anti-rat HSL antibody preadsorbed with rat adipose tissue (B). All immunoreactive bands detected in guinea pig tissues were less intense when the membrane was incubated with the preadsorbed HSL antibody than when incubated with the nontreated antibody.

RESULTS

Western Blot Analyses

Controls using anti-HSL preadsorbed with rat adipose tissue showed a considerable decrease of HSL immunoreactivity in guinea pig testis and adipose tissue extracts (Fig. 1), indicating that the HSL immunoreactivity detected in guinea pig tissues was due to presence of the enzyme.

The presence of HSL in the ITf and STf obtained from neonatal (6-day-old), pubertal (11- and 21-day-old), and adult (>55 days) guinea pig testes and in epididymal spermatozoa was studied by Western blot analyses. In this species, spermatogenesis has been reported to start approximately 7 days after birth and to be completed approximately 42–45 days after birth [38]. The blots showed a band at 104 kDa in the ITf and STf (Fig. 2A, arrowhead). The molecular mass of HSL detected in the ITf and STf was slightly greater than that in the adipose tissue (90 kDa)

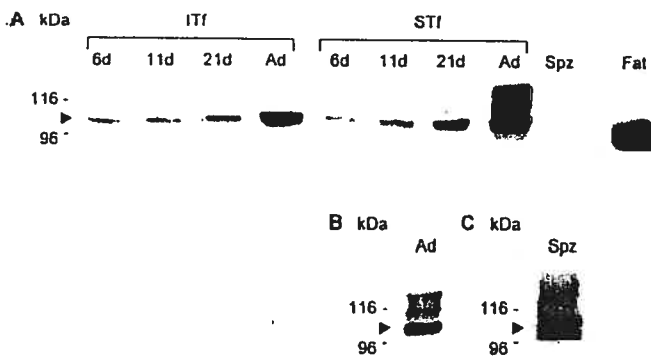


FIG. 2. Western blot analyses of HSL in ITf and STf enriched fractions during postnatal development. The ITf and STf were prepared from neonatal (6-day-old), pubertal (11- and 21-day-old), and adult (Ad) guinea pig testes. Adipose tissue (Fat) was used as a positive control. The figure shows a representative Western blot. A) An immunoreactive band with a molecular mass of 104 kDa (arrowhead) was detected in testicular samples, whereas in the adipose tissue, the immunoreactive band showed a molecular mass of 90 kDa. The intensity of the HSL band at 104 kDa increased with age in STf and ITf. Two additional immunoreactive bands of 110 and 120 kDa were detected in the STf obtained from the adult testes. B) The bands were apparent even in briefly exposed membranes. C) In epididymal spermatozoa (Spz), one HSL immunoreactive band of 104-kDa and another of 120-kDa molecular mass were detected in overexposed membranes. d, Days.

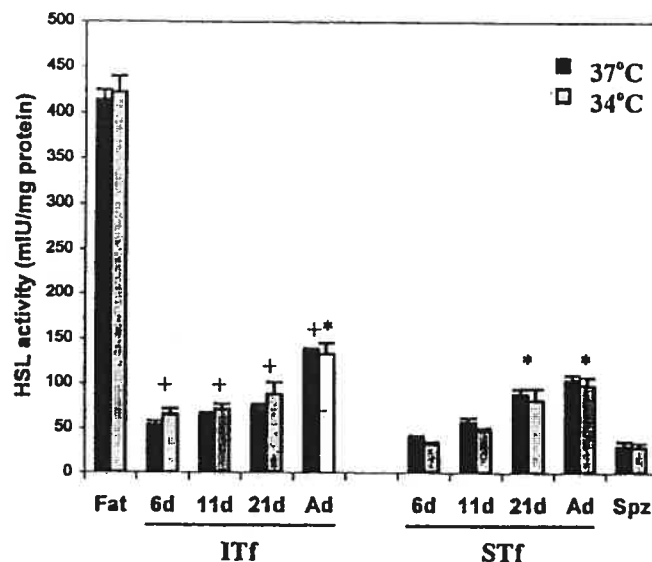


FIG. 3. The HSL activity during postnatal development in ITf and STf. The HSL activity was assayed at 34°C and at 37°C in ITf and STf obtained from neonatal (6-day-old), pubertal (11- and 21-day-old), and adult (Ad) guinea pig testes. Adipose tissue (Fat) was used as a positive control. The samples were assayed in triplicate, and the data shown are the mean \pm SEM of three independent experiments. The HSL activity increased with age in both the ITf and STf. The HSL activity in these two enriched fractions was significantly higher in the samples from adult testes than in samples from 6-day-old testes (* P < 0.05). In addition, HSL activity was higher in the STf from the 21-day-old testis than in that from the 6-day-old testis. The HSL activity in the ITf of 6-, 11-, and 21-day-old as well as adult testes was higher than that measured in the STf of the same age groups (+ P < 0.05). The HSL activity was detected in epididymal spermatozoa (Spz). No significant differences were detected between HSL activities assayed at 34°C and at 37°C in ITf, STf, and Spz.

(Fig. 2A). The intensity of the 104-kDa band was highest in the ITf and STf from adults (Fig. 2A). Two additional immunoreactive bands of 110 and 120 kDa were detected only in the STf obtained from adult testes (Fig. 2, A and B). These bands were not detected in STf from other age groups or in the ITf of the adult group, even when membranes were overexposed. Two HSL immunoreactive bands of 104 and 120 kDa were detected in spermatozoa when membranes were overexposed (Fig. 2C).

HSL Activity

Previous studies had reported that the activity of testicular cholesterol ester hydrolase was temperature sensitive [39–41]; therefore, we compared the HSL activity measured at the scrotal temperature (34°C) with the enzymatic activity measured at the body temperature (37°C). No significant differences were detected between the HSL activity assayed at 34°C and that assayed at 37°C in ITf and STf (Fig. 3). The HSL was active in the ITf and STf in all age groups studied (Fig. 3). The HSL activity was higher in adipose tissue than in the ITf and STf of all age groups. The HSL activity was significantly higher in the ITf of the adult testes and in the STf of the 21-day-old and adult testes than in the same fractions of the 6-day-old guinea pig testes (P < 0.05). The HSL activity in the ITf of the 6-, 11-, and 21-day-old and adult testes was higher than that in the STf of the same age groups (P < 0.05). The HSL was active in epididymal spermatozoa (Fig. 3).

The increase in HSL enzymatic activity paralleled the increase in HSL protein levels in all age groups studied,

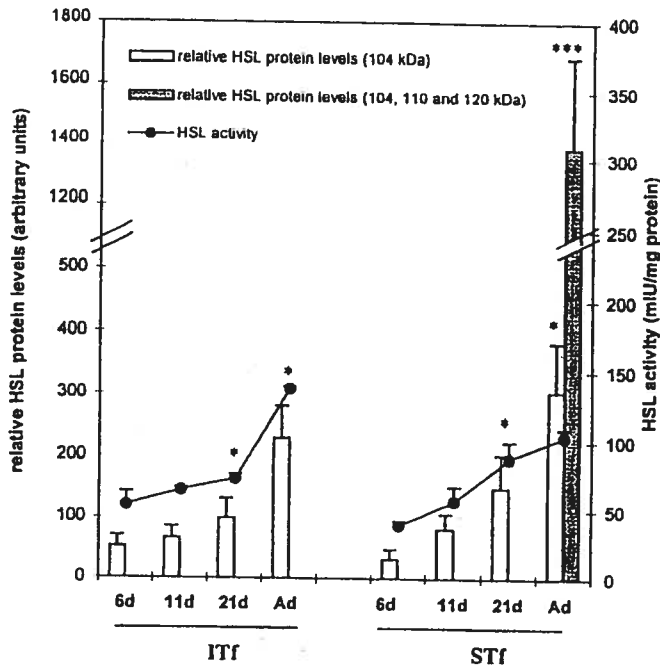


FIG. 4. The HSL activity and relative HSL protein levels during postnatal testicular development. The 104-kDa HSL immunoreactive bands in the ITf and STf of Western blots were scanned, and the intensity of the bands was quantified by densitometry using the Scion Image Software. The optical density of the bands (open rectangles) was expressed in arbitrary units and compared with the HSL activity (solid lines joined by closed circles). Both HSL activity and HSL concentration increased with age in the ITf and STf. The HSL activity and HSL concentration were significantly higher in the ITf and STf from the 21-day-old and adult testes than in those from the 6-day-old testes ($P < 0.05$). When all three immunoreactive bands (104, 110, and 120 kDa) were considered in adult STf samples, the relative HSL concentration was even more significantly higher in the STf of the adult testes than in that of the 6-day-old testes ($***P < 0.001$ vs. 6-day-old samples).

except in the STf of the adult testis, in which HSL protein levels increased more than the HSL enzymatic activity ($P < 0.05$) (Fig. 4). The relative enzyme concentration increased even more when the three bands were considered in the STf of the adult testes (Fig. 4), reaching 12.5-fold the value recorded in the STf of the 6-day-old testes ($P < 0.001$ vs. 6-day-old sample).

Subcellular Distribution of HSL in STf

To determine the subcellular localization of HSL, STf obtained from adult testes were homogenized and subjected to subcellular fractionation. The subfractions were characterized by their specific enzyme markers (Table 1). The enzymatic profile of the various subcellular fractions revealed an enrichment of arylsulfatase and acid phosphatase activities in the lysosomal subfraction, an enrichment of succinate dehydrogenase in the mitochondrial subfraction, and an enrichment of the glucose-6-phosphatase in the Mc (Golgi apparatus, sER, and rER). All subfractions contained low levels of the other enzymes, indicating low levels of contamination with the other subfractions.

The 104-kDa HSL was detected in the STf total homogenate as well as the cytosolic and lysosomal subfractions, and traces of the enzyme were found in the sER, but not in the other subcellular fractions studied (Fig. 5, arrowhead). The 110- and 120-kDa immunoreactive bands detected in the STf total homogenate were observed only in the lysosomal subfraction (Fig. 5, arrows).

TABLE 1. Distribution of marker enzyme activities in tubule subcellular fractions.^a

Subfractions	Arylsulfatase	Acid phosphatase	Succinate dehydrogenase	Glucose-6-phosphatase
Nuclei	0.30	1.31	6.10	1.03
Mitochondria	0.91	1.19	5.16	0.47
rER	1.06	2.18	0.00	2.32
sER	0.00	1.50	0.00	7.65
Golgi	0.00	1.50	0.00	21.60
Lysosomes	6.00	7.12	1.19	1.35
Cytosol	0.01	0.01	0.00	0.98

^a The activity of specific enzymes was measured in each different subcellular fraction for biochemical characterization of the enriched fractions: arylsulfatase and acid phosphatase for the lysosomal subfraction, succinate dehydrogenase for the mitochondrial subfraction, and glucose-6-phosphatase for the microsomal (rER, sER, and Golgi apparatus) subfraction. The data showed the enrichment of arylsulfatase and acid phosphatase activities in the lysosomal subfraction, the enrichment of succinate dehydrogenase in the mitochondrial subfraction, and the enrichment of the glucose-6-phosphatase in the microsomal subfraction. All subfractions contained low levels of the other nonspecific enzymes, suggesting low contamination with the others subfractions. Enzymatic activities are expressed as % enzyme activity/% total proteins.

FC, EC, and TG Variations in STf and ITf

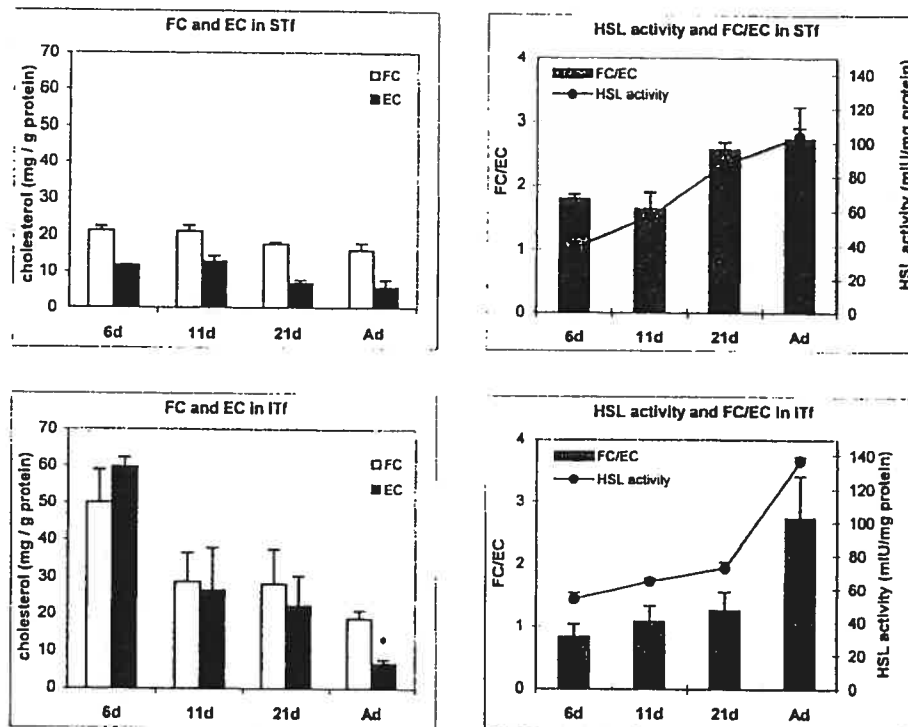
Lipids were first extracted and separated by TLC, and FC and EC were quantified by gas-liquid chromatography. The FC:EC ratios were roughly the same (near three) in ITf and STf in the adult; however, at the onset of development (6-day-old group), the ratios neared two in the STf and one in the ITf (Fig. 6). The FC and EC levels decreased in the ITf and STf with postnatal testicular development, but the decrease was significant only for EC in the ITf of the adult ($P < 0.05$ vs. the 6-day-old sample) (Fig. 6). The FC:EC ratios increased with testicular development and reached 152% and 326% in the STf and ITf, respectively, of the value recorded in the same fractions in the 6-day-old testes (Fig. 6). The FC:EC ratios paralleled the increase in the HSL activity assessed by hydrolysis of PNPB in the STf ($r = 0.80$, $P < 0.01$, $n = 10$) and ITf ($r = 0.71$, $P < 0.05$, $n = 10$) (Fig. 6).

The TG concentrations were measured in the STf and ITf in all age groups (Fig. 7). The TG levels did not vary significantly during development (Fig. 7), and no correlation was detected between the HSL activity and TG levels in the STf ($r = -0.27$ [not significant]) and ITf ($r = -0.34$ [not significant]).



FIG. 5. Western blot analysis of HSL in subcellular fractions obtained from STf of adult testes. In the STf from adult testes (Ad), three HSL immunoreactive bands with molecular masses of 104 (arrowhead), 110, and 120 kDa (arrows) were present. In the subcellular fractions from the STf of adult testes, three bands with molecular masses of 104, 110, and 120 kDa were detected in the lysosomal subfraction (Lys). In the cytosolic subfraction (Cyt), only the 104-kDa immunoreactive band was detected. Traces of the 104-kDa band were detected in the sER. No HSL immunoreactivity was detected in the nuclear (N), mitochondria (M), rER, and Golgi apparatus (G) subfractions.

FIG. 6. Testicular FC and EC levels and HSL activity during postnatal testicular development. Total lipids in the STf and ITf obtained from 6-, 11-, and 21-day-old as well as adult testes were extracted. The FC and EC were separated by TLC and quantified by gas-liquid chromatography. The FC and EC are expressed as mg cholesterol/g total protein. Values shown are the mean \pm SEM of three independent experiments. The FC and EC concentrations decreased with testicular development in the STf and ITf, but this decrease was significant only for EC in the ITf of adult testes ($*P < 0.05$ vs. 6-day-old sample). The FC:EC ratios were calculated and compared with the HSL activity in the same STf and ITf. The HSL activity paralleled the FC:EC ratios in the STf ($r = 0.80$, $P < 0.01$, $n = 10$) and in the ITf ($r = 0.71$, $P < 0.05$, $n = 10$).



Serum Levels of Testosterone

The serum testosterone levels were determined by ELISA and compared with the HSL activity and the relative HSL protein levels. Figure 8 shows that serum testosterone levels decreased significantly with the onset of puberty (11-day-old group) up to 21 days after birth, relatively to the level recorded during the neonatal period (6-day-old group) ($P < 0.05$). Testosterone levels were increased significantly in the adult ($P < 0.001$). The serum testosterone levels correlated with the changes recorded in the HSL activity in the ITf ($r = 0.91$, $P < 0.001$, $n = 12$) and STf ($r = 0.60$, $P < 0.05$, $n = 12$) and with the changes in HSL protein levels in ITf ($r = 0.89$, $P < 0.001$, $n = 12$) and STf ($r = 0.97$, $P < 0.001$, $n = 12$).

HSL Immunolocalization in Tissue Sections

Controls performed using the second antibody alone or preimmune serum showed no reaction product (Fig. 9a). The HSL immunohistochemical localization was performed with the same antibody used in the Western blot analyses. The HSL was detected in the Sertoli cells in all age groups studied (Fig. 9, b-h), including in neonatal group before the onset of puberty (Fig. 9b). The HSL was localized in elongating spermatids and Sertoli cells, where its distribution was stage-specific in the adult testis (Fig. 9, f-h). The HSL immunoreactivity was most intense in tubules at stage X of the cycle of the seminiferous epithelium following the release of mature spermatids into the lumen, when the HSL immunoreactivity accumulated near the base of the Sertoli cells (Fig. 9g). The HSL was detected in the endothelial cells lining blood vessels within the interstitial tissue of the testis (Fig. 10a). Within the excurrent ducts, HSL immunoreactivity was most intense in cells lining the tubuli recti or straight tubules and the rete testis (Figs. 10, b and c). The HSL labeling was moderate within the epididymis (Fig. 10, d-g).

Localization of HSL in Epididymal Spermatozoa by Immunofluorescence

Controls performed with preimmune serum showed non-specific labeling in the midpiece of the tail of epididymal spermatozoa (Fig. 11a). The HSL localized principally to the equatorial segment of the head (Fig. 11b) and, occasionally, in the posterior acrosomal segment of spermatozoa.

DISCUSSION

Contribution of cholesterol to the tubules requires the action of several enzymes. Sertoli cells reportedly have the capacity to synthesize cholesterol from acetate *in vitro* [42]. Although no evidence exists that tubules contribute significantly to androgen production *in vivo*, if the capacity to synthesize cholesterol also exists *in vivo*, this would require factors to regulate this capacity with the metabolic demands imposed on Sertoli cells by the cyclic production of germ cells. In the normal testis, more than half the germ cells will die by apoptosis before reaching maturity, and many will be phagocytosed by Sertoli cells, leaving accumulations of cellular debris and stacks of FC-rich, germ cell-borne membranes in lysosomes [43]. Despite this contribution of cholesterol to Sertoli cells, because cholesterol is a component of all germ cell membranes, including spermatozoa [44, 45], the cyclical release of spermatozoa offers a constant challenge to the homeostasis of FC in the tubules that demands the action of regulatory mechanisms. The Sertoli cells are involved in the cyclical phagocytosis of EC-rich lipid droplets [43] contained within the spermatids' residual bodies. It has been suggested, yet never shown, that Sertoli cell phagosomes contain esterases and lipases, and that these would process lipids borne by residual bodies and liberate the subunits or "building blocks" necessary for new lipid synthesis [46]. The present study addresses, to our knowledge for the first time, the question of the

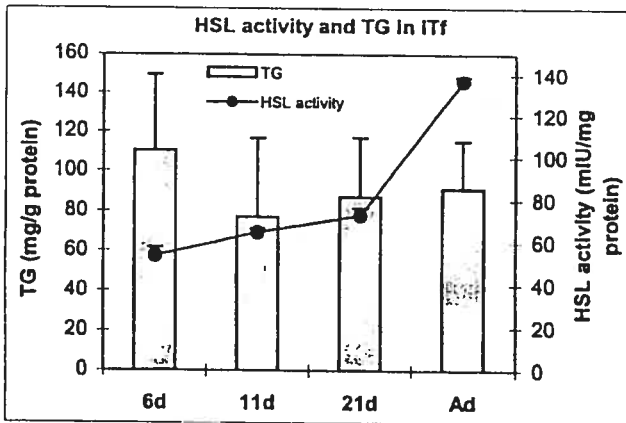
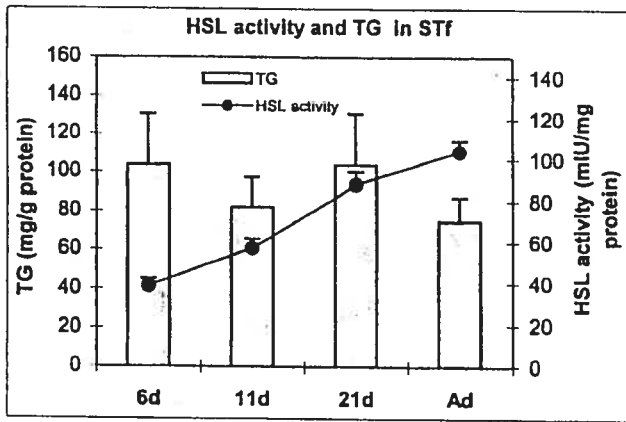


FIG. 7. Triglyceride (TG) levels and HSL activity in the STF and ITf during postnatal testicular development. The TG were assayed in the STF and ITf prepared from 6-, 11-, and 21-day-old as well as adult testes. Values shown are the mean \pm SEM of three independent experiments. No significant differences in TG levels were detected throughout testicular development. Comparison of the TG levels and HSL activity in the same testicular fractions from animals of the same age groups showed no correlation between TG levels and HSL activity in both the STF ($r = -0.27$ [not significant]) and ITf ($r = -0.34$ [not significant]).

putative presence of HSL in Sertoli cell lysosomes. The base of the Sertoli cell is continually exposed to changing plasma cholesterol levels. The suggestion that Sertoli cells possess Apo B and Apo E receptors for the uptake and degradation of low-density and high-density lipoproteins [47] indicates that the supporting cells could actively regulate supplies of cholesterol within the tubules.

The present study substantiates previous reports concerning testicular HSL [10, 13–16]. The detection of guinea pig testicular HSL with larger molecular masses (104, 110, and 120 kDa) than the HSL expressed in other tissues, namely, in the adipose tissue (90 kDa), is in agreement with the results of studies in other species [10, 15, 16, 48]. In addition, because measurements were made here using enriched tissue fractions born of distinct compartments of the testis rather than whole-testis extracts, as used in previous studies, the results extend over other studies and show that HSL activity rather than HSL protein levels was higher in ITf than in STF in the adult. Moreover, the results show that HSL activity and HSL protein levels increased in parallel in both ITf and STF throughout development, except in the STF of the adult, in which the protein levels increased more rapidly than the enzymatic activity. Significantly, HSL

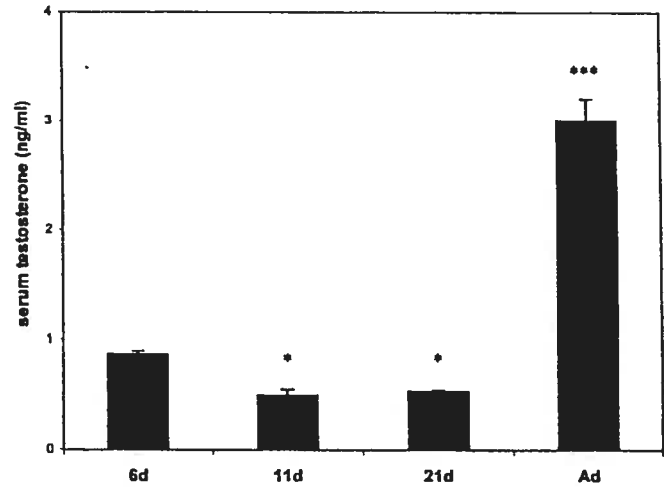


FIG. 8. Serum testosterone concentration during testicular development. Serum testosterone levels were measured by ELISA and expressed as ng/ml. Values shown are the mean \pm SEM of five independent experiments. * $P < 0.05$ for 11- and 21-day-old vs. the 6-day-old samples, *** $P < 0.001$ adult vs. 6-day-old samples.

mRNA reportedly increases in steroidogenic tissues (i.e., adrenal glands and testis) but remains constant in the adipose tissue during development in the rat [14]. Here, assessments of the FC, EC, and TG levels were made using the same fractions in which HSL protein levels and enzymatic activity were measured. The results show that FC and EC levels decreased in both the interstitial tissue and the tubules during development. The results also show that FC:EC ratios were approximately the same in ITf and STF in the adult (approximately three), but that they were near two in the STF and near one in the ITf during the early phase of development. These results suggest a regulation of cholesterol esterification/de-esterification in the two cellular compartments of the testis during adulthood different from that during development. They also suggest a difference in this regulation of cholesterol esterification/de-esterification in each compartment, at least during the early phase of development. In addition, the results show that a sharp increase in testosterone secretion was accompanied by a decrease in EC in the ITf and by an increase in HSL activity, coincidentally with a decrease in the number of lipid droplets in the Leydig cells (unpublished data) in the adult.

The finding that guinea pig Leydig cells were not positively labeled by antibodies against recombinant rat HSL in the present study could be interpreted in one of two ways. Either no HSL is in the Leydig cells, or the amount of HSL present in the cell is less than the detection limit allowed by the immunohistochemical technique used in this study. Based on the observation of FC and EC levels that are larger in guinea pig ITf than in the STF throughout development (except in the adult, in which these levels are roughly the same), the finding of a significantly higher HSL activity in the ITf than in the STF of all age groups, and our recent unpublished observation of HSL-positive Leydig cells in mink testis, the second alternative is greatly favored. If the suggestion shows itself to be correct, this would support to the notion that HSL may play a role in providing adequate amounts of FC for use by Leydig cells as a precursor of the testosterone necessary for the success of spermatogenesis. In addition, the present finding of a strong, positive correlation of HSL activity with FC:EC ratios in both ITf and STF provides additional support to the

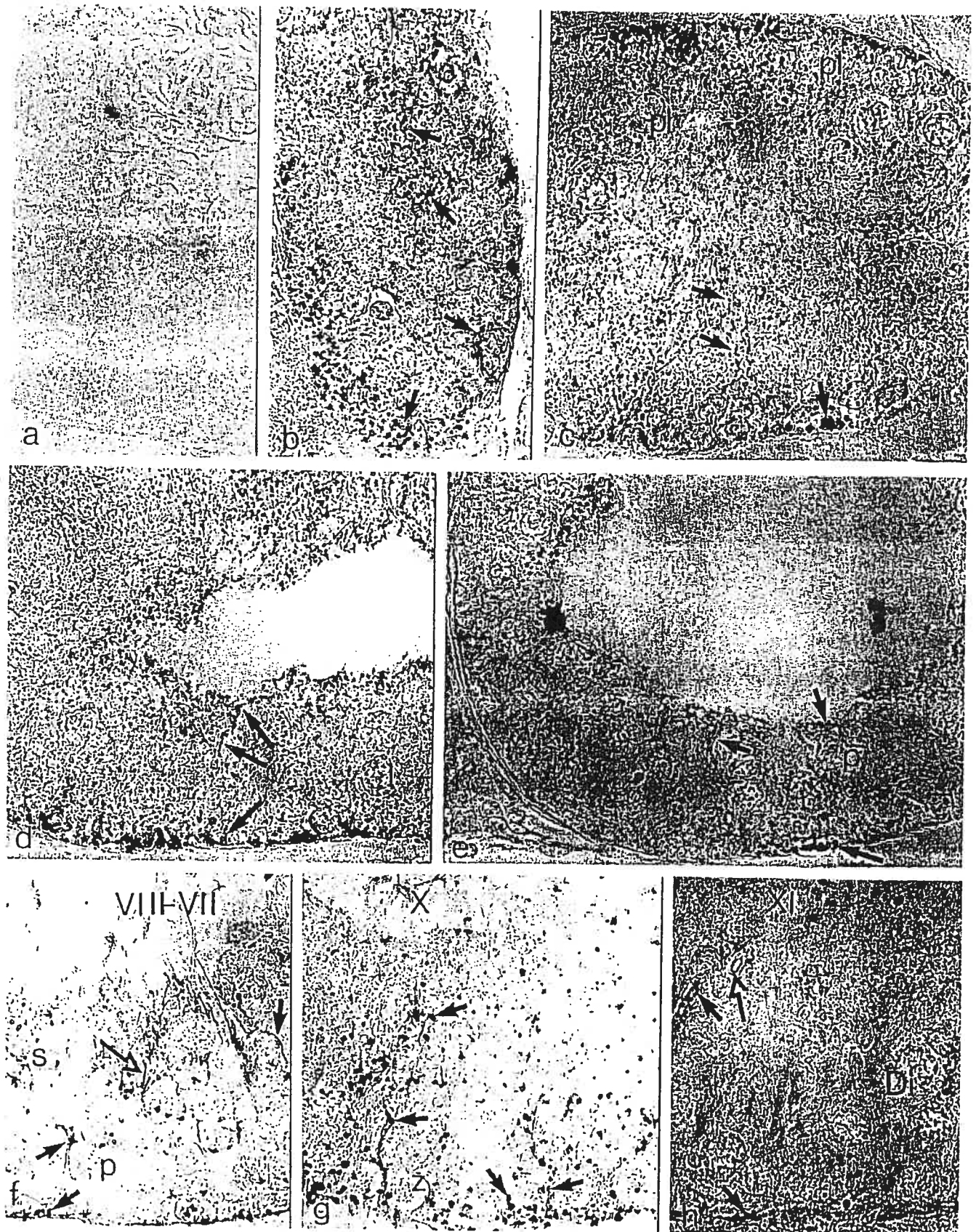


FIG. 9. Immunohistochemical localization of HSL in developing testes. Tissue sections (a) incubated with preimmune serum or with the second antibody alone showed no reaction product. The HSL immunolabeling was detected in Sertoli cells from 6 (b)-, 11 (c)-, 14 (d)-, and 21-day-old guinea pigs (e). The HSL immunoreactivity was observed within the epithelium throughout development (b-e). In the adult testis (f-h), HSL was detected in the elongating spermatids (open arrows) and Sertoli cells (closed arrows), in which the enzyme was distributed in minute accumulations throughout the cell and the distribution of the HSL immunoreactivity varied in a stage-specific manner, being most intense in stage X following the release of mature spermatozoa

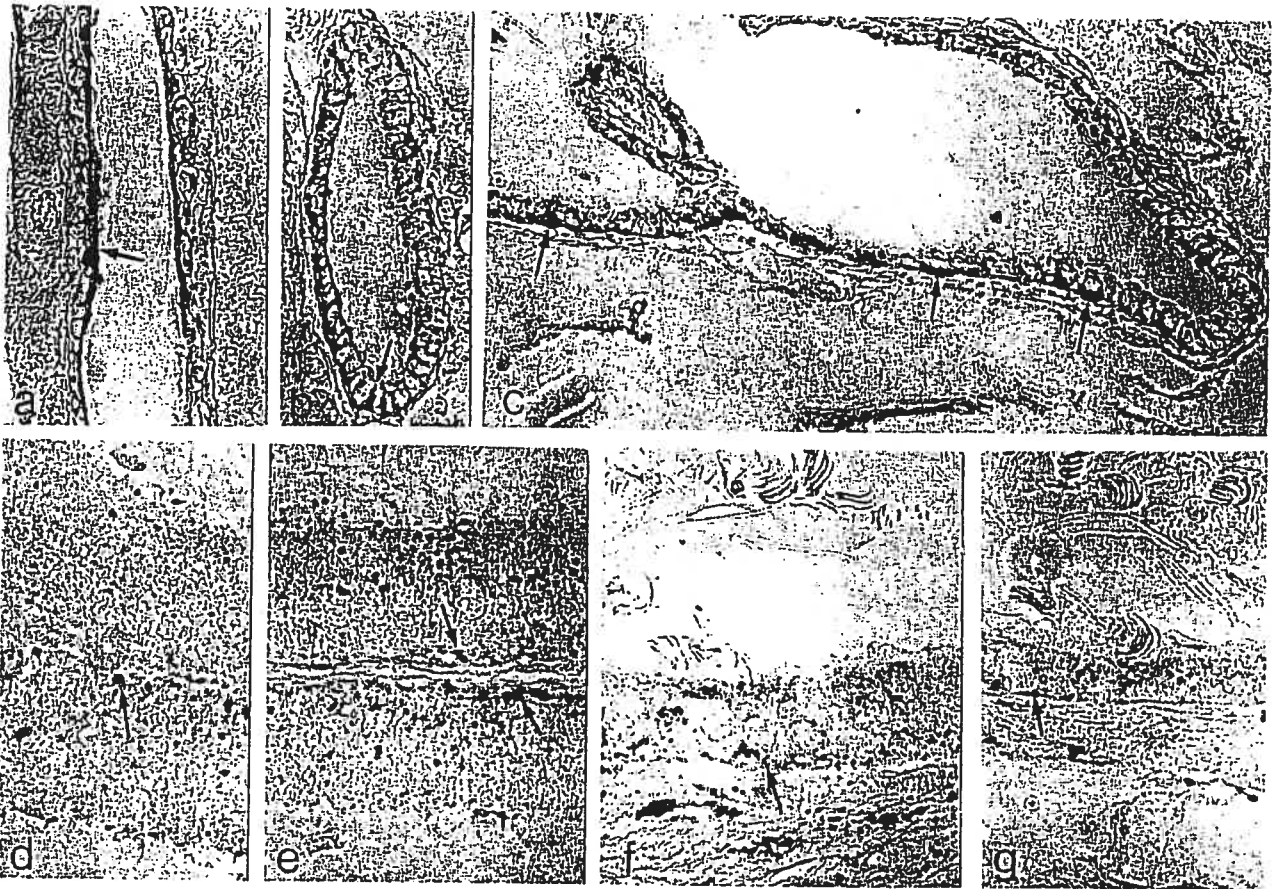


FIG. 10. Immunolocalization of HSL in the interstitial tissue of the adult testis and adult testicular excurrent ducts. The HSL immunoreactivity was intense in the endothelial cells lining the blood vessels (arrow) of the interstitial tissue (a). Within the testicular excurrent ducts, the reaction was most intense (arrow) in the cells of the tubuli recti (or straight tubules) (b) and of the rete testis (c). From the head (d) to the tail regions (g) of the epididymis, the usual characteristic changes, such as decreased epithelial height and decreased height of stereo cilia, were noticed. The HSL labeling was heaviest in the distal part of the body (e) and in the proximal part of the tail (f) of the epididymis. $\times 780$.

notion that HSL is the only cholesterol ester hydrolase in this tissue, and that the FC:EC ratios and the enzymatic activity measured in this study using PNPB as substrate reflect the activity of HSL in the STF, ITf, and spermatozoa. The HSL exhibits both cholesterol ester and TG hydrolase activities [49], and the activity of HSL toward cholesterol esters roughly equals that toward triacylglycerol in rat adipose tissue [49]. The finding here that testicular HSL enzymatic activity correlated with tubular and interstitial FC:EC ratios, but not with TG levels, is in agreement with the report that HSL^{-/-} knockout mice possessed no cholesterol esterase activity but did possess residual TG lipase activity in the testis [4].

Here, all measurements were performed during the neonatal period, puberty, and adulthood, thus allowing for correlation of a physiological event typical either to the interstitial tissue or the tubules with a particular phase of testicular development, namely, a peak in serum testosterone lev-

els in the adult and meiosis during puberty. The present study recorded an increase in HSL protein levels and activity in STF that coincided with periods (i.e., the 21-day-old and adult groups) characterized by numerous pachytene



FIG. 11. Immunofluorescence localization of HSL in epididymal spermatozoa. a) Epididymal spermatozoa incubated with preimmune serum (control) showed a weak labeling in the midpiece of the tail (arrowhead); however, the remainder of the cell, including the head (open curved arrow), showed no labeling. b) The HSL immunolabeling was detected in the equatorial segment of epididymal spermatozoa (open curved arrow). In the midpiece, the nonspecific labeling was similar to the one obtained when the preimmune serum was used (arrowhead). $\times 780$.

in the lumen of the tubule, when the enzyme accumulated near the base of the Sertoli cells (g). A sharp decrease was found in the HSL immunoreactivity coincidental to the appearance of older classes of spermatocytes such as the diplotene spermatocytes during stage XI (h). The HSL immunoreactivity was low for the remaining stages of the cycle of the seminiferous epithelium. The stages of the cycle are indicated in roman numerals. Di, Diplotene spermatocytes; I, leptotene spermatocytes; p, pachytene spermatocytes; pl, preleptotene spermatocytes. $\times 780$.

spermatocytes in the tubules, reflecting intense meiotic activity. Moreover, the finding of a decrease in HSL labeling coincidental to the appearance of diplotene spermatocytes within the adult seminiferous epithelium hints at a link of HSL with a particular class of germ cells, namely, the spermatocytes. In addition, the present finding of increased HSL immunoreactivity in the tubules during stage X (i.e., two stages of the cycle of the seminiferous epithelium posterior to the release of mature spermatids in the lumen) suggests a role of HSL in the processing of lipids borne by residual bodies. In the present study, HSL accumulated near the base of Sertoli cells in stages following the release of spermatids. This distribution of the enzyme coincides with an increase in lipid droplets that has been documented in the same location and during the same stages of the cycle in other species [46, 50, 51]. However, other morphometric analyses have stressed that although EC-containing lipid droplets increased in tubules coincidental to the release of mature spermatids during spermiation, their numbers were maximal during the stages of the cycle of the seminiferous epithelium that were associated with meiosis [46]. Several pathological conditions leading to an arrest of spermatogenesis at the pachytene spermatocyte stage were reportedly accompanied by an accumulation of lipid droplets in Sertoli cells [52, 53]. In HSL^{-/-} knockout mice, the cholesterol esters are increased [4]. The HSL may play a role in cholesterol mobilization during spermatogenesis. The finding here of the 104- and 120-kDa HSL immunoreactive bands, of measurable HSL activity in spermatozoa, and of the 104-, 110-, and 120-kDa bands in the lysosome subfraction of the adult testes, in which the enzyme is presumably not active (because HSL has an optimum pH of 7), suggests that part of HSL may originate from germ cells and be imported by Sertoli cells.

Using subfractions of STf, the present study provides, to our knowledge for the first time, evidence that testicular HSL is localized in the cytosol, sER, and lysosomes of Sertoli cells. The 110- and 120-kDa immunoreactive bands in the lysosomal subfraction from the STf obtained from adult guinea pig testis may correspond to the 113- and 127-kDa proteins typically reported in mature rat testis [10]. That the 110- and 120-kDa bands were not detected in the ITf of the adult indicates that the enriched tissue fractions used in this study were not contaminated with each other. Moreover, despite the small but unavoidable contamination of the enriched subcellular fractions with other subfractions, the finding of the HSL immunoreactive bands of 104-, 110-, and 120-kDa only in the lysosomal subfraction and the detection of the 104-kDa band in the cytosol subfraction as well as of traces of the 104-kDa in the sER subfraction indicate that the contamination level with other subfractions was lower than the detection limit of the HSL allowed by Western blotting. Other studies have reported that the testis contains two additional large bands [10, 13], but this is the first report showing that the bands are present principally within the tubules. The HSL has been reported to be a cytosolic enzyme [54–56], and our finding of a 104-kDa band in the cytosol is in agreement with the results of these earlier reports. The trace levels of a 104-kDa band detected in association with the sER subfraction may suggest a possible involvement of the enzyme in the lipid metabolism at this location. The present study contributes the first evidence that Sertoli cell lysosomes contain all three HSL immunoreactive bands. The lysosomal HSL likely originates from Sertoli cells, because except for the step 7 spermatids, and unlike Sertoli cells, the germ cells were reported to contain

no lysosomes [57]. In this study, the HSL relative protein levels paralleled HSL activity in STf for up to 21 days after birth, whereas in the adult, the increase in enzymatic activity did not correlate with protein expression, suggesting the accumulation of part of the enzyme in lysosomes. This could explain, in part, the relatively low activity of the enzyme in tubules of the adult testis, because HSL is inactive at lysosomal pH.

The finding of HSL in guinea pig Sertoli cells as well as in elongating spermatids is in agreement with those of other immunocytochemical [16] and *in situ* hybridization studies in the rat [15]. Testicular HSL mRNA has been reported in mouse round spermatids [58]. Transcription could be initiated in round spermatids and translation in elongating spermatids. The present findings of a 104- and 120-kDa HSL immunoreactive bands in spermatozoa and of HSL enzymatic activity in epididymal spermatozoa support the notion that the enzyme plays a role in regulating the proportion of cholesterol relative to other classes of lipids in the plasma membrane of spermatozoa consistent with the acquisition of fertility. Moreover, the present original localization of HSL by immunofluorescence to the equatorial segment of epididymal spermatozoa is consistent with a role in spermatozoa-oocyte interaction. Cholesterol levels were increased in spermatozoa during maturation in the epididymis [59, 60] and decreased during capacitation [61], and this parameter is reportedly associated with the induction of progressive motility and fertility in male gametes [62]. More significantly, a disruption in the proportion of membrane cholesterol in spermatozoa has been identified to be a cause of infertility in the human [63], which gives new impetus to the research concerning the impact of testicular HSL on male fertility.

A temperature-resistant form of cholesterol ester hydrolases has been reported in Sertoli cells and Leydig cells and a temperature-sensitive form of the enzyme only in Sertoli cells in rat testis [39, 40]. This latter form was reported to be active at 32°C, inactive at 37°C, and responsible for an increase in FC:EC ratios in cryptorchid rat testes [39–41, 52]. The guinea pig possesses scrotal testes, yet no differences were recorded in the HSL activity assayed at 34°C, or the physiological temperature of the testis, and in the one assayed at 37°C, or the body temperature, in the present study. Species differences are possible. Birds, for instance, possess intra-abdominal testes, and their testicular HSL likely remains functional at high temperature (i.e., 43–45°C).

In the interstitial tissue of the testis, HSL localized predominantly to the endothelial cells of the blood vessels. One of the surprising results here was that HSL is abundant within testicular endothelial cells but not within Leydig cells or endothelial cells of the epididymis. This suggests that the testicular endothelial cells, which most likely were responsible for the bulk of HSL detected in the interstitial fraction by Western blotting, undergo a maturation process unique to the testis during development. In addition, the present study reports, to our knowledge for the first time, the presence of the enzyme in excurrent ducts of the testis and, in particular, in the cells lining the tubuli recti and the rete testis, where HSL immunoreactivity was intense. The presence of abundant HSL in the tubuli recti is consistent with the localization of HSL in Sertoli cells, because tubuli recti are lined with cells similar to Sertoli cells. The HSL might conceivably be related to the numerous lipid droplets typically found in the excurrent ducts, or the enzyme might play a role in either the testosterone synthesis that has been

documented to take place in this location [64] or the modifications of membrane lipids reported to occur in spermatozoa during their transit through the excurrent ducts [60].

ACKNOWLEDGMENTS

The cholesterol measurements performed in this study could not have been realized without the kind and generous help of Dr. J. Davignon and Dr. S. Lussier-Cacan of the Institute of Clinical Research of Montreal, who not only allowed us the use of their gas-liquid chromatograph but also provided most valuable advice and precious help during the course of this study. Lucie Boulet is thankfully acknowledged for her superb technical assistance. The authors are particularly grateful to Dr. U. Maag from the Department of Mathematics and Statistics of the Université de Montréal for his generous contribution in the treatment of the statistical data. We also thank Dr. J. Paiement from the Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, for the use of his facilities and L. Roy for her guidance during the subcellular fractionation. The help of S.R. Yoon in the immunofluorescence studies is also very much appreciated.

REFERENCES

- Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase—a multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1052:128–132.
- Chang TY, Chang CCY, Cheng D. Acyl-coenzyme A: cholesterol acetyltransferase. *Annu Rev Biochem* 1997; 66:613–638.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343:425–429.
- Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:787–792.
- Cook KG, Yeaman SJ, Stralfors P, Belfrage P. Direct evidence that cholesteryl ester hydrolase from adrenal cortex is the same enzyme as hormone-sensitive lipase from adipose tissue. *Eur J Biochem* 1982; 125:245–249.
- Cook KG, Colbran RJ, Snee J, Yeaman SJ. Cytosolic cholesterol ester hydrolase from bovine corpus luteum. Its purification, identification, and relationship to hormone-sensitive lipase. *Biochim Biophys Acta* 1983; 752:46–53.
- Cordle SR, Colbran RJ, Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1986; 887:51–57.
- Small CA, Goodacre JA, Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase is responsible for the neutral cholesterol ester hydrolase activity in macrophages. *FEBS Lett* 1989; 247:205–208.
- Small CA, Yeaman SJ, West DW, Clegg RA. Cholesterol ester hydrolysis and hormone-sensitive lipase in lactating rat mammary tissue. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1082:251–254.
- Kraemer FB, Patel S, Saedi MS, Sztalryd C. 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* 1993; 34:663–671.
- Bartke A, Musto N, Caldwell BV, Behrman HR. Effects of a cholesterol esterase inhibitor and of prostaglandin F_2 on testis cholesterol and on plasma testosterone in mice. *Prostaglandins* 1973; 3:97–104.
- Bartke A. Concentration of free and esterified cholesterol in the testes of immature and adult mice. *J Reprod Fertil* 1971; 25:153–156.
- Holm C, Belfrage P, Fredrikson G. Immunological evidence for the presence of hormone-sensitive lipase in rat tissues other than adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148:99–105.
- Kraemer FB, Tavangar K, Hoffman AR. Developmental regulation of hormone-sensitive lipase mRNA in the rat: changes in steroidogenic tissues. *J Lipid Res* 1991; 32:1303–1310.
- Stenson Holst L, Hoffman AR, Mulder H, Sundler F, Holm C, Bergh A, Fredrikson G. Localization of hormone-sensitive lipase to rat Sertoli cells and its expression in developing and degenerating testes. *FEBS Lett* 1994; 355:125–130.
- Stenson Holst L, Langin D, Mulder H, Laurell H, Grober J, Bergh A, Mohrenweiser HW, Edgren G, Holm C. Molecular cloning, genomic organization, and expression of a testicular isoform of hormone-sensitive lipase. *Genomics* 1996; 35:441–447.
- Osterlund T, Danielsson B, Degerman E, Contreras JA, Edgren G, Davis RC, Schotz MC, Holm C. Domain-structure analysis of recombinant rat hormone-sensitive lipase. *Biochem J* 1996; 319:411–420.
- De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution pattern of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J* 1955; 60:604–617.
- Wattiaux R, Wattiaux-De-Coninck S, Ronveaux-Dupal M, Dubois F. Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J Cell Biol* 1978; 78:349–368.
- Igdoura SA, Morales CR. Role of sulfated glycoprotein-1 (SGP-1) in the disposal of residual bodies by Sertoli cells of the rat. *Mol Reprod Dev* 1995; 40:91–102.
- Bergeron JJM, Rachubinski RA, Sikstrom RA, Posner BI, Paiement J. Galactose transfer to endogenous acceptors within Golgi fractions of rat liver. *J Cell Biol* 1982; 92:139–146.
- Paiement J, Bergeron JJM. Localization of GTP-stimulated core glycosylation to fused microsomes. *J Cell Biol* 1983; 96:1791–1796.
- Roy AB. The sulphatase of ox liver. I. The complex nature of the enzyme. *Biochem J* 1953; 53:12–15.
- Graham JM. The identification of subcellular fractions from mammalian cells. In: Graham JM, Higgins JA (eds.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 19: Biomembrane Protocols: I. Isolation and Analysis. Totowa, NJ: Humana Press; 1993: 1–18.
- Ames RN, Dubin DT. The role of polyamines in the neutralization of bacteriophages deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 1960; 235:769–775.
- Davis GA, Bloom FE. Subcellular particles separated through a histochemical reaction. *Anal Biochem* 1973; 51:429–435.
- Herrada G, Wolgemuth DJ. The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. *J Cell Sci* 1997; 110:1543–1553.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–254.
- Pelletier R-M, Trifaró J-M, Carbajal ME, Okawara Y, Vitale ML. Calcium-dependent actin filament-severing protein scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis, and spermatozoa. *Biol Reprod* 1999; 60:1128–1136.
- Towbin H, Staechelin T, Dordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:4350–4354.
- Christensen AK. The fine structure of testicular interstitial cells in guinea pigs. *J Cell Biol* 1965; 26:911–935.
- Pelletier R-M. 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* 1995; 16:400–409.
- Pelletier R-M, Okawara Y, Vitale ML, Anderson JM. Differential distribution of the tight-junction-associated protein ZO-1 isoforms $\alpha+$ and $\alpha-$ in guinea pig Sertoli cells: a possible association with f-actin and g-actin. *Biol Reprod* 1997; 57:367–376.
- Clermont Y. Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig: a method for identification of the stages. *Fertil Steril* 1960; 11:563–573.
- Holm C, Osterlund T. Hormone-sensitive lipase and neutral cholesteryl ester lipase. In: Doolittle MH, Reue K (eds.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 109: Lipase and Phospholipase Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 1999: 109–121.
- Oram JF. Receptor-mediated transport of cholesterol between cultured cells and high-density lipoproteins. In: Albers JJ, Segrest JP (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 129. London: Academic Press; 1986: 645–659.
- Brown MS, Faust JR, Goldstein JL. Role of the low density lipoprotein receptor in regulating the content of free and esterified cholesterol in human fibroblasts. *J Clin Invest* 1975; 55:783–793.
- Noller DW, Flickinger CJ, Howard SS. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the guinea pig determined by tritiated thymidine autoradiography. *Biol Reprod* 1977; 17:532–534.
- Durham LA, McLean Grogan W. Temperature sensitivity of cholesteryl ester hydrolases in the rat testis. *Lipids* 1982; 17:970–975.
- Durham LA, McLean Grogan W. Characterization of multiple forms of cholesteryl ester hydrolase in the rat testis. *J Biol Chem* 1984; 259: 7433–7438.
- Wee S, McLean Grogan W. Testicular temperature-labile cholesteryl ester hydrolase. *J Biol Chem* 1993; 268:8158–8163.
- Wiebe JP, Tilbe KS. De novo synthesis of steroids (from acetate) by isolated rat Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 89: 1107–1113.
- Pelletier R-M, Vitale ML. Filipin vs enzymatic localization of cholest-

- terol in guinea pig, mink, and mallard duck testicular cells. *J Histochem Cytochem* 1994; 42:1539-1554.
44. Pelletier R-M, Friend DS. Development of membrane differentiations in the guinea pig spermatid during spermiogenesis. *Am J Anat* 1983; 167:119-141.
 45. Pelletier R-M, Shivers RR. Filipin-sterol complexes in breeding and non-breeding (*Afustela vison*) Sertoli cell junctional membranes. *J Cell Biol* 1986; 103:365-365.
 46. Kerr JB, Mayberry RA, Irby DC. Morphometric studies on lipid inclusions in Sertoli cells during the spermatogenic cycle in the rat. *Cell Tissue Res* 1984; 236:699-709.
 47. Maboundou J-C, Fofana M, Fresnel J, Bocquet J, LeGoff D. Effect of lipoproteins on cholesterol synthesis in rat Sertoli cells. *Biochem Cell Biol* 1995; 73:67-72.
 48. Large V, Amer PR, Reynisdottir S, Grober J, Van Harmelen V, Holm C, Langin D. Hormone-sensitive lipase expression and activity in relation to lipolysis in human fat cells. *J Lipid Res* 1998; 39:1688-1695.
 49. Fredrikson G, Stralfros P, Nilsson O, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. *J Biol Chem* 1981; 256:6311-6320.
 50. Niemi M, Korman M. Cyclical changes in and significance of lipids and acid phosphatase activity in the seminiferous tubules of the rat testis. *Anat Rec* 1965; 151:159-170.
 51. Kerr JB, de Kretser DM. Cyclic variations in Sertoli cell lipid content throughout the spermatogenic cycle in the rat. *J Reprod Fertil* 1975; 43:1-8.
 52. Johnson AD. Testicular lipids. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (eds.), *The Testis*, vol. 2. New York: Academic Press; 1970: 194-258.
 53. Chung KW, Hamilton JB. Testicular lipids in mice with testicular feminization. *Cell Tissue Res* 1975; 160:69-80.
 54. Egan JJ, Greenberg AS, Chang M-K, Wek SA, Moos MC, Londos C. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:8537-8541.
 55. Carey GB. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv Exp Med Biol* 1998; 441:157-170.
 56. Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 2000; 275:5011-5015.
 57. Hermo L, Oko R, Morales CR. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int Dev Cytol* 1994; 154:106-189.
 58. Blaise R, Grober J, Rouet P, Tavernier G, Daegelen D, Langin D. Testis expression of hormone-sensitive lipase is conferred by a specific promoter that contains four regions binding testicular nuclear proteins. *J Biol Chem* 1999; 274:9327-9334.
 59. Parks JE, Hammerstedt RH. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod* 1985; 32:653-668.
 60. Rana APS, Majumder GC, Misra S, Ghosh A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1061:185-196.
 61. Go KJ, Wolf D. The role of sterols in sperm capacitation. *Adv Lipid Res* 1983; 20:317-330.
 62. Haidl G, Opper C. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Hum Reprod* 1997; 12:2720-2723.
 63. Sugkarock P, Kates M, Leader A, Tanphaichitr N. Level of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. *Fertil Steril* 1991; 55:820-827.
 64. Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol. 1. New York: Raven Press; 1988: 999-1080.

4.2.3 Article 2

Relationship of the Hormone-sensitive lipase-mediated modulation of cholesterol metabolism in individual compartments of the testis to serum pituitary hormones and testosterone concentrations in a seasonal breeder, the mink (*Mustela vison*)

Ouafae Kabbaj, Suk Ran Yoon, Cecilia Holm, Jack Rose, Maria L. Vitale, and R.-Marc Pelletier. Biol of Reprod 68 : 722-734 ; 2003.

Contribution des auteurs

Ouafae Kabbaj :

- J'ai isolé les STf des ITf,
- J'ai effectué les électrophorèses et les immuno-buvarpages
- J'ai réalisé l'immunohistochimie
- J'ai dosé la HSL.
- J'ai séparé le CL et le CE par chromatographie sur couche mince (TLC) et j'ai déterminé la concentration du CL et du CE par chromatographie en phase gazeuse (GLC)
- j'ai déterminé la concentration des TG dans les STf et les ITf par méthode colorimétrique
- J'ai déterminé les concentrations sériques de la testostérone, de la FSH et de la LH par la méthode ELISA.
- J'ai participé aux analyses statistiques
- J'ai participé à la rédaction de l'article

Suk Ran Yoon a isolé les spermatozoïdes et a réalisé l'immunofluorescence de la HSL dans les spermatozoïdes.

Cecilia Holm a fourni les anticorps anti-HSL et elle a lu cet article.

Jack Rose a réalisé le dosage de la PRL.

María L. Vitale a réalisé les études d'immunofluorescence sur les macrophages testiculaires, elle a contribué à l'élaboration des photos de microscopie de fluorescence des spermatozoïdes et des macrophages testiculaires, elle a contribué aussi à la rédaction de l'article.

R.-Marc Pelletier a isolé les testicules et les spermatozoïdes épидидymaires du vison et il a préparé les tissus pour l'immunohistochimie. Il a analysé au microscope les résultats de l'immunohistochimie et de l'immunofluorescence et il a contribué principalement à la rédaction de l'article.

Casimir Akpovi dont le nom figure dans les remerciements de l'article a réalisé l'isolation des macrophages testiculaires.

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*)¹

Ouafae Kabbaj,⁴ Suk Ran Yoon,⁴ Cecilia Holm,⁵ Jack Rose,⁶ María Leiza Vitale,^{3,4} and R.-Marc Pelletier^{2,3,4}

Département de pathologie et biologie cellulaire,⁴ Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

Department of Cell and Molecular Biology,⁵ Lund University, Lund, Sweden

Department of Biological Sciences,⁶ Idaho State University, Pocatello, Idaho 83209

ABSTRACT

The role of cholesterol differs in the two compartments of the testis. In the interstitial tissue, cholesterol is necessary for the synthesis of testosterone, whereas in the seminiferous tubules, membrane cholesterol content in developing germ cells will influence the gametes' fertility. Here we evaluate the hormone-sensitive lipase (HSL) modulation of the cholesterol metabolism in each compartment of the testis. Two HSL immunoreactive bands of 104- and 108-kDa were detected in Western blots performed with polyclonal anti-human HSL antibodies in the interstitial tissue (ITf)- and seminiferous tubule (STf)-enriched fractions generated from testes harvested at 30-day intervals during puberty and, in the adult mink, during the annual seasonal reproductive cycle. Epididymal spermatozoa expressed a 104-kDa HSL isoform, and HSL was active in these cells. Immunolabeling localized HSL to interstitial macrophages; Sertoli cells, where its distribution was stage specific; spermatids; and the equatorial segment of spermatozoa. Total HSL protein levels, specific enzymatic activity, and free cholesterol (FC):esterified cholesterol (EC) ratios varied concomitantly in STf and ITf and reached maximal values in the adult during the period of maximal spermatogenic activity. In STf, HSL-specific activity correlated with FC:EC ratios but not with triglyceride levels. In STf, high HSL-specific activity occurred concomitantly with high FSH serum levels. In ITf, HSL-specific activity was high during periods of low serum prolactin levels and high serum testosterone levels. The results suggest that 1) modulation of cholesterol metabolism in individual testicular compartments may be regulated by HSL isoforms expressed by distinct cells; 2) interstitial macrophages may be part of a system involved in the synthesis of steroid hormones and in the recycling of sterols in the interstitium, whereas in the tubules, recycling could be ensured by Sertoli cells; 3) there is distinctive substrate preference for testicular HSL; and 4) HSL may be the only cholesterol esterase in this location.

¹This work was supported in part by NSERC grant OGP0041653 to R.M.P., by NSERC grant OGP0194652 to M.L.V., and by Swedish Research Council grant 11284 to C.H. M.L.V. is also funded by scholarships from fonds de la Recherche en santé du Québec.

²Correspondence: R.-Marc Pelletier, Département de pathologie et biologie cellulaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard-Montpetit, Montréal, QC, Canada H3T 1J4. FAX: 514 485 7932;

³M.L.V. and R.M.P. made equal contributions to these studies, and the order of their names is arbitrary.

Received: 12 June 2002.

First decision: 13 July 2002.

Accepted: 7 August 2002

© 2003 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

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

Sertoli cells, testis, cholesterol, hormone-sensitive lipase (HSL)

INTRODUCTION

The regulation of intracellular cholesterol metabolism in the testis involves several enzymes, including hormone-sensitive lipase (HSL), which is believed to adjust available free cholesterol (FC) supplies to the needs of the cell by hydrolyzing esterified cholesterol (EC) [1]. The functional and biological significance of HSL in testicular physiology is demonstrated by the report that HSL knockout (KO) male mice showed high testicular cholesterol ester levels accompanied by the absence of cholesterol esterase activity and by sterility due to oligospermia [2–5]. Furthermore, experimental inhibition of the cholesterol ester hydrolase induces an increase in EC levels in whole mouse testis extracts that is accompanied with a decrease in serum testosterone levels [6]. The recent finding of an accumulation of diglycerides (DG) in HSL KO mice could be of particular interest in the role of HSL in the acquisition of fertility by spermatozoa in view of the involvement of diglyceride derivatives during the acrosome reaction. These reports give impetus to further research on the impact of testicular cholesterol on male fertility.

The testis is made up of seminiferous tubules separated from each other by the interstitial tissue; cholesterol is contained in both cellular compartments. Although Sertoli cells are known to be capable of synthesizing cholesterol from acetate [7], there is no evidence that tubules make physiologically significant contributions to androgen production. Cholesterol is indispensable to all cells; however, the cholesterol concentration must be regulated to prevent excessive accumulation of the compound within the cell, which would compromise vital cellular functions. We attempt to address the hypothesis that, to preserve the integrity of the functions typical of each compartment of the testis, namely, the synthesis of testosterone in the interstitium and the production of fertile gametes in the tubules, the main enzymes implicated in the regulation of intracellular cholesterol, and specifically HSL, have to act differently in each location of the testis for maintaining adequate cholesterol concentrations. The studies described herein were designed to test this hypothesis by defining the differential HSL protein expression and activity and the localization of the enzyme in each individual compartment of the testis and by assessing the relationship of HSL in each compartment to serum pituitary hormone concentrations for the first time in the mink. Here, we took advantage of the following two facts: 1) the male mink is a seasonal breeder with an annual seasonal reproductive cycle that includes an active spermato-

genic phase with and an inactive phase without production of spermatozoa [8, 9] and 2) developmental and seasonal testicular changes are accompanied by variations in serum hormone levels [10]. In addition, the use of the mink model allows the unique advantage of distinguishing factors that regulate testicular cholesterol metabolism during postnatal sexual maturation of the developing testis from those acting during the seasonal annual reproductive cycle in the adult testis.

MATERIALS AND METHODS

Source of Chemicals and Antibodies

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit IgG, alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG, PMSF, soybean trypsin inhibitor, BSA, 1,4 diazabiscyclo-[2.2.2] octane (DABCO), p-nitrophenylbutyrate (PNPB), and a triglycerides (TG) detection kit were obtained from Sigma-Aldrich, (Oakville, ON, Canada). Anti-h vimentin, biotinylated anti-rabbit IgG, collagenase D, leupeptin, aprotinin, antipain, pepstatin and Lumi-light^{plus} chemiluminescence detection kit were purchased from Boehringer-Mannheim, (Laval, PQ, Canada). Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, and tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated anti-mouse IgG were purchased from Jackson ImmunoRes Lab, (Mississauga, ON, Canada). The NCL-MACRO mouse monoclonal macrophage marker was obtained from Novocastra (New Castle-Upon-Tyne, UK). Peroxidase-conjugated streptavidin was obtained from Molecular Probes, (Eugene, OR). Goat anti-guinea pig IgG was from Antibodies Inc., (Davis, CA). Mouse monoclonal anti-hFSH was from Cedarlane, (Hornby, ON, Canada). The testosterone ELISA kit was purchased from American Laboratory Products, (Windham, NH). Minimum essential medium (MEM) was purchased from Gibco-BRL, (Oakville, ON, Canada). The Bradford protein measurement reagent was from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Somnotol was purchased from MCI Pharmaceutical, (Mississauga, ON, Canada).

Animals

Male mink (*Mustela vison*) were purchased from the R.B.R. Fur Farm (St. Marys, ON, Canada) and from the Visonnière St. Damase (St. Damase, PQ, Canada). Each animal was individually caged and fed a high-protein diet. Animals were kept under natural lighting conditions, and they were allowed food and water ad libitum. Animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of 0.9 ml/kg body weight of Somnotol (MTC Pharmaceutical, Cambridge, ON, Canada). The protocol was approved by the Université de Montréal Animal Care Committee. Testes were dissected from neonatal (30–90-day-old), pubertal (115-, 150-, and 200-day-old), and adult (1–2-year-old) mink. Adult mink were killed monthly throughout the annual reproductive cycle. A monthly calendar had been initially proposed by Pelletier [8] to evaluate the dynamics in the germ cell population throughout the annual reproductive cycle in the adult mink. In the present report, the method of Pelletier [8] was used for the identification of the germ cells. The collection of tissues took place during the last week of each month from birth throughout adulthood. Five mink per age group were used except for the onset of puberty, where 10 animals were used. The tissues were not pooled but treated individually.

Isolation of Seminiferous Tubule and Interstitial Cell-Enriched Fractions

Freshly decapsulated testes were placed in cold MEM containing 0.25 mg/ml collagenase D and 0.1 mg/ml soybean trypsin inhibitor in a water bath equipped with a shaking mechanism set at 80 cycles/min and 37°C and processed as described elsewhere [11]. Further separation was achieved by centrifugation at 600 rpm for 20 min in a GS-6R Beckman centrifuge (Beckman, Mississauga, ON, Canada) equipped with a GH 3.8 rotor. The resulting seminiferous tubule-enriched fraction (STf), in the pellet, and the interstitial cell-enriched fraction (ITf), in the supernatant, were washed in PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) and, except for HSL activity measurements, homogenized with a glass tissue grinder in PBS containing 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM EDTA, 2 µg/ml leupeptin, and 2 µg/ml aprotinine on ice. Purity of the enriched fractions was evaluated by light microscopy.

Epididymal Spermatozoa

Epididymal spermatozoa were obtained by dicing adult mink caudae of epididymides in cold PBS. The resulting cell suspension was filtered through a 74-µm mesh and centrifuged at 2000 rpm for 15 min in a GS-6R Beckman centrifuge to recover the spermatozoa. The gametes were resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 8, containing 1 mM EDTA for 5 min to lyse contaminating epithelial and blood cells [12]. For HSL immunoblot analyses, spermatozoa were diluted 1:1 in cold PBS containing 2 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 µg/ml leupeptin, and 2 µg/ml aprotinine and were sonicated in a Fisher Sonic dismembrator (Fisher, model 300; Fisher, Farmington, NY) at maximum setting during three consecutive intervals of 30 sec each. For HSL immunofluorescence localization, spermatozoa were diluted in PBS, placed on poly-L-lysine-coated coverslips at a density of 1×10^6 cells/ml, and air dried.

Isolation of Testicular Macrophages

Macrophages were isolated from ITf obtained from normal adult mink testes killed in February using the protocol of Hutson [13]. Briefly, the ITf were washed in PBS and resuspended in MEM containing 5% FBS. The ITf suspension was plated on cell culture Petri dishes and incubated in a 95% air/5% CO₂ atmosphere at 37°C for 3 min. Next, nonadherent cells were discarded. Adherent cells (predominantly macrophages) were scraped off and cultured in MEM containing 5% FBS for 24 h on poly-L-lysine-coated coverslips.

Antibodies Against HSL

Antibodies against human (h) HSL were generated in rabbit [14]. Rabbit antiserum was affinity purified against the recombinant hHSL coupled to a CNBr-activated Sepharose 4B column (Amersham, Pharmacia Biotech, Solna, Sweden). The affinity-purified antibodies are specific for HSL and do not cross-react with other proteins upon Western blot analysis of tissue extracts. The specificity of HSL antibody was tested using mink adipose tissue as positive control. In addition, controls were made with anti-HSL preadsorbed with human adipose tissue obtained from autopsies. Human tissue was obtained following written consent of the close family. For negative controls, preimmune serum as well as the primary or secondary antibody alone were used.

Electrophoresis and Western Blots

Twenty micrograms of total proteins of each STf and/or ITf sample were denatured in electrophoresis sample buffer and loaded on a 10% polyacrylamide minigel, subjected to electrophoresis, and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline (TBS: 140 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) for 60 min at 37°C and then incubated with anti-HSL (1:150 dilution) or monoclonal anti-h vimentin (1:1000 dilution) for 2 h at 37°C. Membranes were thoroughly rinsed and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:2000 dilution) or peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:2000 dilution). Antigen-antibody complexes were revealed by enhanced chemiluminescence.

Immunolabeling

Testes were perfusion fixed with PBS, pH 7.4, followed by Bouin fixative, and then were embedded in paraffin. Endogenous peroxidase activity was inhibited with 0.3% hydrogen peroxide (H₂O₂) as previously described [11]. Labeling was done following the protocol described earlier [11]. Blocking of nonspecific binding was achieved with 0.5% skim milk. Sections were incubated with anti-HSL (1:35 dilution) and next with biotinylated anti-rabbit IgG (1:1000 dilution) followed by peroxidase-conjugated streptavidin (1:200 dilution) [11]. Controls included the use of preimmune or preadsorbed serum and of the second antibody alone.

Fluorescence Microscopy

Spermatozoa were fixed-permeabilized with -20°C methanol for 10 min and processed as described elsewhere [11]. Preparations were incubated with 3% skim milk in PBS to block nonspecific binding. Next, cells were incubated with anti-hHSL (1:6 dilution) for 60 min at 37°C, rinsed with PBS, and incubated with FITC-conjugated anti-rabbit IgG (1:400 dilution).

Testicular macrophage-enriched fractions were fixed with formaldehyde in PBS and permeabilized with acetone as described elsewhere [15].

Blocking of nonspecific labeling was achieved with 3% skim milk in PBS. To test for the presence of HSL in testicular macrophages, the cells were incubated with a mixture of antibodies consisting of rabbit anti-hHSL (1:1000 dilution) and the mouse monoclonal macrophage marker NCL-MACRO (1:20 dilution) for 60 min at 37°C. Next, cells were incubated with goat FITC-conjugated anti-rabbit IgG (1:400 dilution) and donkey TRITC-conjugated anti-mouse IgG (1:150 dilution).

Coverslips were mounted in PBS-glycerol (1:1) containing 5% DABCO.

HSL Enzymatic Activity

To estimate HSL activity, a spectrophotometric esterase assay based on the hydrolysis of PNPB was used as described earlier [11, 16]. STF, ITf, spermatozoa, and adipose tissue were homogenized on ice in 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.0, 1 mM dithioerythritol, 20 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml antipain, 1 µg/ml pepstatin. Aliquots of 10–20 µg of protein of each sample were incubated with PNPB (diluted in acetonitril) and buffer (0.1 M NaH₂PO₄, pH 7.25, 0.9% NaCl, 1 mM dithioerythritol) at 37°C for 10 min. The reaction was stopped by addition of 3.25 ml of methanol:chloroform:heptane (10:9:7). After centrifugation at 800 g for 20 min, solutions were incubated for 3 min at 42°C and the absorbance of the supernatant was measured at 400 nm in an ultraviolet spectrophotometer (UV 160; Shimadzu, Corporation, Japan). The enzymatic activity was expressed in units, one unit being equivalent to the release of 1 µmol of p-nitrophenol/min. All samples were analyzed in triplicate and the HSL activity was related to the total protein concentration of the sample.

Free and Esterified Cholesterol Measurements in STF and ITf

Measurements were performed as described earlier [11]. Briefly, lipids in the samples were extracted in hexane:isopropanol (3:2 v/v) containing the internal standards, stigmaterol and stigmasteryl oleate, at room temperature (RT). Next, lipid extracts were dried under N₂, resuspended in chloroform, and separated by thin-layer chromatography (TLC) on silica G250 µm plates with hexane:diethyl ether:NH₄OH(c) (80:20:1) as the solvent. The separated lipids were visualized by placing the TLC plates in a chamber of iodine vapors. Areas corresponding to the separated cholesterol and cholesteryl esters were marked and the iodine was allowed to sublime. The areas containing cholesterol, which also contained the stigmaterol internal standard, were scraped into a glass tube containing chloroform:methanol (2:1). The mixture was vortexed, centrifuged at low speed, and the supernatant used for analysis. The cholesteryl ester bands, which also contained the stigmasteryl oleate internal standard, were scraped into a glass tube and hydrolyzed in KOH by heating at 80°C for 30 min. After cooling, 0.5 ml of H₂O and 1 ml of hexane were added, the mixture was vortexed, and the phases were separated by low-speed centrifugation. The upper hexane layer, containing the cholesterol and the internal standard stigmaterol, was used for analysis [17]. The cholesterol samples were analyzed by gas-liquid chromatography (Gas-Liquid Chromatographer 6890 series; Hewlett-Packard, Boise, ID) using a Supelco SPB 1701 column (Sigma-Aldrich) as described by Brown et al. [18]. The average elution times for cholesterol and stigmaterol were 17 and 22.5 min, respectively. Quantification was performed by reference to the internal standard stigmaterol. The sensitivity of the method was 4 ng cholesterol.

Triglyceride Determination in STF and ITf

Quantification of TG in STF and ITf was carried out using a kit according to the manufacturer's protocol. TG were hydrolyzed to glycerol and free fatty acids by incubation with a lipase. The glycerol produced was measured by coupled enzyme reactions catalyzed by glycerol kinase, glycerol phosphate oxidase, and peroxidase. The sensitivity of the method was 0.01 g of glycerol/L.

Determination of Serum Levels of LH, FSH, Prolactin, and Testosterone

Bovine βLH (NIH AFP-8102), rabbit anti-rat LH (NIH IC-3 AFP571292393), hFSH (AFP-7298A), rabbit anti-h βFSH (NIH IC-3 AFP891891), c-prolactin (AFP2451B), and guinea pig anti-c-prolactin (P 1062091GP) were generously donated by Dr. A.F. Parlow, Scientific Director of the National Hormone and Pituitary Program of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.

LH concentrations were measured by double antibody-sandwich

ELISA. Bovine βLH diluted in 0.1% BSA in PBS was used as the standard. Wells of immunon 2 high-binding microtiter plates (Dynex Technology, Chantilly, VA) were coated with 200 µl rabbit anti-rat βLH (1:1000 dilution in PBS) for 6 h. Blocking of nonspecific binding was performed with a blocking buffer (42 mM Tris base, pH 7.0, 50.65 mM NaCl, 14.61 mM sucrose, 0.19 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 0.25 mM thimerosal, 0.1% BSA, and 1.32 ml/L Tween 20). Two hundred microliters of the standard dilution or serum sample were added. After an overnight incubation at room temperature (RT), anti-bovine βLH monoclonal mouse antibody (1:200 dilution purchased from Dr. F. Roser, Department of Animal Science, University of California, Davis, CA) was added. Plates were incubated for 2 h at RT and, next, incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (1:3000 dilution). After a 2-h incubation period, 200 µl of 3 mM p-nitrophenyl phosphate in 0.05 M Na₂CO₃ and 0.05 mM MgCl₂ were added to each well. Plates were incubated for two additional hours at RT. The enzymatic reaction was read at 405 nm using a microtiter plate reader (Beckman, Mississauga, ON, Canada). Dilutions of mink serum were parallel to the βLH standard curve. All samples and standards were assayed in triplicate within the same experiment. The results are expressed in terms of NIH bovine βLH standard. The sensitivity of the assay was 1 ng bovine LH/ml. All samples were measured in one assay. The intraassay coefficient of variation was 11% (n = 25).

The FSH concentrations were measured by applying a protocol similar to the one used for LH determination. Rabbit anti-hβFSH (1:1000 dilution) was used for coating the plates and a mouse monoclonal anti-hFSH as the second antibody. The hFSH was used as standard. The results were expressed in terms of NIH hFSH standard. The sensitivity of the assay was 0.5 ng/ml. The intraassay coefficient of variation was 9.5% (n = 30). All samples and standards were assayed in triplicate within the same experiment.

Serum prolactin concentrations were measured by heterologous double-antibody RIA in a single run, as previously described [19]. In brief, serum samples (200 µl) were incubated with 100 µl of a 1:70000 dilution of the first Ab (guinea-pig anti-c-prolactin) and 50 µl of ¹²⁵I-labeled c-prolactin for 16–18 h at 4°C. Subsequently, 200 µl of assay buffer containing goat anti-guinea pig IgG at a 1:12 dilution and were added to the tubes, vortexed, and incubated for 3–4 h. The reaction was stopped by addition of 2.0 ml of cold distilled water, followed by centrifugation at 1500 × g for 30 min at 4 def. The intraassay coefficient of variation was 4.35%. The sensitivity of the assay was 1.0 ng/ml. All serum samples were analyzed in triplicate.

Testosterone concentration in mink sera was measured by ELISA. The sensitivity of the method was 0.07 ng/ml. All samples were measured in one assay. The intraassay coefficient of variation was 5.2%.

Data and Statistical Analyses

The relative HSL protein content of scanned immunoreactive bands in Western blots was estimated by densitometry (Scion Image Software; Scion Corporation, Frederick, MD). The bands of three independent immunoblots were scanned using a laser scanner (Astra 1200S; Umax Data System, Inc., Hainchu, Taiwan, ROC). Descriptive statistics are presented in the form of figures with means ± SEM. Pearson correlation coefficients were calculated for subsets of variables that were observed in the same animal. For each variable, a multivariate one-way ANOVA was used with age as the factor and the variable as the component of the response vector. Post hoc comparisons (*t*-tests) between age groups were performed with the Bonferroni (Dunn) method. Where necessary, logarithmic transformations were applied. The significance level of 0.05 was used. All analyses were carried out with SAS software (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTS

Adult female mink were bred during the mating period March 7–28. The period from mating to blastocyst formation extends over 6 days, and it is followed by a variable 18-day average delayed implantation and by a fixed 30-day period from implantation to parturition, averaging a total of 54 days of gestation, which in certain conditions may vary from 40 to 70 days [20]. In mink, the neonatal period expands from birth (usually in May) to about Day 90 after birth. This is followed by puberty, which extends from Day 91 to Day 252 after birth; this period includes the completion of spermatogenesis by Day 240 after birth and the appearance of spermatozoa in the epididymis some 12 days

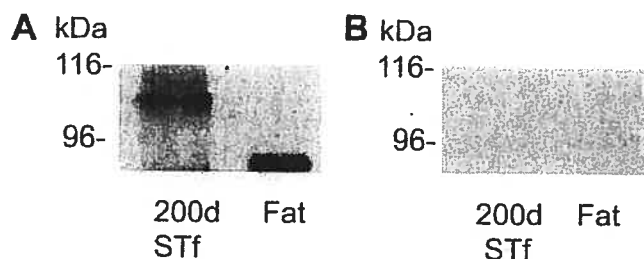


FIG. 1. Validation of the specificity of anti-hHSL antibodies in mink tissues. Western blot analyses were performed on mink STf and adipose tissue using anti-hHSL antibodies. A) Two immunoreactive bands of 104 and 108 kDa were detected in STf, whereas in the adipose tissue (Fat) a 90-kDa band was observed. B) No immunoreactivity was observed in STf and Fat when the membrane was incubated with HSL antibodies preadsorbed with human adipose tissue.

later in January [8]. The annual seasonal reproductive cycle in the adult includes 1) an 8-mo-long active spermatogenic phase, which begins with the division of the spermatogonial stem cells in August and ends by the end of March and 2) a 4-mo-long inactive spermatogenic phase, or testicular regression, from April to the end of July [8]. The duration of the cycle of the seminiferous cycle has been estimated to be 58 days in the mink [21], and spermatozoa are produced from the end of January to the end of March [8].

Western Blot Analyses

Western blot analyses performed with anti-hHSL revealed two immunoreactive bands of 104 and 108 kDa in the STf (Fig. 1A, STf) and a 90-kDa band in mink adipose tissue (Fig. 1A, Fat). Adsorption of anti-hHSL with human adipose tissue caused a major decrease in the intensity of the immunoreactive bands in mink tissues (Fig. 1B), demonstrating that the anti-hHSL antibody recognizes the enzyme in mink tissues. Western blots performed with preimmune serum were negative (not shown).

Both the 104- and 108-kDa HSL immunoreactive bands were present in mink STf and ITf; however, the intensity of the two bands varied during development and the annual reproductive cycle. In addition, the changes detected were different depending on the band and on the testicular compartment under study. In the STf, the 104-kDa band was stronger during adulthood and the active spermatogenic phase, whereas the 108-kDa band was more intense during periods when spermatogenesis was not completed (Fig. 2A). A 104-kDa immunoreactive band was detected in epididymal spermatozoa when membranes were overexposed (Fig. 2B). Because we did not detect expression of the 108-kDa band in spermatozoa, we reasoned that this isoform could be expressed only by Sertoli cells within the seminiferous tubules. We therefore analyzed the levels of the intermediate filament protein vimentin, which is normally expressed by Sertoli cells but not spermatozoa. Vimentin levels in the same STf samples showed a profile of variation that was similar to that of the 108-kDa HSL band during development and during the annual reproductive cycle in the adult (Fig. 2C). In the interstitial compartment, the expression of the 104-kDa protein also increased coincidentally with adulthood and the active spermatogenic phase and in May–June, while the 108-kDa protein was mainly expressed during development and testicular regression (Fig. 2D).

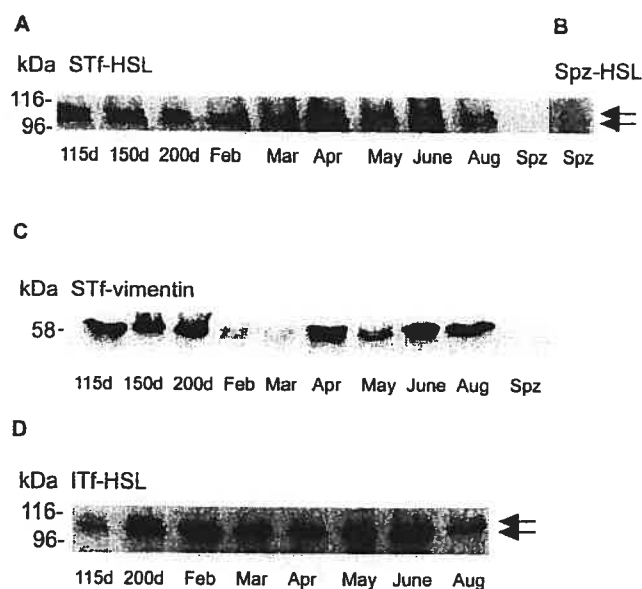


FIG. 2. Western blot analyses of HSL in STf and ITf during development and the annual reproductive cycle and in epididymal spermatozoa. STf, ITf, and spermatozoa were obtained as explained in *Materials and Methods*, section and 20 μ l total homogenate of each sample was loaded on polyacrylamide gels. The Western blot analyses presented in this figure are representative of six independent experiments. A) Two immunoreactive bands of 104 and 108 kDa were detected in STf throughout puberty and the annual reproductive cycle; the intensity of the 104-kDa band in the samples of March, April, May, and June to some extent masks the 108-kDa band. B) The 104-kDa HSL immunoreactive band was also detected in epididymal spermatozoa (Spz) when membranes were overexposed. C) The profile of vimentin levels in STf mimicked that of the 108-kDa HSL immunoreactive band in the STf. Vimentin was not detected in epididymal spermatozoa (Spz). D) In the ITf, the 104-kDa band was detected in all age groups. The 108-kDa HSL immunoreactive band was apparent in 115- and 200-day-olds and in the adult sample of August.

HSL Concentration and HSL (Esterase) Activity in STf and ITf

Densitometry analyses of the 104- and 108-kDa HSL immunoreactive bands in the STf and ITf were carried out on six independent immunoblots similar to those shown in Figure 2 (Fig. 3). The 104- and 108-kDa bands were always detected in the STf, whereas only the 104-kDa HSL was detected in the ITf of all age groups studied. The 108-kDa HSL expression in STf and ITf was inversely related to the number of germ cells present within the seminiferous tubules: high during development and testicular regression but low during the active spermatogenic phase (Fig. 3, A and B). In the STf and ITf, the expression of the 108- and the 104-kDa HSL immunoreactive bands together as well as the expression of the 104-kDa alone increased with development, whereas these were lowest by the onset of the next seasonal spermatogenic phase in the adult (Fig. 3).

HSL activity measured at 34 and 37°C gave similar values. HSL-specific activity was generally lower in the STf (Fig. 3A) than in the ITf (Fig. 3B). HSL-specific activity increased significantly in both STf and ITf with the completion of spermatogenesis in the adult during the active phase of the annual reproductive cycle (Fig. 3, A and B). HSL-specific activity increased with the levels of the 108- and 104-kDa HSL proteins together and with the levels of the 104-kDa HSL protein alone in STf and ITf. The enzymatic activity decreased more rapidly than the protein

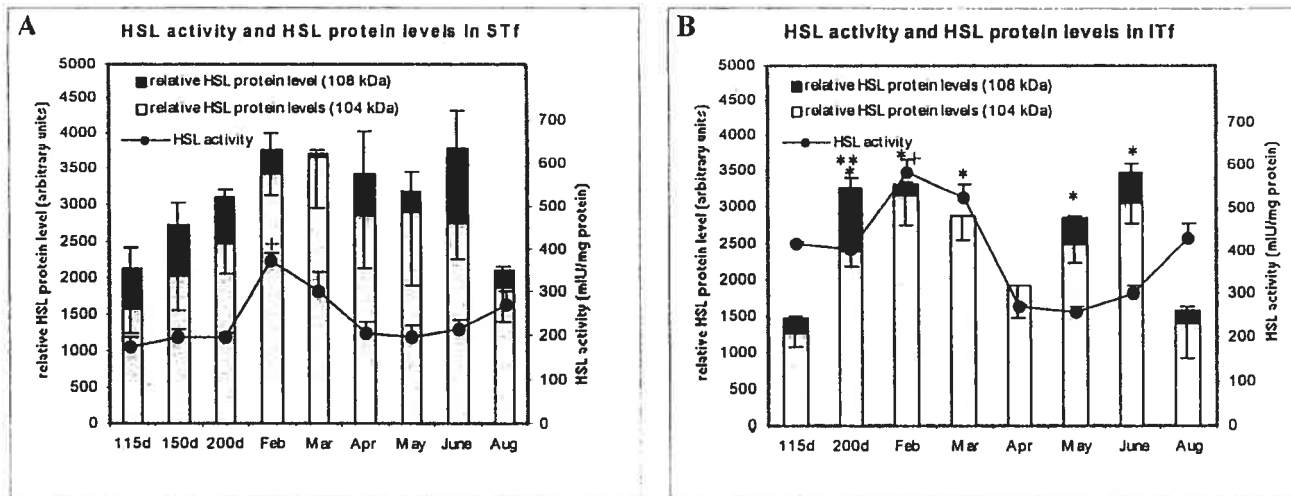


FIG. 3. HSL protein levels and HSL activity in STf and ITf. The 104-kDa (open bars) and 108-kDa (closed bars) HSL protein levels expressed in arbitrary units and normalized to the protein content in the samples are compared with the HSL activity (—●—). The values shown are mean \pm SEM of six independent experiments for the assessment of HSL protein levels and of three independent experiments for the HSL activity. A) The variations recorded in the 104- and 108-kDa HSL isoform levels were not significantly different from each other in the STf. B) In the ITf, the levels of the 108-kDa isoform were significantly higher in the 200-day-olds than in the 115-day-olds and in the adult mink of August (** $P < 0.05$). In addition, the levels of 104 + 108 kDa together and of the 104 kDa were significantly higher in the ITf of the 200 day olds and in the adult mink killed in February, March, May, and June than in ITf of the 115 day olds and of the adult mink of August (* $P < 0.05$). The panels A and B show the HSL activity assayed at 37°C. The HSL activity was significantly higher in February than in the 115-, 150-, and 200-day-olds and in the adults in April, May, and June in the STf (+ $P < 0.05$). In the ITf, HSL activity was significantly higher in February than in the 115-day-olds and in the adult mink in April, May, June, and August (+ $P < 0.05$).

levels (Fig. 3, A and B). In addition, HSL was active in epididymal spermatozoa (42 mU/mg protein).

Correlation Between HSL Activity and FC, EC, and Triglyceride Levels in the STf and ITf

To search for a potential correlation between the cholesterol metabolism and HSL activity in the two testicular compartments, FC and EC, were measured in the STf and ITf. In the STf, FC levels were high throughout puberty. In the adult, during the annual reproductive cycle, FC levels decreased from the end of the active spermatogenic phase to the first half of testicular regression (Fig. 4A). During the second half of testicular regression, FC levels increased with the loss of germ cells (Fig. 4A). EC concentrations decreased significantly in STf during development (Fig. 4A). In the adult, EC levels were low during the active spermatogenic phase up to the first half of testicular regression, whereas they increased during the second half (Fig. 4A).

In the ITf, FC and EC levels showed similar profiles: high during puberty and low in the adult in February (Fig. 4B). The FC and EC levels were low in ITf during the active spermatogenic phase up to the first half of testicular regression, but they increased during the second half (Fig. 4B).

The FC/EC ratios followed a profile similar to that of HSL activity in STf: both parameters increased in the adult in February (Fig. 4C). The FC/EC ratios were highest in STf during the active spermatogenic phase, but they decreased with the loss of germ cells during testicular regression and increased again with the onset of the next active spermatogenic phase (Fig. 4C). The peak in FC/EC ratios appeared 1 mo later in the ITf than it did in the STf (Fig. 4D). There was a strong positive correlation of FC/EC ratios and HSL activity in the STf ($r = 0.85$, $P < 0.05$) but not in the ITf ($r = 0.35$).

Triglyceride Levels in STf and ITf

The TG content showed little variation in the STf from puberty to adulthood (Fig. 5A). The TG levels reached peak values by the second half of testicular regression (Fig. 5A). The TG profiles were similar in STf and ITf (Fig. 5, A and B). There was a small increase in TG levels concomitantly with a rise in HSL activity in STf and ITf in February, whereas a more dramatic increase in TG levels was accompanied with a decrease in HSL activity in June (Fig. 5, A and B). Correlation of TG levels with HSL activity was found in neither STf ($r = 0.18$, $P < 0.05$) nor ITf ($r = -0.10$).

Immunohistochemical Studies

No reaction product was observed in controls performed with either the preimmune serum or the second antibody alone (not shown). Immunohistochemistry studies on pubertal mink testes showed that HSL immunoreactivity was localized to Sertoli cell cytoplasmic processes surrounding germ cells throughout puberty (Fig. 6a). HSL was also detected in elongating spermatids (from step 8 to step 19 spermatid) as well as within the Sertoli cell cytoplasmic processes that surround germ cells in the adult (Fig. 6, b-f). This enzyme was detected in all stages of the cycle of the seminiferous epithelium. HSL was abundant near the base of the Sertoli cells, particularly during stage X, i.e., two stages of the cycle following the release of mature spermatids into the lumen of the tubules in this species (Fig. 6f). Within the interstitial tissue, HSL was localized to the endothelial cells of the capillaries and to some interstitial cells resembling macrophages (Fig. 6d). The presence of the enzyme was confirmed in cultured macrophages obtained from adult mink testes harvested in February using immunofluorescence labeling (Fig. 7, a and b).

Because the histological changes taking place in the

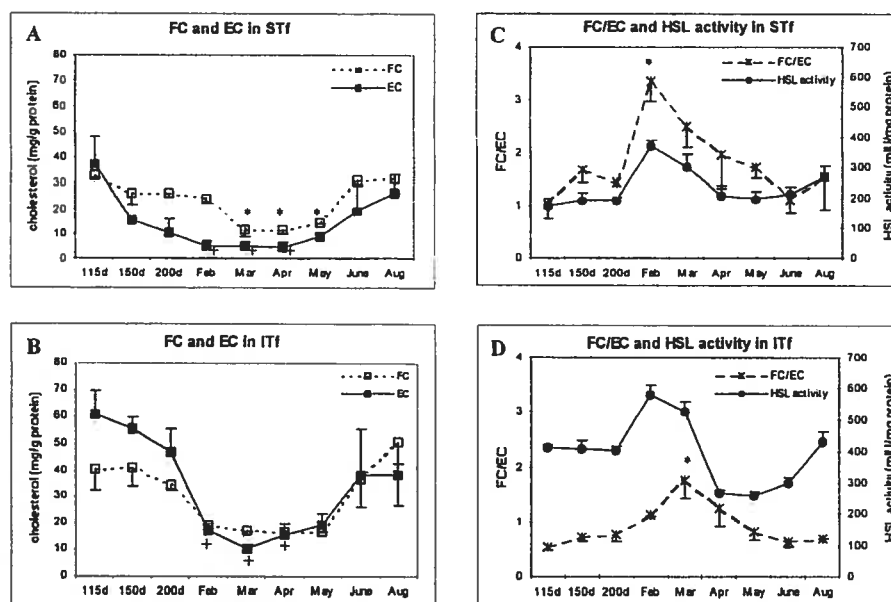


FIG. 4. Free and esterified cholesterol levels and HSL activity in STf and ITf. FC (—□—) and EC (—■—) are expressed as mg cholesterol/g protein. The values shown are mean \pm SEM of three independent experiments. A) FC levels were high in STf in the 115-, 150-, and 200-day-olds and in the adults during February, June, and August ($*P < 0.05$ adults of March, April, and May versus the 115-day-olds and the adult mink of June and August). EC levels were high in the 115 day olds and in the adults of June and August but were significantly decreased during adulthood in February, March, April, and May ($+P < 0.05$ in the adult mink of February, March, and April versus the 115-day-olds and the adults in June and August). B) In the ITf, FC and EC levels were high in the 115-, 150-, and 200-day-olds and in the adults in June and August. Only the EC was significantly decreased in the ITf ($+P < 0.05$, adult mink in February, March, and April versus the 115-day-olds and the adult mink in June and August). C) FC/EC ratios (—*—) and HSL activity (—●—) both increased sharply and significantly in STf in February ($*P < 0.05$, FC/EC ratios in February versus the 115-day-olds and the adult mink of June and August). D) In the ITf, the peak of HSL activity was in February whereas the peak in FC/EC ratios was in March ($*P < 0.05$ FC/EC ratios in March versus the 115-, 150-, and 200-day-olds and the adult mink of May, June, and August).

mink testis during puberty have been reported to mimic those that take place in the adult during testicular regression but in reverse sequence [8] and because the changes in HSL immunolocalization taking place during puberty were similar to those encountered in the adult during testicular regression, to avoid redundancy, only the data gleaned during testicular regression will be presented here (Fig. 8, a–d). HSL was localized to Sertoli cells throughout testicular regression (Fig. 8, a–c) from the time of the collapse of the lumen (Fig. 8b) to the progressive disappearance of spermatids (Fig. 8c) up to the onset of the next spermatogenic phase in August (Fig. 8d). The presence of HSL in germ cells was observed for as long as there were elongated spermatids still remaining within the regressed tubules.

Epididymal spermatozoa incubated with preimmune serum showed occasional nonspecific labeling in the mitochondrial sheath of the tail (Fig. 9a). HSL was localized principally to the equatorial segment of the head, where it showed a typical pattern (Fig. 9b), and occasionally in the postacrosomal segment.

Gonadotrophin, Prolactin, and Testosterone Serum Levels During Puberty and the Annual Reproductive Cycle

Serum LH concentrations were highest by the onset of puberty and decreased thereafter. In the adult, serum LH levels were high during the active spermatogenic phase and they decreased by the onset of the next seasonal reproductive cycle (Fig. 10). Serum FSH levels were high throughout puberty (Fig. 10). During the annual seasonal reproductive cycle, they were high from the active spermatogenic phase to the first half of testicular regression, but they decreased coincidentally with the disappearance of most

germ cells during the second half of testicular regression (Fig. 10). Serum prolactin levels were low during puberty (Fig. 10). In the adult, prolactin secretion was low during the active spermatogenic phase; it rose significantly during the first half of testicular regression to decrease sharply from the second half of testicular regression to the beginning of the next recrudescence period (Fig. 10). Serum testosterone levels were low during puberty. During the annual reproductive cycle in the adult, serum testosterone levels were high during the active spermatogenic phase and decreased to basal levels during the rest of the annual reproductive cycle (Fig. 10).

DISCUSSION

Differential HSL Expression, Localization, and Activity in Individual Compartments of the Testis

This is the first study of the testicular HSL in a seasonal breeder. Because the measurements were made here every 30 days rather than only sporadically as in most studies that used seasonal breeders, this study provides a more comprehensive and accurate account of the impact of HSL on testicular cholesterol metabolism. In addition, because the present measurements were made in seminiferous tubule- and interstitial tissue-enriched fractions rather than in whole-testis extracts, this study provides new and more precise insights into the role and the dynamics of the enzyme in individual cellular compartments of the testis. Two HSL immunoreactive bands of 104- and 108-kDa molecular masses were detected in mink STf and ITf. However, in the mink adipose tissue, the HSL molecular mass was 90 kDa. It has been shown in other species that both HSL mRNA

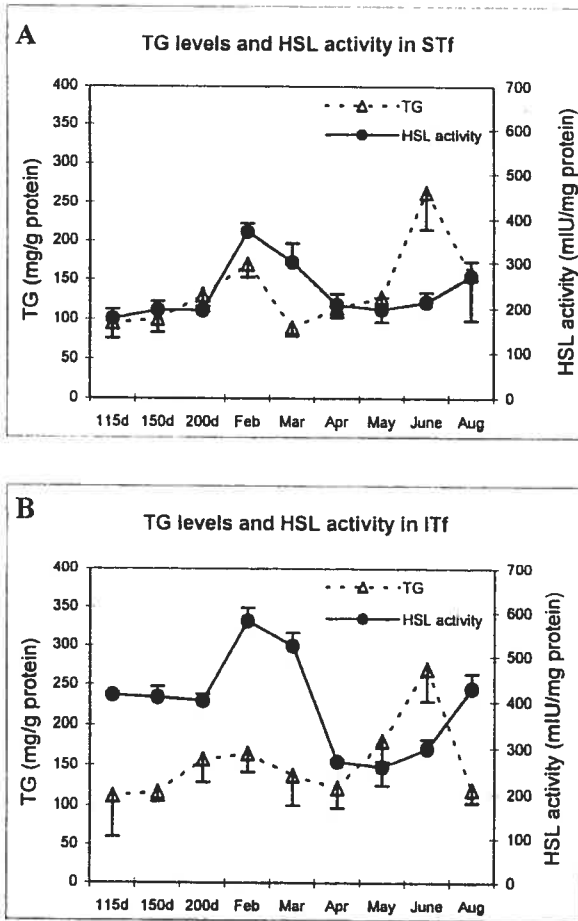


FIG. 5. Triglyceride levels and HSL activity in STf and ITf. The variations in TG levels ($-\Delta-$) recorded in STf (A) and ITf (B) in the 115-, 150-, and 200-day-old mink were not significantly different from those recorded. The values shown are the mean \pm SEM of three independent experiments.

and protein are larger in testis than in adipose tissue and other HSL-expressing tissues [11, 22]. HSL expression increased during development, reaching maximal levels during adulthood in the STf and ITf in the mink. HSL protein levels [11] and HSL mRNA [23] were also reported to increase in steroidogenic tissues, namely, the adrenal and the testis, while remaining constant in the adipose tissue during development in continual breeders.

In addition, this study shows that the expression of both HSL isoforms varied differently in each testicular compartment during the annual reproductive cycle.

Tubular Compartment

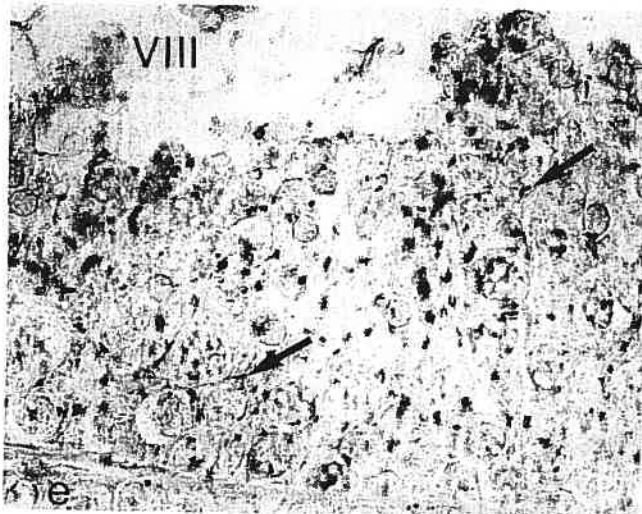
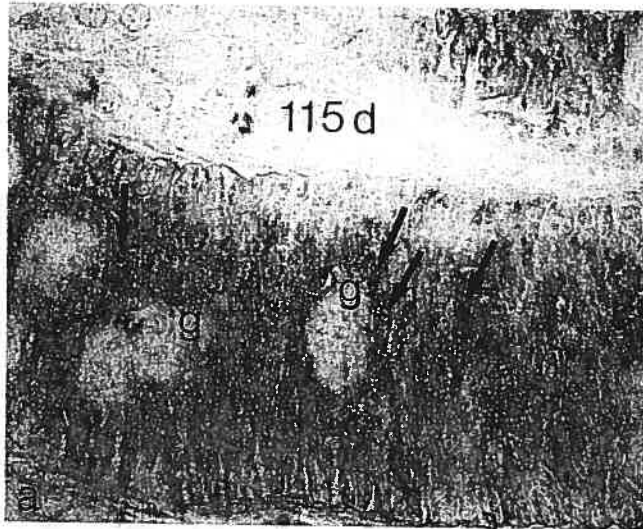
In the STf, the 108-kDa HSL isoform levels were higher during the periods when spermatogonia and spermatocytes were present, whereas the 104-kDa HSL protein levels were maximal when spermatids and spermatozoa were plentiful. The studies with vimentin, a marker present only in Sertoli cells, showed that the concentration of vimentin-containing Sertoli cells in STf samples was lowest during periods when spermatogenesis was complete, although the total number of Sertoli cells per testis remained constant through the annual reproductive cycle regardless of the changes in spermatogenic activity. In addition, the profile of vimentin concentrations recorded during development and the annual

reproductive cycle were similar to the variations detected in the expression of the 108-kDa HSL isoform. Therefore, the variations recorded herein in 108-kDa HSL protein levels are concomitant with the variations in the proportion of Sertoli cells relative to the germ cell population, suggesting that the 108-kDa HSL isoform resides chiefly within Sertoli cells. Western blot analyses showed the presence of a 104-kDa HSL immunoreactive band in mink epididymal spermatozoa. Moreover, the present immunohistochemical studies show the localization of HSL to mink spermatids and confirm other immunohistochemical [11, 24] and *in situ* hybridization studies [25], suggesting together that haploid germ cells contribute most to the content of the 104-kDa isoform in the STf.

The finding that HSL accumulated near the base of the mink Sertoli cells following the release of mature spermatozoa and the accumulation of residual bodies and the observation that HSL labeling decreased in the tubules coincidentally with the appearance of diplotene spermatocytes (present paper and [11]) suggest an active participation of Sertoli cells in the removal of residual body-borne lipids and a particular chronology in the action of the enzyme during spermatogenesis. Distinct HSL isoforms could be synthesized within the tubules in response to specific phases of the germ cells' development, favoring meiosis at one time and, at other times, the shaping of the acrosome or the acquisition by the spermatozoa of cholesterol levels that are consistent with fertility. The observation that HSL localizes to the equatorial segment of mink epididymal spermatozoa and the finding that the enzyme is active in the male gamete add support to the notion that the enzyme plays a role in spermatozoa-oocyte interaction. The acquisition of motility and fertility has been associated with changes in cholesterol content of the male gametes during the epididymal transit [26] and capacitation [27], and inadequate levels of cholesterol have been reported in infertile human spermatozoa [28].

The activity of HSL in the STf varied during development and the annual reproductive cycle. The finding here that, in the STf, FC and EC levels were inversely related to the number of germ cells hints to a close relationship between the metabolism of cholesterol and the spermatogenic activity. In addition, the strong positive correlation of HSL activity with FC/EC ratios but not with TG in STf suggests a distinct substrate preference for testicular HSL and, furthermore, that HSL may be the only cholesterol esterase in the testis. The results are consistent with the report that HSL $-/-$ knockout mice possess no cholesterol esterase activity but showed residual triglyceride lipase activity in the testis [2]. The present finding that FC/EC ratios in tubules were roughly twice those in the interstitial tissue together with the observation that HSL-specific activity was about 2-fold higher in the latter than in the former implies a regulation of the enzyme expression and activity that is

FIG. 6. Immunolocalization of HSL in pubertal and adult testes harvested in February. a) A lumen was not yet present in the 115-day-old mink tubules. HSL immunoreactivity was localized (arrows) to Sertoli cell cytoplasmic processes surrounding young germ cells (g). The stages of the cycle of the seminiferous epithelium are indicated by roman numerals at the top of the figures (b-f). HSL was detected in the elongated spermatids (open arrows) and Sertoli cells (closed arrows). HSL was abundant near the base of the tubules during stage X of the cycle (f). Within the interstitial tissue, HSL immunoreactivity was detected in the cells of the endothelium of the blood capillaries (closed curved arrow) and in some interstitial cells (open curved arrow) (d).



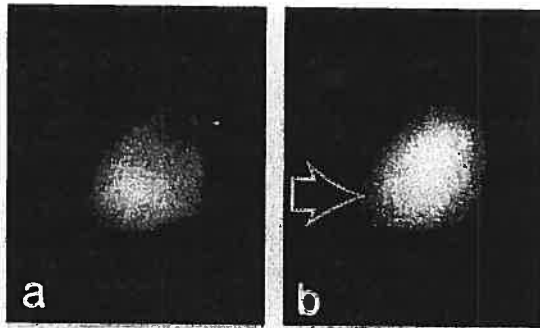


FIG. 7. Immunofluorescence studies of HSL in testicular macrophages. A testicular macrophage-enriched fraction was cultured and double labeled (a) with the macrophage marker NCL-MACRO and (b) with anti-HSL. Only NCL-MACRO-labeled cells in the cultures were HSL positive. HSL immunoreactivity showed the typical HSL-positive dots (arrow) ($\times 698$).

typical in each compartment of the testis. The observation that pathological, experimental, and seasonal arrest of spermatogenesis were all reported to be generally accompanied with an increase in lipid droplets [29–31] reinforces the notion of a close relationship between lipid metabolism and germ cell development.

Interstitial Compartment

The present immunohistochemical and fluorescence microscopy studies showed that, within the interstitial tissue, HSL localized to macrophages and endothelial cells of the blood vessels but not to Leydig cells. The lack of staining for HSL in Leydig cells is in agreement with the report that Leydig cells do not contain HSL mRNA [32]. The observation that HSL was immunolocalized to mink testicular macrophages within the interstitial tissue is in agreement with the reports of HSL protein and mRNA in macrophages from murine origin and in macrophage-like cell lines [33–35] and with the observation of HSL mRNA in macrophages from human origin [36]. However, these findings contrast with those that showed undetectable HSL mRNA in mature human monocyte-derived macrophages [37, 38]. The number of macrophages/unit area of testicular interstitium has been shown to increase significantly during puberty [39, 40], but this expansion is due largely to local proliferation rather than originating from monocytes in the peripheral circulation [41]. Thus, the variance in the source of macrophages and in the differentiation state may account for the discrepancies mentioned above in the detection of HSL in macrophages. Furthermore, that the highest total cholesterol levels corresponded to low HSL expression and activity in the mink testicular interstitial tissue is in agreement with the report that HSL protein expression and enzymatic activity are down-regulated by accumulation of cholesterol esters in the mouse macrophage cell line J774.2 [42]. Macrophages constitute a relatively important proportion of the cells in the interstitial tissue in the adult testis [43, 44]. There are abundant direct contacts of macrophages with Leydig cells [45]. Experimental or genetic elimination of macrophages from the testis causes a decrease in testosterone production and a reduction of fertility [46, 47]. Testicular macrophages possess 25-hydroxylase mRNA and convert ^{14}C -cholesterol to ^{14}C -25-hydroxycholesterol [48]. 25-Hydroxycholesterol is used for testosterone synthesis when administered to the testis of macrophage-depleted animals [49]. Testicular macrophages synthesize the 25-hy-

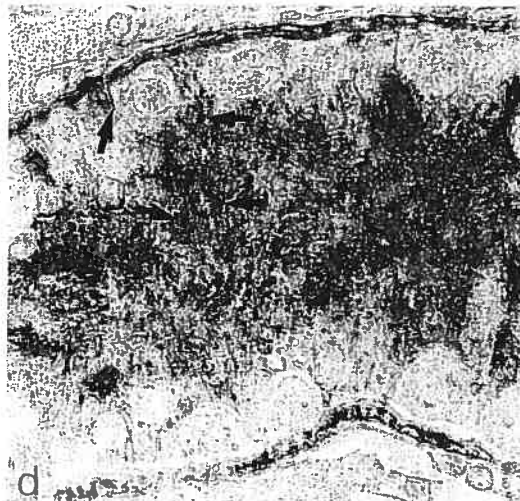
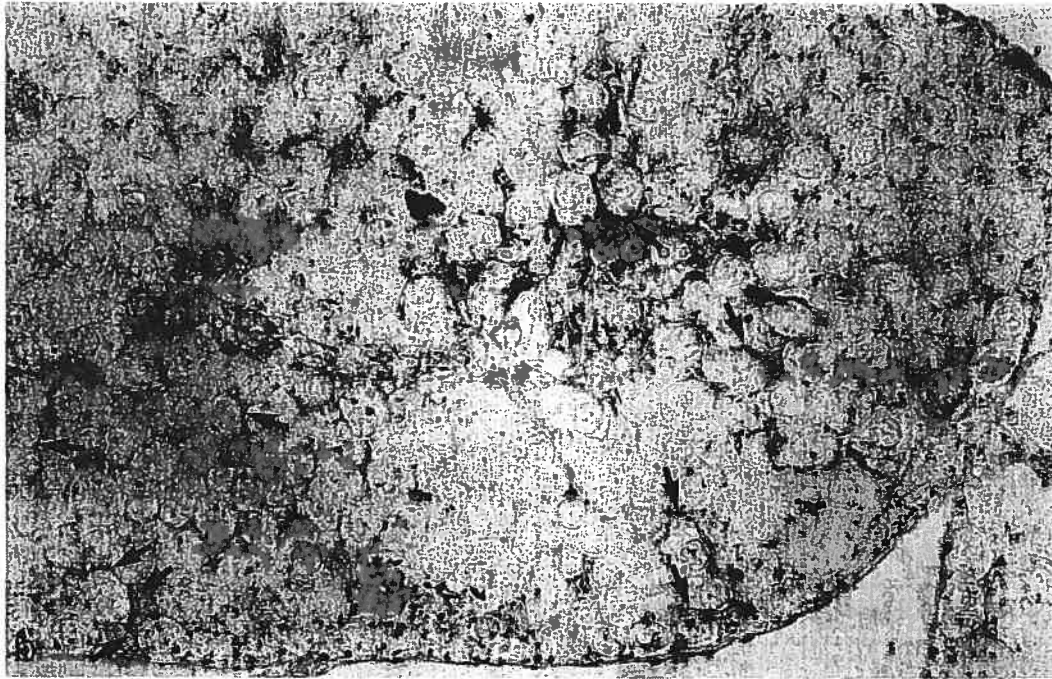
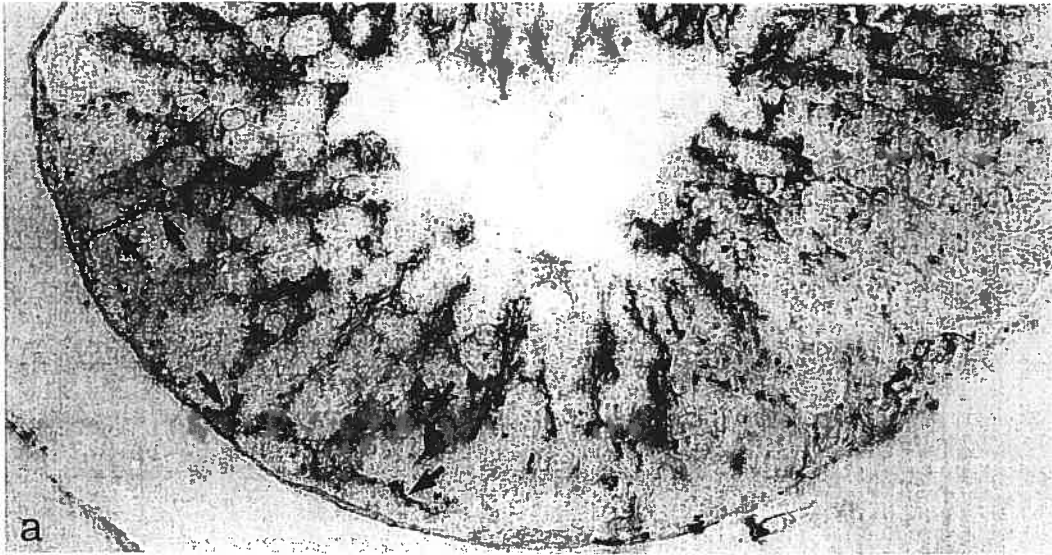
droxycholesterol that is converted to testosterone by Leydig cells [50]. The present work shows that serum testosterone concentrations correlate with increased HSL activity and protein levels in the ITf. Taken together, these observations provide strong support to the notion of close cooperation between Leydig cells and macrophages in the synthesis of steroid hormones in the testis. Macrophage HSL will free cholesterol from esterified cholesterol to be converted into 25-hydroxycholesterol taken up by Leydig cells to synthesize testosterone.

In addition, testicular macrophages have been suggested to help remove lipofuscin from Leydig cells in pinnipeds [51] and bats [52] during testicular regression in preparation for a recrudescence of steroidogenic activity, and this could explain the increase in interstitial tissue HSL protein and enzymatic activity during May–June. Interstitial macrophages may be part of a system that would be involved in the recycling of sterols in the interstitial tissue, whereas in the tubules, recycling could be ensured by Sertoli cells. In the interstitium, cholesterol has been localized in Leydig cells and macrophages [53] and the contribution of 25-hydroxycholesterol to Leydig cells by macrophages has been shown [48]. In the tubules, cholesterol has been localized to germ cells [54] and to lysosomes in Sertoli cells [11]; moreover, transfer of sterols from germ cells to Sertoli cells has been documented [53].

Relationship of Testicular HSL to Serum Pituitary Hormone Concentrations

HSL and cholesterol ester hydrolase have been shown to be identical proteins hydrolyzing cholesterol esters and triglycerides, depending on the tissue [55]. In the adipose tissue, lipolytic and antilipolytic hormones reportedly regulate HSL activity via reversible HSL protein phosphorylation mediated by the cAMP-dependent protein kinase (PKA) [56]. Activation of HSL by cAMP-dependent phosphorylation leads to the translocation of the enzyme from the cytoplasm to the surface of the lipid storage droplets in adipocytes [57, 58]. FSH regulates steroid synthesis in Sertoli cells via cAMP and PKA [59]. FSH could contribute to the regulation of cholesterol levels within the tubules via cAMP-mediated HSL phosphorylation and thus to the activation of the enzyme in Sertoli cells. The serum FSH profiles provided herein, which are consistent with those reported elsewhere [10, 60, 61], show that high serum FSH levels were concomitant with high HSL activity in the STf, suggesting a possible relationship between the two parameters. The report that cholesterol hydrolase can be restored to normal levels following FSH injection in hypophysectomized rats [62] provides additional support to this notion. The cAMP-dependent transduction pathway may also be involved in the modulation of HSL protein expression in the tubules. The expression of the cAMP-responsive element-binding protein and the cAMP-responsive element

FIG. 8. Immunolocalization of HSL during testicular regression. a and b both show tubules in April, one tubule with a lumen (a), the other with a collapsed lumen (b). HSL labeling (arrows) is abundant in Sertoli cell cytoplasmic processes surrounding all classes of germ cells, including the young ones lying next to the limiting membrane of the tubules (a and b). c) HSL-positive dots are identified (arrows) within the thin Sertoli cell cytoplasmic processes that surround the spermatocytes and spermatogonia still remaining in this tubule taken from a testis harvested in June. In tubules from testes harvested in August, labeling (arrows) was confined to Sertoli cells (d) ($\times 780$).



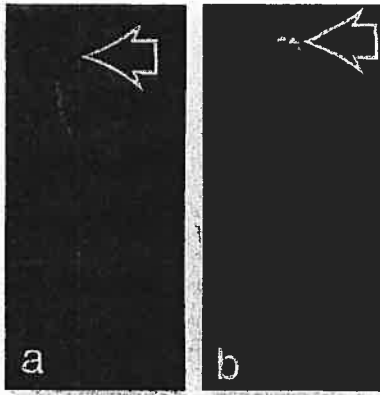


FIG. 9. Immunofluorescence localization of HSL in epididymal spermatozoa. Controls done with preimmune serum occasionally showed a weak staining in the mitochondrial sheath of the tail (a, open arrowhead). HSL was localized to the posterior acrosomal segment and particularly to the equatorial segment of the acrosome where the labeling was distributed as a pair of eyebrows (b, arrows) ($\times 780$).

modulator in germ cells and Sertoli cells is correlated with the fluctuation in cAMP signaling induced by FSH [63]. Increased expression of the transcription factor may boost HSL expression in Sertoli cells. This hypothesis is consistent with our finding of increased HSL protein levels in the STf during the active spermatogenic phase, which is characterized by high serum FSH concentrations. LH regulates steroid synthesis in Leydig cells also via cAMP-PKA [59]. However, the present data show a relationship between LH serum levels and HSL activity in the ITf that is not clear-cut. This could be due to the fact that LH acts on Leydig cells whereas interstitial HSL is localized to macrophages. In the present study, HSL activity in ITf was inversely correlated with serum prolactin levels. Macrophages possess prolactin receptors [64]. Prolactin has been shown to modulate proliferation and phagocytic activity in macrophages [65, 66]. The increase in prolactin secretion in spring may cause macrophages to reduce HSL protein expression and

activity in the interstitium, and this in turn may be one of the causes that would decrease testosterone synthesis by Leydig cells. The report that prolactin induces accumulation of cholesterol esters in response to LH stimulation [67] and the observation that prolactin inhibition of testosterone production involves interstitial cells other than Leydig cells in the rat [68] are in agreement with this hypothesis.

Summary and Conclusion

The finding of a differential HSL protein expression and enzymatic activity in the interstitial tissue and seminiferous tubules entails distinct cholesterol regulatory mechanisms in individual compartments of the testis. This assumption is further supported by the finding that the peak in FC/EC ratios appeared 1 mo later in the interstitial tissue than it did in the tubules. The finding of a strong correlation of the FC/EC ratios with HSL activity in the tubules adds support to the notion of a distinctive substrate preference for testicular HSL and to the concept that HSL may be the only cholesterol esterase in this location.

ACKNOWLEDGMENTS

The cholesterol measurements performed in this study could not have been done without the kind and generous help of Dr. J. Davignon and Dr. S. Lussier-Cacan of the Institute of Clinical Research of Montreal, to whom we express here our deepest gratitude. We also thank them for allowing us the use of their gas-liquid chromatograph. Lucie Boulet is thankfully acknowledged for her superb technical assistance in the FC and EC measurements. Serum hormone quantification studies could not have been done without the generous gift of hormones and antisera to pituitary hormones by Dr. A.F. Parlow (National Hormone and Pituitary Program of the National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA). We thank Dr. L. Gaboury (Département de pathologie biologique cellulaire, Université de Montréal) for providing us with the human adipose tissue. The authors are particularly grateful to Dr. U. Maag from the Department of Mathematics and Statistics of the Université de Montréal for his generous contribution of the statistical data to this study. The authors are thankful to Dr. James C. Hutson from Texas Tech University, Health Science Center, Department of Biochemistry and Cell Biology, for fruitful discussions on the role of testicular macrophages during the course of this study. The technical assistance of

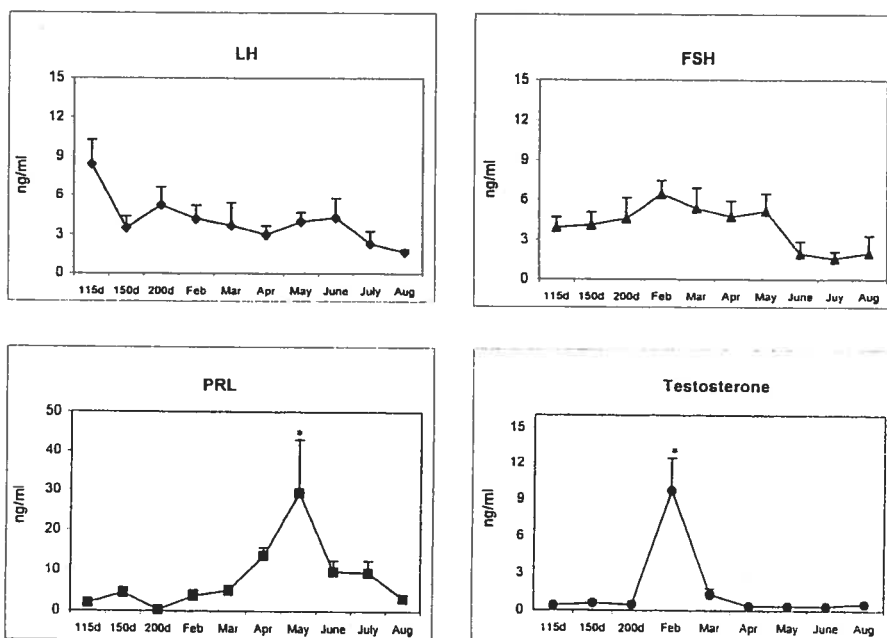


FIG. 10. Serum LH, FSH, prolactin, and testosterone profiles during development and in adulthood during the annual reproductive cycle. Serum LH (\blacklozenge), FSH (\blacktriangle), prolactin (\blacksquare), and testosterone (\bullet) levels are expressed as ng hormone/ml. Values shown are the mean \pm SEM of five independent experiments. Serum LH levels were high in the 115-day-old mink ($P < 0.05$) and decreased thereafter. During the annual reproductive cycle, LH serum levels showed a decreasing trend toward the end of testicular regression and the beginning of the next spermatogenic phase. Serum FSH levels showed an increasing trend coincidentally with adulthood in February. In the adult, serum FSH levels were high from February to May whereas they were lowered from June to August. Serum prolactin levels were low during development. In the adult, they were low during the active spermatogenic phase and increased significantly in May ($*P < 0.05$). There was a sharp and significant decrease in serum testosterone levels in February ($*P < 0.05$).

C.D. Akpovi for the isolation of testicular macrophages is thankfully acknowledged.

REFERENCES

- Holm C, Østerlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr* 2000; 20:365-393.
- Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kreamer FB, Tsutsumi O, Yamada N. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:787-792.
- Wang SP, Laurin N, Himmis-Hagen J, Rudnicki MA, Levy E, Robert MF, Pan LH, Oligny L, Mitchell GA. The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obesity Res* 2001; 9: 119-128.
- Chung S, Wang SP, Pan L, Mitchell GA, Trasler JM, Hermo L. Infertility and testicular defects in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Endocrinology* 2001; 142:4272-4281.
- Strauss JG, Frank S, Kratky D, Hammerle G, Hrzenjak A, Knipping G, von Eckardstein A, Kostner GM, Zechner R. Adenovirus-mediated rescue of lipoprotein lipase-deficient mice—lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins is essential for high density lipoprotein maturation in mice. *J Biol Chem* 2001; 276:36083-36090.
- Bartke A, Musto N, Caldwell BV, Behrman HR. Effects of a cholesterol esterase inhibitor and of prostaglandin F_{2α} on testis cholesterol and on plasma testosterone in mice. *Prostaglandins* 1973; 3:97-104.
- Wiebe JP, Tilbe KS. De novo synthesis of steroids (from acetate) by isolated rat Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 89: 1107-1113.
- Pelletier R-M. Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*): a seasonal breeder. *Am J Anat* 1986; 175:91-117.
- Pelletier R-M. Cyclic modulation of the Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *Am J Anat* 1988; 183:68-102.
- Boissin-Agasse L, Boissin J. Incidence of a circadian cycle of photosensitivity in the regulation of the annual testis cycle in the mink: a short-day mammal. *Gen Comp Endocrinol* 1985; 30:117-127.
- Kabbaj O, Holm C, Vitale ML, Pelletier R-M. Expression, activity and subcellular localization of testicular hormone-sensitive lipase (HSL) during postnatal development in the guinea pig. *Biol Reprod* 2001; 65:601-612.
- Herrada G, Wolgemuth DJ. The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. *J Cell Sci* 1997; 110:1543-1553.
- Hutson JC. Testicular macrophages. *Int Rev Cytol* 1994; 149:99-143.
- Østerlund T, Danielsson B, Degerman E, Contreras JA, Edren G, Davis RC, Schotz MC, Holm C. Domain-structure analysis of recombinant rat hormone-sensitive lipase. *Biochem J* 1996; 319:411-420.
- Nguyen B, Carbajal ME, Vitale ML. Intracellular mechanisms involved in dopamine-induced actin cytoskeleton organization and maintenance of a round phenotype in cultured rat lactotrope cells. *Endocrinology* 1999; 140:3467-3477.
- Holm C, Østerlund T. Hormone-sensitive lipase and neutral cholesteryl ester lipase. In: Doolittle MH, Reue K (eds.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 109. Lipase and Phospholipase Protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 1999: 109-121.
- Oram JF. Receptor-mediated transport of cholesterol between cultured cells and high-density lipoproteins. In: Albers JJ, Segrest JP (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 129. London: Academic Press; 1986: 645-659.
- Brown MS, Faust JR, Goldstein JL. Role of the low density lipoprotein receptor in regulating the content of free and esterified cholesterol in human fibroblasts. *J Clin Invest* 1975; 55:783-793.
- Rose J, Kennedy M, Johnston B, Foster W. Serum prolactin and dehydroepiandrosterone concentrations during the summer and winter hair growth cycles of mink (*Mustela vison*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1998; 121:263-271.
- Murphy BD. Female reproductive system. In: Hunter DB, Lemieux N (eds.), *Mink biology, health and disease*. Guelph, ON, Canada: Graphic and Print Services, University of Guelph; 1996: 9-1-9-19.
- Franz HR, Ellis LC. Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the mink (*Mustela vison*). *Norwegian J Agric Sci* 2001, Suppl 9:122-127.
- Holm C, Belfrage P, Fredrikson G. Immunological evidence for the presence of hormone-sensitive lipase in rat tissues other than adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148:99-105.
- Kraemer FB, Tavangar K, Hoffman AR. Developmental regulation of hormone-sensitive lipase mRNA in the rat: changes in steroidogenic tissues. *J Lipids Res* 1991; 32:1303-1310.
- Blaise R, Guillaudoux T, Tavernier G, Daegelen D, Evrard B, Mairal A, Holm C, Jégou B, Langin D. Testis hormone-sensitive lipase expression in spermatids is governed by a short promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001; 276:5109-5115.
- Holst LS, Langin D, Mulder H, Laurell H, Grober J, Bergh A, Mohrenweiser HW, Edgren G, Holm C. Molecular cloning, genomic organization, and expression of a testicular isoform of hormone-sensitive lipase. *Genomics* 1996; 35:441-447.
- Haidl G, Opper C. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Human Reprod* 1997; 12:2720-2723.
- Go KJ, Wolf D. The role of sterols in sperm capacitation. *Adv Lipid Res* 1983; 20:317-330.
- Sugkraroek P, Kates M, Leader A, Tanphaichitr N. Level of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. *Fertil Steril* 1991; 55:820-827.
- Gravis CJ, Weaker FJ. Testicular involution following optic enucleation. An ultrastructural and cytochemical study. *Cell Tissue Res* 1977; 184:67-77.
- Hodgson YM, Irby DC, Keer JB, de Kretser DM. Studies of the structure and function of the Sertoli cell in a seasonally breeding rodent. *Biol Reprod* 1979; 21:1091-1098.
- Ghosh S, Bartke A, Grasso P, Reichert L, Russell LD. Structural response of the hamster Sertoli cell to hypophysectomy: a correlative morphometric and endocrine study. *Anat Rec* 1992; 234:513-529.
- Holts LS, Hoffmann AM, Mulder H, Sundler F, Holm C, Bergh A, Fredrickson G. Localization of hormone-sensitive lipase to rat Sertoli cells and expression in developing and degenerating testis. *FEBS Lett* 1994; 355:125-130.
- Small CA, Goodacre JA, Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase is responsible for neutral cholesterol ester hydrolase activity in macrophages. *FEBS Lett* 1989; 247:205-208.
- Contreras JA, Holm C, Martin A, Gaspar ML, Lasuncion MA. Presence of hormone-sensitive lipase mRNA in J774 macrophages. *Isr J Med Sci* 1994; 30:778-781.
- Khoo JC, Reue K, Steinberg D, Schotz MC. Expression of hormone-sensitive lipase mRNA in macrophages. *J Lipid Res* 1993; 34:1969-1974.
- Reue K. Evidence for hormone-sensitive lipase mRNA expression in human monocyte/macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 17:2287-2292.
- Contreras JA, Lasuncion MA. Essential differences in cholesteryl ester metabolism between human monocyte-derived and J774 macrophages. Evidence against the presence of hormone-sensitive lipase in human macrophages. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:443-452.
- Li F, Hui DY. Modified low density lipoprotein enhances the secretion of bile salt-stimulated cholesterol esterase by human monocyte-macrophages. Species-specific difference in macrophage cholesteryl ester hydrolase. *J Biol Chem* 1997; 272:28666-28671.
- Hutson JC. Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biol Reprod* 1990; 43:885-890.
- Vergouwen RPF, Jacobs SGPM, Huiskamp R, Davids JAG, de Rooij DG. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during development in mice. *J Reprod Fertil* 1991; 93:233-243.
- Raburn DJ, Coquelin A, Reinhart AJ, Hutson JC. Regulation of the macrophage population in the postnatal rat testis. *J Reprod Fertil* 1993; 24:139-151.
- Jepson CA, Harrison JA, Kraemer FB, Yeaman SJ. Down-regulation of hormone-sensitive lipase in sterol ester-laden J774.2 macrophages. *Biochem J* 1996; 318:173-177.
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 1973; 9:500-532.
- Wing TY, Lin HS. The fine structure of testicular interstitial cells in the adult golden hamster with special reference to seasonal changes. *Cell Tissue Res* 1977; 183:385-393.
- Hutson JC. Development of digitations between Leydig cells and macrophages. *Cell Tissue Res* 1992; 267:385-389.
- Bergh A, Damber J-E, van Rooijen N. Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages. *J Endocrinol* 1986; 136:407-413.

47. Cohen PE, Chisholm O, Arceci RJ, Stanley ER, Pollard JW. Absence of colony-stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmop/csfp) mice results in male fertility defects. *Biol Reprod* 1996; 55:310-317.
48. Lukyanenko YO, Chen J-J, Hutson JC. Production of 25-hydroxycholesterol by testicular macrophages and its effects on Leydig cells. *Biol Reprod* 2001; 64:790-796.
49. Hutson JC, Carpenter AM, Hardy DM, Lukyanenko YO. Physiological relevance of macrophage-Leydig cell interactions. *Biol Reprod* 1999; 60 (suppl):170(abstract 246).
50. Nes WD, Lukyanenko YO, Jia ZH, Quideau S, Howald WN, Pratum TK, West RR, Hutson JC. Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology* 2001; 141:953-958.
51. Sinha AA, Erickson AW, Seal US. Fine structure of Leydig cells in crabeater, leopard and Ross seal. *J Reprod Fertil* 1977; 49:51-54.
52. Gustafson AW. Changes in Leydig cell activity during the annual testicular cycle of the bat *Myotis lucifugus lucifugus*: histology and histochemistry. *Aim J Anat* 1987; 178:312-322.
53. Pelletier R-M, Vitale ML. Filipin vs enzymatic localization of cholesterol in guinea pig, mink, and mallard duck testicular cells. *J Histochem Cytochem* 1994; 42:1539-1554.
54. Pelletier R-M, Friend DS. Development of membrane differentiations in the guinea pig spermatid during spermiogenesis. *Am J Anat* 1983; 167:119-141.
55. Cook KG, Yeaman SJ, Strasfros P, Belfrage P. Direct evidence that cholesteryl ester hydrolase from adrenal cortex is the same enzyme as hormone-sensitive lipase from adipose tissue. *Eur J Biochem* 1982; 125:245-249.
56. Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase—a multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1052:128-132.
57. Egan JJ, Greengard AS, Chang M-K, Wek SA, Moos MC, Londos C. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:8537-8541.
58. Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 2000; 275:5011-5015.
59. Hansson V, Shalhegg BS, Tasken K. Cyclic-AMP-dependent kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 73:81-92.
60. Sundqvist C, Ellis LC, Bartke A. Reproductive endocrinology of the mink (*Mustela vison*). *Endocr Rev* 1988; 9:247-266.
61. Martinet L, Mondain-Monval M, Monnerie R. Endogenous circannual rhythms and photorefractoriness of testis activity, moult and prolactin concentrations in mink (*Mustela vison*). *J Reprod Fertil* 1992; 95:325-338.
62. Durham LA, McLean Grogan W. Characterization of multiple forms of cholesteryl ester hydrolase in the rat testis. *J Biol Chem* 1984; 259:7433-7438.
63. Walker WH, Habener JF. Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends Endocrin Metabol* 1996; 7:133-138.
64. Demoraes MCL, Touraine P, Gagnerault MC, Savino W, Kelly PA, Dardenne M. Prolactin receptors and the immune system. *Ann Endocrinol (Paris)* 1995; 56:567-570.
65. Dombrowicz D, Sente B, Reiter E, Closset J, Hennen G. Control of proliferation and differentiation of Leydig cells and their putative precursors in immature hypophysectomized rat testis. *J Androl* 1996; 17:639-650.
66. Gaytan F, Romero JL, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E. Effects of growth hormone and prolactin on testicular macrophages in long-term hypophysectomized rats. *J Reprod Immunol* 1994; 27:73-84.
67. Bartke A. Effect of prolactin and luteinizing hormone on cholesterol stores in the mouse testis. *J Endocrinol* 1971; 49:317-324.
68. Huang WJ, Yeh JY, Kan SF, Chang LS, Wang PS. Effects of hyperprolactinemia on testosterone production in rat Leydig cells. *J Cell Biochem* 2001; 80:313-320.

4.3 DISCUSSION

4.3.1 Variation du taux de la protéine et de l'activité de la HSL au cours du développement testiculaire chez le cobaye et le vison et chez le vison adulte au cours du cycle reproductif annuel

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de la HSL testiculaire. Nous avons établi la présence de la protéine de la HSL, mesuré son activité et déterminé la modulation de son expression et de son activité dans les STf et les ITf durant le développement testiculaire (chez le cobaye et chez le vison) ainsi que chez le vison adulte durant la régression testiculaire saisonnière.

Les masses moléculaires de la HSL que nous avons trouvées chez le cobaye (104-, 110- et 120-kDa) et le vison (104- et 108-kDa) étaient plus élevées que celle trouvée dans le tissu adipeux de la même espèce, que nous avons utilisé comme contrôle positif (90-kDa). Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études faites sur d'autres espèces, qui ont montré que la taille de l'ARNm et la masse moléculaire de la HSL dans les testicules étaient plus élevées que celles du tissu adipeux. Chez le rat, le testicule exprime un ARNm de 3,9 kb et une protéine de 130-kDa comparés à l'ARNm de 3,3 kb et la protéine de 84-kDa de la HSL exprimée dans le tissu adipeux (Holm et coll., 1987; Holm et coll., 1988; Stenson Holst et coll., 1996). Dans le testicule humain, l'ARNm de la HSL est de 3,9 kb, celui-ci est traduit en une protéine de 116-kDa, par contre dans le tissu adipeux humain, l'ARNm de la HSL est de 2,8 kb et il est traduit en une protéine de 88-kDa (Langin et coll., 1993; Stenson Holst et coll., 1996; Grober et coll., 1997). La différence dans les masses moléculaires entre la HSL exprimée dans le tissu adipeux et dans le testicule chez l'homme est due au fait que la HSL testiculaire contient 300 acides aminés de plus que la HSL des adipocytes (Stenson Holst et coll.,

1996). La HSL testiculaire est codée par un ADN qui contient un exon spécifique au testicule et neuf exons communs aux testicules et au tissu adipeux (Blaise et coll., 1999).

4.3.1.1 Variation du taux de la protéine et de l'activité de la HSL dans les STf et les ITf chez le cobaye

4.3.1.1.1 Variation du taux et de l'activité de la HSL dans les STf de cobaye

Nous avons détecté la présence de la protéine de 104-kDa de la HSL dans les STf durant la période néonatale, la puberté et la phase adulte. Ceci suggère que la présence de cette protéine dans les STf ne soit pas liée à la spermatogenèse. En revanche, l'augmentation du taux de la protéine de 104-kDa de la HSL durant le développement testiculaire serait en rapport avec le développement des cellules germinales puisque le taux de l'ARNm de la HSL augmente de 25 fois le niveau fœtal dans les testicules, cependant, ce taux reste constant dans le tissu adipeux durant le développement chez le rat (Kraemer et coll., 1991). Nous avons montré que l'augmentation du taux de la protéine de 104-kDa et de l'activité de la HSL se produit à 21 jours et chez l'adulte, ces périodes sont caractérisées par la présence de nombreux spermatocytes pachytène dans les tubules séminifères reflétant une activité méiotique intense. Le taux et l'activité de la HSL pourraient être modulés par la présence de ces types de cellules germinales. Plusieurs conditions qui provoquent l'arrêt de la spermatogenèse au stade spermatocytes pachytène s'accompagnent d'une accumulation de gouttelettes lipidiques dans la cellule de Sertoli (Johnson, 1970; Chung et Hamilton, 1975).

Durant le développement testiculaire, nous avons montré non seulement l'augmentation du taux de la protéine de 104-kDa mais aussi l'apparition des isoformes de 110- et de 120-kDa chez l'adulte. Nous avons détecté les bandes de 110- et de 120-kDa de la HSL seulement chez le cobaye adulte dans les STf mais pas dans les ITf. Des

études faites sur des homogénats de testicules entiers de rat ont montré que le testicule contenait des bandes de la HSL de masse moléculaire aux alentours de 110- et 120-kDa, ces bandes n'étaient détectées ni dans les autres tissus exprimant la HSL (Holm et coll., 1987; Kraemer et coll., 1993a) ni dans le testicule de rat prépubère (Kraemer et coll., 1993a). Ces bandes étaient typiques de l'adulte, mais notre étude a montré pour la première fois que ces bandes de la HSL étaient présentes dans les STf et les Spz mais pas dans le ITf. Les différentes formes immunoréactives que nous avons observées dans les STf de l'adulte seraient des isoformes de la HSL et non le produit d'une modification par phosphorylation (Holm et coll., 1987). La protéine de 120-kDa que nous avons détectée dans le Spz et les STf de l'adulte pourrait être exprimée par les cellules germinales et plus précisément par les spermatides. Une étude a montré chez l'homme, que les cellules germinales haploïdes exprimaient un ARNm de 3,9 kb alors que les cellules de Sertoli, les cellules germinales diploïdes et les cellules du tissu interstitiel exprimaient un ARNm de 3,3 kb (Mairal et coll., 2002).

4.3.1.1.2 Présence de la HSL dans les lysosomes

Dans les STf de cobaye, nous avons montré qu'une partie de la protéine de 104-kDa de la HSL était contenue dans le cytosol et une autre dans les lysosomes. De plus, nous avons détecté les bandes de 110- et de 120-kDa dans les lysosomes. La HSL que nous avons trouvée dans les lysosomes des STf est probablement contenue dans les lysosomes des cellules de Sertoli parce que les cellules germinales, à l'exception du spermatide au stage 7, ne contiendraient pas de lysosomes (Hermo et coll., 1994). Le fait que nous ayons détecté la bande de 104-kDa et celle de 120-kDa dans les Spz et dans la fraction lysosomiale des STf de l'adulte suggère que la partie de la HSL dans les lysosomes proviendrait des corps résiduels libérés par les spermatides matures et de certaines cellules germinales apoptotiques phagocytées par la cellule de Sertoli. Blaise et coll. ont montré par immunolocalisation, que les corps résiduels libérés par les

spermatides matures contenaient un marquage très fort correspondant à la HSL chez la souris et le rat (Blaise et coll., 2001).

La partie de la HSL contenue dans les lysosomes (la protéine de 104-, 110- et 120-kDa) pourrait être inactive au pH acide lysosomal puisque cette enzyme a un pH optimum de 7 (Stralfors et coll., 1987). Ceci explique le taux relativement plus élevé que l'activité de la HSL chez le cobaye adulte, alors que le taux de la protéine de la HSL variait d'une façon parallèle à son activité jusqu'à l'âge de 21 jours après la naissance.

4.3.1.1.3 Variation du taux et de l'activité de la HSL dans les ITf de cobaye

Par immunohistochimie nous n'avons pas détecté la HSL dans les cellules de Leydig. Ces résultats sont en accord avec ceux de Stensen et coll. qui ont noté l'absence de l'ARNm de la HSL dans les cellules de Leydig (Stenson Holst et coll., 1994). En se basant sur nos résultats trouvés chez le vison, de la présence de la HSL dans les macrophages, la présence de la protéine de 104-kDa et l'activité de la HSL que nous avons rapportées dans les ITf de cobaye pourraient être en relation avec l'expression de la HSL par les macrophages et par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et non par les cellules de Leydig. Nous avons montré que l'activité de la HSL était corrélée au rapport CL/CE dans les ITf et à la concentration sérique de la testostérone durant le développement testiculaire. Dans les testicules, les macrophages contribuent à la synthèse de la testostérone puisque l'élimination expérimentale ou la réduction génétique des macrophages du tissu interstitiel cause la diminution de la production de la testostérone et une réduction de la fertilité (Bergh et coll., 1986; Cohen et coll., 1996). Les macrophages possèdent les enzymes nécessaires à la conversion du cholestérol en 25-hydroxycholestérol (Lukyanenko et coll., 2001), qui est converti, dans la mitochondrie de la cellule de Leydig, en pregnénolone puis en testostérone (Hutson et

coll., 1999; Nes et coll., 2000). La HSL des macrophages permettrait la libération du cholestérol, celui-ci sera converti en 25-hydroxycholesterol.

4.3.1.2 Variation du taux de la protéine et de l'activité de la HSL dans les STf et les ITf de vison

Chez le vison, nous avons noté la présence de deux isoformes de la HSL de 104- et de 108-kDa dans les STf et les ITf. Nos résultats montrent que l'expression des deux isoformes de la HSL variait différemment dans chaque compartiment testiculaire durant le développement testiculaire ainsi qu'au cours du cycle reproductif annuel. Dans les STf, le taux de la protéine de 104-kDa de la HSL augmentait avec l'apparition des cellules germinales durant le développement testiculaire. Nous avons détecté le taux maximal de cette protéine chez l'adulte quand les spermatides sont abondantes dans les tubules séminifères. Le taux de cette isoforme de la HSL diminuait avec la disparition progressive des spermatides et des spermatocytes qui se produit lors de la régression testiculaire. Les Spz expriment la protéine de 104-kDa, ce qui suggère que les spermatides matures pourraient contribuer à la bande de 104-kDa que nous avons observée dans les STf. Contrairement au taux de la protéine de 104-kDa qui augmentait d'une manière significative dans les STf et les ITf durant la phase active de la spermatogenèse par rapport au développement et à la régression testiculaires, celui de la protéine de 108-kDa diminuait fortement durant la phase active de la spermatogenèse dans les STf et les ITf où l'activité spermatogénétique est maximale. Dans les Spz de vison nous avons détecté la bande de 104-kDa de la HSL, par contre nous n'avons pas détecté la bande de 108-kDa. Nous avons remarqué que le taux de la vimentine, qui est un marqueur dans la cellule de Sertoli et qui n'est pas exprimé par les cellules germinales, diminuait fortement en février et mars par rapport aux autres âges étudiés. Le nombre total des cellules de Sertoli dans le testicule reste constant durant le cycle reproductif annuel. La diminution de l'intensité de la bande de la vimentine pourrait

s'expliquer du fait que la proportion de cellules de Sertoli dans les échantillons de février et mars pourrait être plus basse que dans les échantillons de la période de régression testiculaire dû à la présence de cellules germinales qui n'expriment pas la vimentine. Ceci explique la variation en sens inverse du taux de la vimentine et du nombre des cellules germinales présentes dans les tubules. Puisque la vimentine et la protéine de 108-kDa varient de la même manière dans les STf, ceci suppose que la protéine de 108-kDa pourrait être exprimée principalement dans la cellule de Sertoli. Contrairement au taux de la protéine de 104-kDa qui est maximal quand les spermatides sont présentes dans les tubules, le taux de la protéine de 108-kDa est plus élevé quand les spermatogonies et les spermatocytes sont présents indiquant que l'expression de chacune de ces isoformes est en relation avec les types de cellules germinales durant la spermatogenèse.

Dans les ITf, le taux de la protéine de 104-kDa et l'activité de la HSL augmentaient durant le développement testiculaire. Comme la HSL est exprimée par les macrophages et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et non par les cellules de Leydig, l'augmentation du taux et de l'activité de la HSL dans les ITf, pourrait être en relation avec le nombre de macrophage qui augmente significativement durant la puberté (Hutson, 1990). Le taux sérique de la testostérone était corrélé à l'activité de la HSL dans les ITf durant le développement et le cycle reproductif annuel. Il y aurait donc une relation entre la protéine de 104-kDa dans les ITf et la production de la testostérone par les cellules de Leydig. Cette relation serait par l'intermédiaire des macrophages qui collaborent avec les cellules de Leydig pour la synthèse de la testostérone, comme ce que nous avons expliqué plus haut.

En conclusion, nous avons montré que deux isoformes de la HSL étaient exprimées par des cellules testiculaires distinctes. Dans les STf, le taux de chaque isoforme est en relation avec le type de cellules germinales. Le taux d'expression de chacune de ces isoformes variait différemment dans les STf et les ITf. L'activité de la

HSL était plus importante dans les ITf que dans les STf durant le développement testiculaire et durant le cycle reproductif annuel. Ceci pourrait être expliqué par une régulation différente du taux d'expression des isoformes de la HSL et de l'activité de cette enzyme dans les ITf et dans les STf en relation avec les besoins différents en cholestérol dans chacun des deux compartiments testiculaires.

4.3.1.3 Activité de la HSL mesurée à 34 et 37 °C dans les STf et les ITf de cobaye et de vison

Dans cette étude, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre l'activité de la HSL dosée à 34°C et celle dosée à 37°C et ce aussi bien dans les STf que dans les ITf chez le cobaye et le vison. Une étude a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre l'activité de la HSL mesurée à 33°C et celle mesurée à 37°C chez le rat (Renston et coll., 1977). Par contre, d'autres auteurs ont rapporté l'existence de deux formes de la HSL, une forme stable à la température présente dans les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli et une forme sensible à la température présente dans la cellule de Sertoli, cette dernière forme serait inactive à 37°C et responsable de l'augmentation du taux du cholestérol estérifié lors de la cryptorchidie (Durham et Grogan, 1982; Durham et Grogan, 1984; Wee et Grogan, 1993). Il est possible que cette différence soit liée à l'espèce ; les oiseaux par exemple, ont les testicules contenus dans l'abdomen et leur HSL testiculaire resterait fonctionnelle à des températures de 43-44°C.

4.3.2 Rôle de la HSL testiculaire : relation avec le cholestérol et les triglycérides

Nous avons montré que la concentration du CE diminuait durant le développement testiculaire dans les STf et les ITf chez le cobaye et chez le vison. Ces

résultats sont en accord avec ceux rapportés dans une étude qui a montré que la concentration en cholestérol estérifié dans le testicule diminuait avec le développement testiculaire chez le lapin (Renston et coll., 1975). La diminution du CE était beaucoup plus importante que celle du CL ; de ce fait, le rapport CL/CE augmentait durant le développement testiculaire dans les STf et les ITf. Le rapport CL/CE variait de la même manière que l'activité de la HSL dans les STf et les ITf de cobaye et de vison. Ces résultats suggèrent que la diminution du taux du CE que nous avons observée dans les STf durant le développement testiculaire pourrait être due à son utilisation, après son hydrolyse par la HSL, dans la formation de membranes de cellules germinales qui se multiplient activement durant la puberté et la phase active de la spermatogenèse. En effet, durant la puberté, il y a apparition de nombreux spermatocytes pachytène dans les tubules. En plus, le diamètre des cellules germinales augmente entre les stages préleptotène et pachytène, ce qui nécessite la synthèse de nouvelles membranes cellulaires (Bellvé et coll., 1977). Ceci suggère que la HSL permette la régulation du rapport CL/CE en fonction de la production de cellules germinales. En effet les souris HSL^{-/-} sont stériles du fait qu'elles ne produisent presque pas de spermatozoïdes (Osuga et coll., 2000; Chung et coll., 2001) et ont une élévation du CE dans la cellule de Sertoli (Osuga et coll., 2000).

Dans les ITf, la concentration du CE diminuait d'une façon significative chez le cobaye à 21 jours après la naissance et chez le vison à 200 jours après la naissance. Le rapport CL/CE et l'activité de la HSL augmentaient durant la même période. Nous avons montré que le pic de la testostérone plasmatique se trouvait chez le cobaye adulte et chez le vison adulte au mois de février. L'augmentation du rapport CL/CE et de l'activité de la HSL, ainsi que la chute du taux du CE chez l'adulte pourraient être dues à l'utilisation de ce dernier pour la production de la testostérone après son hydrolyse par la HSL. Chez le vison adulte, en régression testiculaire, la disparition progressive de spermatides et de spermatocytes était accompagnée d'une augmentation du taux du CE, dans les STf et les ITf, avec une diminution du rapport CL/CE et de l'activité de la HSL, ce qui correspond

à la diminution de l'activité spermatogénétique et à la diminution de la production de la testostérone durant cette période inactive de la spermatogenèse.

Durant le développement testiculaire de vison, nous avons remarqué que la diminution marquée du taux du CE dans les STf était observée au début de la spermatogenèse alors que dans les ITf cette diminution se produisait à la fin de la puberté, ce qui suggère que la régulation de la HSL soit différente dans les deux compartiments testiculaires en fonction de leur besoin respectif en cholestérol libre, à savoir la multiplication active des cellules germinales durant la puberté et la production de la testostérone dont le pic se trouve chez l'adulte.

Contrairement au rapport CL/CE, nous avons montré que le taux des TG variait d'une manière très différente à celui de l'activité de la HSL dans les STf et les ITf malgré que les triglycérides représentent une réserve d'énergie qui puisse être utilisée par les cellules testiculaires (Davis et coll., 1966). Nos résultats suggèrent que la HSL testiculaire agirait plutôt sur le cholestérol estérifié que sur les triglycérides. Ce qui est en accord avec le fait que les souris HSL^{-/-} ne possèdent pas d'activité de cholestérol ester hydrolase mais possèdent une activité résiduelle de triglycéride lipase (Osuga et coll., 2000). Toutes ces constatations indiquent que la HSL joue un rôle dans la mobilisation du cholestérol durant la spermatogenèse.

En conclusion, dans le testicule, la HSL agit sur le cholestérol plutôt que sur les triglycérides. La HSL permet une modulation différente de l'estérification/hydrolyse du cholestérol dans les tubules séminifères et dans le tissu interstitiel en fonction du besoin en cholestérol spécifique à chaque compartiment testiculaire.

4.3.3 Localisation de la HSL dans le testicule et dans les canaux excréteurs

Nous avons localisé la HSL dans les cellules de Sertoli chez le cobaye et le vison aux différents âges étudiés. En plus, nos résultats ont montré que l'expression de la HSL dans la cellule de Sertoli de l'adulte variait avec les stages du cycle chez le cobaye et chez le vison. D'autres études ont montré que le taux de l'ARNm et la protéine de la HSL variaient avec les stages du cycle chez le rat (Stenson Holst et coll., 1994; Stenson Holst et coll., 1996). L'expression de la HSL dans les tubules était plus importante durant le stage X c'est-à-dire deux stages après la libération des spermatozoïdes matures dans la lumière des tubules séminifères chez le cobaye et chez le vison. La HSL s'accumulait à la base de la cellule de Sertoli dans les stages qui suivent la libération des spermatozoïdes matures. Des études ont montré que le nombre et la taille des gouttelettes lipidiques dans la cellule de Sertoli variaient aussi en fonction des stages du cycle de l'épithélium séminifère chez plusieurs espèces, tel que le rat (Kerr et De Kretser, 1975), la souris (Dietert, 1966), le vison (Onstad, 1967) et l'homme (Paniagua et coll., 1987). Le maximum de gouttelettes lipidiques se trouvait après la libération de spermatozoïdes matures (Lacy, 1967; Lacy et Pettitt, 1970; Kerr et De Kretser, 1975). Les gouttelettes lipidiques s'accumulent aussi à la base de la cellule de Sertoli durant les stages du cycle qui suivent la libération de spermatozoïdes matures (Niemi et Kormano, 1965; Kerr et De Kretser, 1975). La variation du taux et la distribution de la HSL en fonction des stages du cycle de l'épithélium séminifère chez le cobaye et chez le vison, semble suivre la variation du nombre et la distribution des gouttelettes lipidiques. Cette enzyme jouerait un rôle dans la mobilisation du cholestérol contenu dans les gouttelettes lipidiques et dans le maintien d'un taux optimum du rapport CL/CE nécessaire au besoin de chaque stage du cycle en cholestérol libre.

Par immunohistochimie, nous avons détecté la HSL dans les spermatozoïdes de cobaye et de vison. Ce résultat est en accord avec d'autres données d'immunohistochimie (Stenson Holst et coll., 1996) et d'hybridation *in situ* (Stenson

Holst et coll., 1994) réalisées chez le rat, qui ont montré la présence de la HSL dans les spermatides allongées et les spermatozoïdes. L'ARNm de la HSL apparaît dans les spermatides rondes chez le rat (Stenson Holst et coll., 1996) et la souris (Blaise et coll., 1999). Le taux d'expression de la HSL dans les spermatides augmente durant la spermiogenèse (Mairal et coll., 2002). La HSL exprimée par les spermatides interviendrait dans la libération du cholestérol nécessaire aux transformations que subissent les spermatides durant la spermiogenèse.

La présence de la HSL dans les canaux excréteurs pourrait être en rapport avec le métabolisme du cholestérol dans ces tissus. L'épithélium des canaux excréteurs du testicule synthétise la testostérone (Robaire et Hermo, 1988). Cette enzyme pourrait jouer un rôle dans la maturation des Spz dans l'épididyme et/ou dans la synthèse de la testostérone par ces tissus.

4.3.4 La HSL dans les spermatozoïdes

Au cours de la maturation épидидymaire, les Spz subissent des changements dans leur membrane plasmique et en particulier une modification de leur contenu en cholestérol (Johnson, 1970; Parks et Hammerstedt, 1985; Hall et coll., 1991; Rana et coll., 1991). Le contenu en cholestérol de la membrane plasmique des Spz est un facteur déterminant de leur motilité et fertilité (Davis, 1980; Sugkraroek et coll., 1991; Haidl et Opper, 1997; Cross N.L., 1998). Nous avons détecté la HSL et mesuré une activité de cette enzyme dans les Spz épидидymaires de cobaye et de vison. Ceci suggère que la HSL pourrait intervenir dans la maturation épидидymaire des Spz en modulant le taux de libération du cholestérol nécessaire à leur maturation et à leur fertilité. Cette hypothèse est en accord avec le fait que les rares Spz trouvés dans l'épididyme des souris HSL^{-/-} n'étaient pas mobiles et n'étaient pas matures (Osuga et coll., 2000). De plus, les Spz humains anormaux ont un taux de cholestérol plus élevé que celui des Spz normaux

(Huacuja et coll., 1981). De même, une modification dans la proportion du cholestérol par rapport aux phospholipides des Spz a été identifiée comme une des multiples causes d'infertilité chez l'homme (Sugkaroek et coll., 1991). Par immunofluorescence, nous avons confirmé la présence de la HSL dans les Spz et déterminé que l'enzyme occupait le segment équatorial et l'acrosome. D'autres études ont montré que la HSL était présente dans les Spz de rat (Stenson Holst et coll., 1996) et de souris (Blaise et coll., 2001), mais notre étude a montré la localisation de la HSL dans le segment équatorial des Spz. Le fait que l'enzyme soit localisée à l'endroit du contact spermatozoïde-ovule et le fait que l'enzyme soit active dans les Spz épидидymaires suggèrent que cette enzyme jouerait un rôle dans l'interaction des gamètes.

4.3.5 Relation du taux de la protéine et de l'activité de la HSL avec les variations des hormones (LH, FSH, testostérone et PRL)

4.3.5.1 La LH

Le profil de la LH trouvé chez le vison était en accord avec celui trouvé par d'autres études sur la même espèce (Martinet et coll., 1992; Caillol et coll., 1995). Nos résultats ont montré que la relation entre le taux sérique de la LH et la HSL dans le tissu interstitiel n'était pas claire, ce qui peut être dû au fait que la LH agit sur les cellules de Leydig alors que la HSL du tissu interstitiel est localisée dans les macrophages. D'un autre côté, comme nous avons montré la présence de deux isoformes de la HSL de 104- et de 108-kDa dans les ITf, il est possible que l'effet de la LH soit différent sur chacune de ces deux isoformes de la HSL. De même, le traitement de rats immatures par l'hCG entraîne une augmentation de l'activité de la HSL dans le testicule, mais l'effet de l'hCG sur l'activité de chacune des trois isoformes détectées chez ces rats était différent, ce qui suggère que les isoformes de la HSL seraient régulées par des mécanismes différents (Kraemer et coll., 1993a).

4.3.5.2 La FSH

Nous avons montré que le taux le plus élevé de la FSH dans le sérum coïncidait avec le taux et l'activité les plus élevés de la HSL dans les STf de vison. Dans la cellule de Sertoli, la FSH est le principal régulateur du taux de l'AMPc (Griswold, 1993). Comme la HSL est contrôlée par les hormones qui agissent par le truchement de l'AMPc dans le tissu adipeux (Hardie et coll., 1989; Yeaman, 1990), l'activité de la HSL dans la cellule de Sertoli pourrait être régulée par la FSH. Comme la voie dépendante de l'AMPc peut contrôler aussi la synthèse de certaines protéines par phosphorylation de leurs facteurs de transcription (Griswold, 1993), la FSH pourrait être un régulateur de l'expression de la HSL dans la cellule de Sertoli. De même, Durham et Grogan en 1984 ont montré que la FSH était nécessaire à l'expression de la HSL dans la cellule de Sertoli (Durham et Grogan, 1984).

4.3.5.3 La testostérone

Le profil de la testostérone sérique que nous avons rapporté chez le vison était en accord avec celui trouvé par d'autres études sur la même espèce (Boissin-Agasse et Boissin, 1979; Sundqvist et coll., 1988; Caillol et coll., 1995). Des études ont montré que les macrophages testiculaires coopéraient avec les cellules de Leydig pour la synthèse de la testostérone (Lukyanenko et coll., 2001). Les macrophages testiculaires possèdent l'enzyme permettant la transformation du cholestérol en 25-hydroxycholestérol, celui-ci est converti en testostérone par la cellule de Leydig (Hutson et coll., 1999). Nous avons montré que la concentration sérique de la testostérone corrélait avec le taux et l'activité de la HSL dans les ITf chez le cobaye et chez le vison et que le pic de la testostérone chez l'adulte coïncidait avec la chute du taux du CE dans les ITf et avec l'augmentation de l'activité de la HSL. Dans le tissu interstitiel du

testicule c'est la HSL contenue dans des macrophages qui permettrait la libération du cholestérol qui sera converti en 25-hydroxycholestérol.

Dans les STf, nous avons montré que le taux le plus élevé de la testostérone qui se trouvait chez l'adulte correspondait aussi au taux le plus élevé du rapport CL/CE. Comme la testostérone est impliquée dans la modification de la transcription des gènes (Saez et coll., 1985; Mills, 1990), ceci suggère que la testostérone augmente l'expression de la HSL afin de permettre la libération du cholestérol nécessaire à la formation de nouvelles membranes cellulaires.

4.3.5.4 La PRL

Chez le vison, la concentration plasmatique en PRL était maximale durant la régression testiculaire au mois de mai et minimale durant la phase active de la spermatogenèse. Nos résultats de la PRL chez le vison étaient en accord avec ceux trouvés par d'autres études sur la même espèce (Boissin-Agasse et coll., 1988; Sundqvist et coll., 1988; Martinet et coll., 1992). Le taux sérique de la PRL et l'activité de la HSL dans les ITf variaient dans le sens inverse. Ceci veut dire que plus la PRL diminue, plus la HSL est active. Or, nous avons montré que la HSL des ITf était localisée dans les macrophages. Les macrophages possèdent les récepteurs de la PRL, cette hormone module la prolifération et l'activité de phagocytose par les macrophages (Dombrowicz et coll., 1996; Gaytan et coll., 1994). Comme il existe une interaction entre les macrophages testiculaires et les cellules de Leydig et comme ces deux types de cellules coopèrent pour la synthèse de la testostérone (Lukyanenko et coll., 2001), l'augmentation de la sécrétion de la PRL que nous avons observé au mois de mai peut causer la réduction de l'expression de la HSL par les macrophages, donc une réduction de l'hydrolyse du cholestérol estérifié. Ceci peut être une des causes de la diminution de la synthèse de la testostérone par les cellules de Leydig.

5. RÉSULTATS ADDITIONNELS PRÉLIMINAIRES

5.1 : ÉTUDE DE LA HSL DANS LES SPERMATOZOÏDES ÉPIDYDIMAIRE ET ÉJACULÉS DE BŒUF

5.1.1 Préparation des spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés de bœuf.

Notons tout d'abord que les épидидymes de bœuf ont été obtenus de l'abattoir les Cèdres de Montréal. Afin de récupérer les spermatozoïdes épидидymaires (Spz ép), les queues des épидидymes de bœuf ont été perfusées avec du PBS dans le canal déférent. Les Spz ont été lavés deux fois avec du PBS et récupérés par centrifugation à 600-700 rpm, pendant 4 min, dans une centrifugeuse Beckman GS-6R en utilisant le rotor GH 3,8 (Beckman, Mississauga, ON, Canada). Les spermatozoïdes éjaculés (Spz éj) ont été obtenus du Centre d'Insémination Artificielle du Québec (St Hyacinthe). Les Spz éj ont été lavés et centrifugés comme les Spz ép.

5.1.2 Méthodes

Immuno-buvardage : Les Spz ép et les Spz éj ont été dilués 1:1 avec du PBS contenant 1 mM de PMSF et soniqués sur la glace pendant 30 secondes puis, 30µg de protéines de Spz ép et de Spz éj ont été soumis à une électrophorèse et à un transfert sur nitrocellulose. Nous avons utilisé l'anticorps polyclonal anti-HSL humaine comme premier anticorps à la dilution de 1/100. L'anti-HSL humaine a été fait chez le lapin et purifié par chromatographie d'affinité dans une colonne de Sépharose 4B. Cet anticorps nous a été fourni par Dr C. Holm (Département de biologie cellulaire et moléculaire, Université de Lund, Lund S-223 62, Suède).

Dosage de l'activité de la HSL et de la concentration du cholestérol libre (CL) et du cholestérol estérifié (CE): L'activité de la HSL a été mesurée par une méthode colorimétrique en utilisant le p-nitrophényl butyrate (PNPB) comme substrat. Les concentrations du CL et du CE ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse après séparation des lipides par chromatographie sur couche mince (Cf : articles 1 et 2).

5.1.3 Résultats

Nous avons détecté une bande de 104-kDa correspondante à la HSL dans les Spz ép et les Spz éj de bœuf. L'intensité de la bande dans les Spz ép et les Spz éj a été déterminée par densitométrie ($n = 3$). Nous avons trouvé que le taux de la protéine de la HSL était de 1250 ± 254 et 1180 ± 230 (unité arbitraire) respectivement dans les Spz ép et les Spz éj. Il n'y avait pas de différence significative entre le taux de la HSL dans les Spz ép et les Spz éj (figure 1). Cependant, l'activité de la HSL était 4 fois dans les Spz ép ce qu'elle était dans les Spz éj (figure 2). Le taux du cholestérol total était presque le même dans les Spz ép ($37,8$ mg/g protéines) et les Spz éj (38 mg/g protéines). Le rapport CL/CE était plus élevé dans les Spz ép, ce qui est en accord avec l'activité de la HSL qui était plus grande dans les Spz ép que dans les Spz éj (tableau I).

Figure 1 : Analyse par immuno-buvardage de la HSL dans les spermatozoïdes épидидимaires (Spz ép) et les spermatozoïdes éjaculés (Spz éj) de bœuf. Nous avons utilisé la même technique d'immuno-buvardage que celle décrite dans les articles 1 et 2, en utilisant le même anticorps que dans l'article 2.

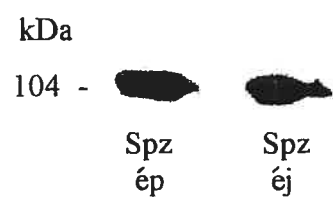
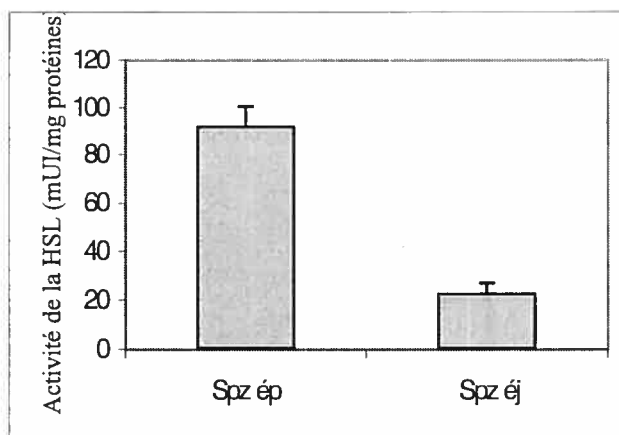


Figure 2 : Activité de la HSL dans les spermatozoïdes épидидymaires (Spz ép) et les spermatozoïdes éjaculés (Spz éj) bovins. L'activité de la HSL a été déterminée en utilisant la même technique décrite dans les articles 1 et 2. (n = 3).



	Cholestérol libre (CL) mg/g protéines	Cholestérol estérifié (CE) mg/g protéines	CL/CE	Activité de la HSL mUI/mg protéines
Spz ép	30,6 ± 12,1	7,4 ± 0,8	4,3 ± 1,9	92,0 ± 8,7
Spz éj	25,8 ± 8,4	12,0 ± 1,5	2,2 ± 0,8	22,7 ± 4,6

Tableau I: Taux du cholestérol libre (CL) et du cholestérol estérifié (CE) et l'activité de la HSL dans les spermatozoïdes épидидymaires (Spz ép) et les spermatozoïdes éjaculés (Spz éj) de bœuf (n = 3). Le cholestérol libre et estérifié des Spz ép et des Spz éj éjaculés ont été déterminés selon la méthode décrite dans l'article 1 et 2.

5.1.4 Discussion

Dans les Spz de cobaye, nous avons détecté deux bandes de la HSL de 104- et de 120-kDa alors que dans les Spz vison et de bœuf, nous avons détecté une seule bande de 104-kDa. La bande de 120-kDa peut être absente chez ces deux dernières espèces et cette différence peut être liée à l'espèce. Cette différence pourrait être aussi liée à l'anticorps utilisé puisque nous avons utilisé l'anti-HSL humaine pour le vison et le bœuf et l'anti-HSL du rat pour le cobaye ou encore la bande de 120-kDa pourrait être exprimée dans les Spz du vison et du bœuf, mais à un taux très faible, inférieur à la limite de détection de la technique que nous avons utilisée.

La présence de la HSL dans les Spz pourrait être en relation avec l'existence du CE dans ces cellules. En effet, nous avons déterminé la présence du CE dans les Spz épидидymaires et éjaculés chez le bœuf. Nos résultats ont montré que le CE représentait environ 20% du cholestérol total dans les Spz ép et 31% dans les Spz éj. Davis et coll. 1979 ont rapporté que dans les Spz épидидymaires de rat, 30 % du cholestérol se trouvait sous la forme estérifiée (Davis et coll., 1979). Le CE dans les Spz pourrait représenter soit une partie du CE contenu dans les cellules germinales (Pelletier et Vitale, 1994) et qui n'était pas totalement éliminé dans les corps résiduels, soit un pool de CE provenant de l'estérification par l'ACAT du CL de la membrane plasmique après son transport vers le réticulum endoplasmique rugueux ou encore du cholestérol synthétisé *de novo* puisque les Spz sont capable de synthétiser *in vitro* le cholestérol à partir de l'acétate (Johnson et coll., 1967; Gunasegaram et coll., 1995) si cette capacité est maintenue *in vivo*.

Dans les Spz bovins, nos résultats ont montré que la concentration du cholestérol total était presque égale dans les Spz ép et les Spz éj et ce qui changeait c'était le rapport entre le cholestérol libre et estérifié. Ce résultat démontre l'importance de l'activité de la

HSL qui était 4 fois plus élevée dans les Spz ép que dans les Spz éj et suggère l'existence dans les Spz épидидymaires de facteurs en relation avec la maturation épидидymaire, qui activeraient la HSL. Au cours de la maturation épидидymaire, les Spz subissent des changements dans leur membrane plasmique et en particulier une modification de leur contenu en cholestérol (Johnson, 1970; Parks et Hammerstedt, 1985; Hall et coll., 1991; Rana et coll., 1991). Le contenu en cholestérol de la membrane plasmique des Spz est un facteur déterminant de leur motilité et fertilité (Davis, 1980; Sugkrarook et coll., 1991; Haidl et Opper, 1997; Cross N.L., 1998). La HSL pourrait être considérée comme un régulateur potentiel du contenu de la membrane plasmique des Spz en cholestérol nécessaire à leur maturation et à leur fertilité.

5.2 ÉTUDES PRÉLIMINAIRES DE L'ACAT ET DE L'HMG-COA RÉDUCTASE

5.2.1 Étude préliminaire de l'ACAT

5.2.1.1 Analyse par immuno-buvardage de l'ACAT dans les STf et les spermatozoïdes épидидymaires de vison

Nous avons utilisé le vison durant le développement testiculaire (115 et 200 jours) et le vison adulte durant le cycle reproductif annuel (mars, avril, juin et août) et aussi les spermatozoïdes épидидymaires (Spz). Trente µg de STf et de Spz ont été soumis à une électrophorèse suivit d'un transfert sur nitrocellulose. Nous avons utilisé l'anticorps polyclonal anti-ACAT humaine fait chez le lapin contre les 131 acides aminés N-terminaux. Cet anticorps nous a été fourni gracieusement par Dr Chang T-Y (Dartmouth Medical School, Department of Biochemistry, Hanover, New Hampshire). Nous avons utilisé l'anti-ACAT à la dilution de 1/500.

5.2.1.2 Résultats

Nos immuno-buvardages ont détecté une seule bande de 31-kDa, une masse moléculaire considérablement inférieure à celle de l'ACAT humaine (50-kDa) (Chang et coll., 1995; Lee et coll., 1998) et à celle de l'ACAT de souris (46-kDa) (Meiner et coll., 1997). Nous avons détecté L'ACAT dans les STf durant la puberté, la phase active et inactive de la spermatogenèse et dans les Spz de vison. Le taux d'expression de la protéine de l'ACAT était plus élevé durant la phase active de la spermatogenèse que durant la régression testiculaire (figure 3).

Figure 3 : Analyse par immuno-buvardage de l'ACAT dans les STf et dans les Spz épидидymaires de vison. Les STf ont été préparés à partir de testicules de vison pendant le développement testiculaire (115 et 200 jours) et de testicule de vison adulte durant le cycle reproductif annuel (mars, avril, juin et août). Nous avons utilisé aussi les Spz de vison. Nous avons détecté une bande de 31-kDa de l'ACAT dans les STf à tous les âges étudiés. Le taux de cette protéine était plus élevé durant la phase active de la spermatogenèse que durant la régression testiculaire. Nous avons détecté aussi l'ACAT dans les Spz. (j = jours).



5.2.1.3 Discussion

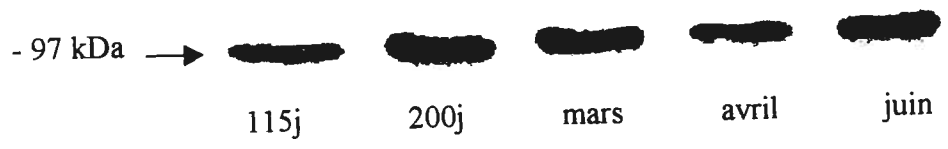
Nous avons montré pour la première fois la présence de l'ACAT dans les tubules séminifères du testicule et dans les Spz. Ces résultats montrent que l'expression de l'ACAT n'est pas liée seulement à la présence de cellules germinales bien que son taux augmente avec l'activité spermatogénétique. Le taux de l'ACAT serait influencé par l'activité spermatogénétique. Puisque la HSL et l'ACAT catalysent des réactions opposées, elles auraient des effets inverses sur le rapport CL/CE. Il existerait une coordination entre la HSL et l'ACAT dans le contrôle de l'estérification/hydrolyse du cholestérol afin d'assurer une libération d'un taux adéquat du cholestérol au cours du développement testiculaire et de l'activité spermatogénétique chez l'adulte. Il existerait aussi une coordination entre la HSL et l'ACAT au niveau des Spz afin de permettre une régulation du métabolisme du cholestérol nécessaire à leur maturation épидидymaire.

5.2.2 Étude préliminaire de l'HMG-CoA réductase

5.2.2.1 Analyse par immuno-buvardage de l'HMG-CoA réductase dans les STf de vison

Nous avons utilisé le vison durant le développement testiculaire (115 et 200 jours) et le vison adulte aux mois de mars, avril et juin. Trente μ g de STf ont été soumis à une électrophorèse puis à un transfert. Nous avons utilisé l'anticorps polyclonal anti-HMG-CoA réductase du hamster syrien fait chez le lapin et qui reconnaît l'HMG-CoA réductase humaine. Cet anticorps nous a été fourni gracieusement par Dr Simoni (Department of Biological sciences, Stanford University, Stanford, California). Nous avons utilisé l'anti-HMG-CoA réductase à la dilution de 1/1500.

Figure 4 : Analyse par immuno-buvardage de l'HMG-CoA réductase dans les STf de vison. Les STf ont été préparées à partir de testicules de vison au cours du développement testiculaire (115 et 200 jours) et de testicule de vison adulte aux mois de mars, avril et juin. Les STf ont été séparées des ITf selon la méthode décrite dans les articles 1 et 2. Nous avons détecté une bande de 97-kDa correspondante à l'HMG-CoA réductase à tous les âges étudiés. Le taux de cette protéine était plus élevé à 200 jours qu'aux autres âges étudiés. (j = jours).



5.2.2.2 Résultats

Dans les STf de vison, nous avons détecté une seule bande de 97-kDa correspondante à l'HMG-CoA réductase. L'HMG-CoA réductase a été détectée à tous les âges étudiés. Le taux de l'HMG-CoA réductase était plus élevé à 200 jours que chez l'adulte (figure 4).

5.2.2.3 Discussion

La MM de l'HMG-CoA réductase de 97-kDa déterminée dans cette étude chez le vison est en accord avec les autres études effectuées chez d'autres espèces (Liscum et coll., 1983; Ness et coll., 1986). Nous avons montré pour la première fois que l'HMG-CoA réductase était présente dans les tubules séminifères du testicule de vison puisque les autres études ont montré la présence de l'HMG-CoA réductase dans un homogénat de testicules entiers (Ness et Nazian, 1992; Ness, 1994). Nos résultats sont en accord avec ceux de Ness et coll. en 1994 qui ont montré que l'expression de l'HMG-CoA réductase augmentait durant le développement testiculaire puis diminuait chez le rat adulte (Ness, 1994). L'activité totale de l'HMG-CoA réductase augmentait aussi durant le développement testiculaire jusqu'à l'âge de 26 jours chez le rat puis diminuait par la suite (Ness et Nazian, 1992). L'augmentation du taux de l'HMG-CoA réductase que nous avons observée durant la puberté pourrait être due à une expression de cette enzyme par les cellules germinales. En effet, Potter et coll. ont montré que l'HMG-CoA réductase était active dans les cellules germinales à différents stages de développement et que le maximum d'activité était observé dans les spermatocytes du stade pachytène (Potter et coll., 1981). L'activité de cette enzyme était plus élevée dans les spermatocytes au stade pachytène de la prepuberté que dans les spermatocytes au stade pachytène de l'adulte (Potter et coll., 1981). Le taux de synthèse du cholestérol

augmente de 4 à 5 fois quand les spermatocytes se développaient du stade preleptotène au stade pachytène, ce taux de synthèse diminuait dans les spermatozoïdes (Potter et coll., 1981). Cette augmentation du taux de l'HMG-CoA réductase chez le vison durant la puberté serait en rapport avec le besoins des cellules germinales en cholestérol durant leur développement (Correll et Edwards, 1994).

La cellule de Sertoli *in vitro* est capable de synthétiser le cholestérol à partir de l'acétate (Wiebe et Tilbe, 1979), ce qui suppose que la cellule de Sertoli possède l'HMG-CoA réductase. L'HMG-CoA réductase que nous avons détectée dans les STf du vison pourrait être exprimée non seulement par les cellules germinales mais aussi par les cellules de Sertoli, mais ceci reste à vérifier.

6. CONCLUSION

La production cyclique d'un nombre considérable de spermatozoïdes par les tubules séminifères et de la testostérone par les cellules de Leydig, nécessite un contrôle rigoureux des enzymes clés du métabolisme du cholestérol pour assurer l'homéostasie de ce composé dans chacun des compartiments testiculaires. Dans cette étude, nous avons montré que la HSL permettait la modulation de l'hydrolyse du cholestérol en fonction de l'activité spermatogénétique. Cette modulation est différente dans les deux compartiments testiculaires en fonction de leur besoin respectif en cholestérol.

La HSL que nous avons détectée dans les ITf était exprimée essentiellement par les macrophages et elle pourrait être impliquée dans la synthèse de la testostérone. Dans les STf, nous avons montré que le taux et l'activité de la HSL augmentaient avec l'apparition des cellules germinales et diminuaient avec leur disparition. La HSL était exprimée par les cellules de Sertoli et aussi par les spermatides allongées. Nous avons montré pour la première fois que la HSL était présente dans les lysosomes de la cellule de Sertoli, ce qui suggère qu'une partie de cette enzyme pourrait provenir des cellules germinales. Nous avons montré aussi que la HSL était présente et active dans les spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés. Dans les spermatozoïdes, la HSL jouerait un rôle dans la régulation de la proportion du cholestérol par rapport aux autres classes de lipides nécessaire à leur fertilité. En plus, nous avons localisé la HSL dans le segment équatorial des spermatozoïdes, ce qui suggère que cette enzyme jouerait un rôle aussi dans l'interaction spermatozoïde-ovule.

La HSL testiculaire pourrait être régulée par des hormones hypophysaires différentes dans chacun des deux compartiments testiculaires, ainsi la FSH permettrait la

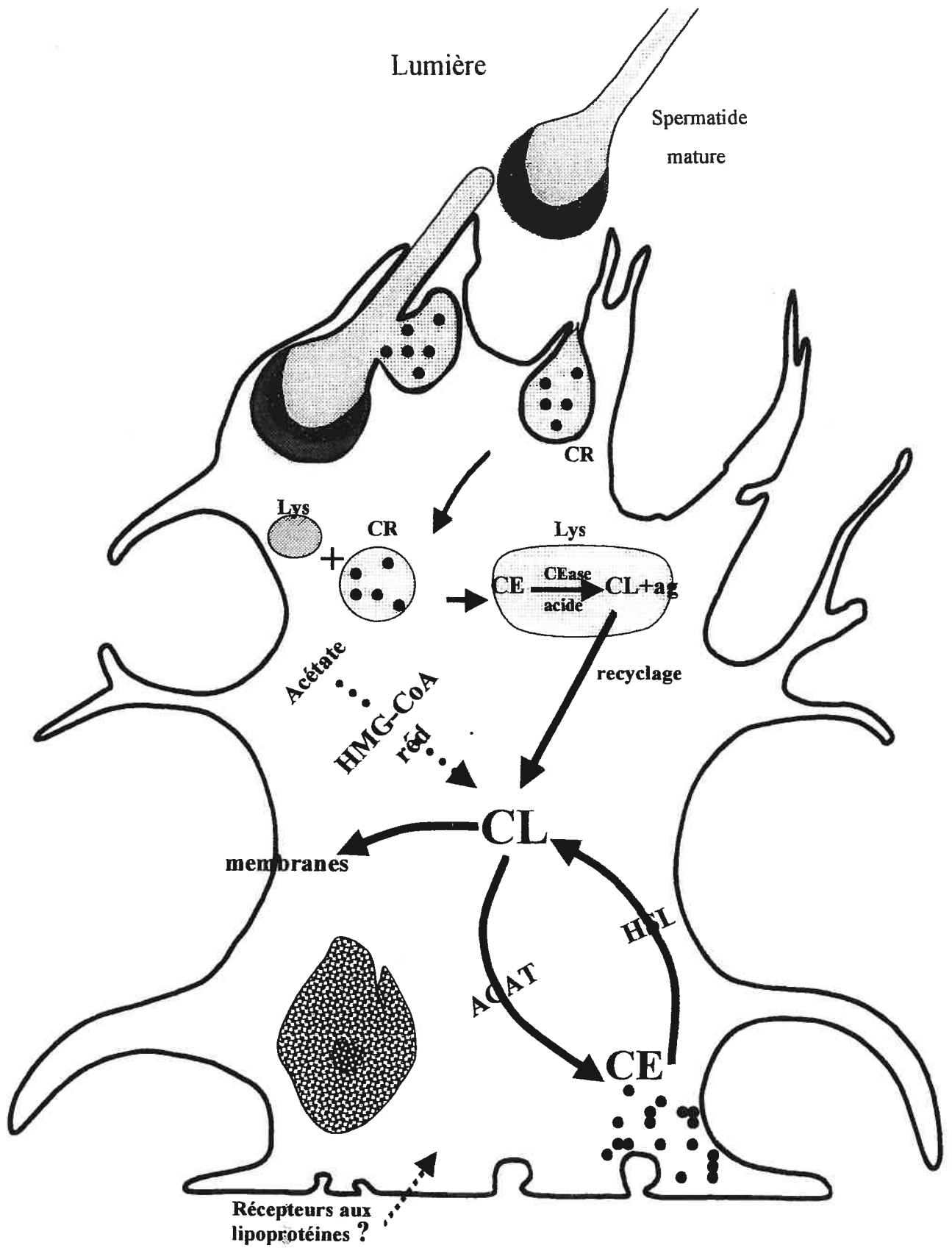
régulation du taux et de l'activité la HSL dans la cellule de Sertoli et la PRL agirait sur l'activation de la HSL au niveau des macrophages.

En plus de la HSL, nous avons montré que l'ACAT et l'HMG-CoA réductase étaient aussi présentes dans les STf de vison. Il existerait une coordination entre ces trois enzymes pour la gestion du cholestérol dans les tubules séminifères en fonction de l'activité spermatogénétique.

Enfin, je propose un diagramme représentant l'origine et la destination du cholestérol dans la cellule de Sertoli (figure 6). Les corps résiduels qui se détachent des spermatozoïdes matures seraient phagocytés par la cellule de Sertoli où les résidus lipidiques fusionneraient avec les lysosomes et formeraient avec des vacuoles hétérophagiques, des phagosomes ou des lysosomes secondaires. Le cholestérol ingéré serait hydrolysé en cholestérol libre et en acide gras par la "cholestérol ester hydrolase" acide lysosomiale. Ce cholestérol libre recyclé pourrait être utilisé par la cellule de Sertoli dans la formation de membranes cellulaires. Lorsque la concentration en cholestérol dans la cellule de Sertoli dépasserait la demande, le cholestérol serait estérifié par l'ACAT et stocké dans des gouttelettes lipidiques qui s'accumuleraient près de la base de la cellule de Sertoli. En cas de besoin, le cholestérol estérifié serait hydrolysé par la HSL. Le cholestérol estérifié contenu dans les gouttelettes lipidiques est dans un état dynamique. Il est en état d'hydrolyse et de re-estérification continu, c'est ce que Brown et Goldstein ont appelé le cycle du cholestérol estérifié qui fait intervenir l'ACAT et la HSL (Brown et Goldstein, 1983). De plus, la cellule de Sertoli *in vitro* a la capacité de synthétiser le cholestérol à partir de l'acétate. L'enzyme limitante de cette voie est l'HMG-CoA réductase si cette capacité est maintenue *in vivo*. Le cholestérol pourrait aussi être apporté à la cellule de Sertoli par les lipoprotéines plasmatiques en faisant intervenir des récepteurs spécifiques, mais ceci reste à vérifier.

Figure 6 : Représentation schématique du métabolisme du cholestérol dans la cellule de Sertoli. Dans ce diagramme, je propose une représentation schématique du métabolisme du cholestérol dans la cellule de Sertoli. Le cholestérol libre utilisé pour la formation de nouvelles membranes aurait plusieurs origines : 1) le cholestérol contenu dans les corps résiduels et phagocytés par la cellule de Sertoli. Le cholestérol estérifié ingéré serait hydrolysé en cholestérol libre dans les lysosomes. 2) La synthèse *de novo* du cholestérol libre à partir de l'acétate en faisant intervenir l'HMG-CoA réductase. 3) L'hydrolyse du cholestérol estérifié contenu dans les gouttelettes lipidiques par la HSL. Ce cholestérol estérifié proviendrait de l'estérification par l'ACAT du cholestérol libre lorsque celui-ci serait en excès dans la cellule par rapport à la demande. 4) Le cholestérol pourrait aussi être apporté par les lipoprotéines plasmatiques en faisant intervenir des récepteurs spécifiques. HMG-CoA réd: 3-hydroxy-3 méthylglutaryl coenzyme A réductase, ACAT: acyl CoA: cholestérol acyl transférase, CL: cholestérol libre, CE: cholestérol estérifié, CR: corps résiduels, Lys: lysosomes, CEase: cholesterol ester hydrolase. ● représente les gouttelettes lipidiques.

La forme de la cellule de Sertoli est représentée à partir : Petrie, R. and Morales, C.R. Receptors-mediated endocytosis of testicular transferrin by germinal cells of the rat testis. *Cell Tiss Res* 267:45-55, 1992. (Petrie et Morales, 1992).



7. PERSPECTIVES

Du fait de l'importance de la HSL dans la libération du cholestérol nécessaire à la formation des spermatozoïdes viables et fertiles, il serait très intéressant de poursuivre l'étude la HSL, de déterminer la transcription de la HSL et la régulation de chacune de ses isoformes dans chaque compartiment testiculaire. Les résultats de la présente étude, ouvrent une nouvelle perspective en application clinique dans le traitement éventuel de certains cas d'infertilité masculine liée à un défaut du métabolisme de cholestérol ou encore dans le développement d'un contraceptif masculin.

Certes, la HSL est une enzyme clé dans le métabolisme du cholestérol tubulaire, mais le taux du cholestérol dans la cellule de Sertoli est influencé par trois enzymes principales : la HSL, l'ACAT et l'HMG-CoA réductase (figure 6). Ces trois enzymes doivent fonctionner d'une façon coordonnée afin d'assurer une régulation du taux du cholestérol intracellulaire en fonction de l'activité spermatogénétique et en fonction des stages du cycle de l'épithélium séminifère. Ces trois enzymes auraient une régulation, simultanée en particulier une régulation par les hormones. La poursuite de l'étude de l'expression et de l'activité de l'ACAT et de l'HMG-CoA réductase dans les STf, ainsi que leur régulation, pourrait compléter le présent travail afin de mieux éclairer le métabolisme du cholestérol dans les tubules séminifères, domaine non encore exploité.

L'activité de la HSL, de l'ACAT et de l'HMG-CoA réductase serait influencée par l'apport du cholestérol à partir des corps résiduels aux stages du cycle qui suivent la libération des spermatozoïdes matures. L'activité de ces enzymes serait influencée aussi par l'apport éventuel du cholestérol du sang via les récepteurs. La recherche du rôle des récepteurs des lipoprotéines et en particulier les récepteurs scavengers (SR-BI, SR-BII et CD36) dans la captation du cholestérol du sang par la cellule de Sertoli serait très intéressante afin d'identifier l'origine du cholestérol qui se trouve dans les tubules

séminifères et d'évaluer le rôle réel de la barrière hémato-testiculaire dans le transport du cholestérol.

8. BIBLIOGRAPHIE

- Acton, S., Rigotti, A., Landschultz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520, 1996.
- Almahbobi, G., and Hall, P.F. The role of intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *J Cell Sci* 97:679-687, 1990.
- Almahbobi, G., Williams, L.J., and Hall, P.F. Attachment of mitochondria to intermediate filament in adrenal cells: relevance to the regulation of steroid synthesis. *Exp Cell Res* 200:361-369, 1992.
- Aoki, A., and Massa, E.M. Subcellular compartmentation of free and esterified cholesterol in the interstitial cells of the mouse testis. *Cell Tiss Res* 165:49-62, 1975.
- Atshaves, B.P., Storey, S.M., McIntosh, A.L., Petrescu, A.D., Lyuksyutova, O.I., Greenberg, A.S., and Schroeder, F. Sterol carrier protein-2 expression modulates protein and lipid composition of lipid droplets. *J Biol Chem* 276:25324-25335, 2001.
- Balasubramaniam, S., Venkatesan, S., Mitropoulos, K., and Peters, T.J. The microsomal localization of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase and its substrate, and of cholesterol esters in rat liver. *Biochem J* 174:863-872, 1978.
- Bartke, A., Prolactin changes cholesterol stores in the mouse testis. *Nature* 224:700-701, 1969.

- Bartke, A. Effect of prolactin and luteinizing hormone on cholesterol stores in the mouse testis. *J Endocrinol* 49:317-324, 1971a.
- Bartke, A. Effects of prolactin on spermatogenesis in hypophysectomized mice. *J Endocrinol* 49:311-319, 1971b.
- Basu, S.K., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. Characterization of the low density lipoprotein in membranes prepared from human fibroblasts. *J Biol Chem* 253:38-52, 1978.
- Behrman, H.R., Orczyk, G.P., Macdonald, G.J., and Greep R.O. Prolactin induction of enzymes controlling luteal cholesterol ester turnover. *Endocrinology* 87:1251-1256, 1970.
- Beins, D.M., Vining, R., and Balasubramaniam, S. Regulation of neutral cholesterol esterase and acyl CoA: cholesterol acyltransferase in the rat adrenal gland. *Biochem J* 202:631-637, 1982.
- Beisiegel, U. Receptor for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 6:117-122, 1995.
- Beisiegel, U. Lipoprotein metabolism. *Eur Heart J* 19:A20-A23, 1998.
- Bellvé, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M., and Dym, M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* 74:68-85, 1977.
- Benahmed, M., Dellamonica, C., Haour, F., and Saez, J.M. Specific low density lipoprotein receptors in pig Leydig cells. Role of this lipoprotein in cultured Leydig cells steroidogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 99:1123-1130, 1981.

- Benahmed, M., Reventos, J., and Saez, J.M. Rôle des lipoprotéines plasmatiques dans la fonction des tissus stéroïdogènes. *Ann Endocrinol* 44:43-50, 1983.
- Bergh, A. Effet of cryptorchidism on the morphology of testicular macrophages: evidence for a Leydig cell-macrophage interaction in the rat testis. *Int J Androl* 8:86-96, 1985.
- Bergh, A., Damber, J.-E., and Van Rooijen, N. Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages. *J Endocr* 136:407-413, 1986.
- Beucler, I., Salmon, S., Petit, E., Ayrault-Jarrier, M., and Polonovski, J. Structure et métabolisme des lipoprotéines. *Ann Biol Clin* 44:531-535, 1986.
- Beucler, I., Salmon, S., and Polonovski, J. Rôle des lipoprotéines dans le transport et le métabolisme des lipides. *Cah Nutr Diet* 22:277-286, 1987.
- Black, V.H. Gonocytes in fetal Guinea pig testes: phagocytosis of degenerating gonocytes by Sertoli cells. *Am J Anat* 131:415-426, 1971.
- Blaise, R., Grober, J., Rouet, P., Tavernier, G., Daegelen, D., and Langin, D. Testis expression of hormone-sensitive lipase is conferred by a specific promoter that contains four regions binding testicular nuclear proteins. *J Biol Chem* 274:9327-9334, 1999.
- Blaise, R., Guillaudeau, T., Tavernier, G., Daegelen, D., Evrard, B., Mairal, A., Holm, C., Jégou, B., and Langin, D. Testis hormone-sensitive lipase expression in spermatids is governed by a short promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 276:5109-5115, 2001.
- Boissin-Agasse, L. and Boissin, J. Variations saisonnières du volume testiculaire et de la testostéronémie chez deux mustélidés : le furet (*Mustela furo L.*) et le vison (*Mustela vison S.*). *J Physiol* 75:227-232, 1979.

- Boissin-Agasse, L., Jacquet, J.M., Lacroix, A., and Boissin, J. Long-term effects of pinealectomy on testicular function, luteinizing hormone-releasing hormone hypothalamic system, and plasma prolactin levels in the mink, a short-day breeder. *J Pineal Research* 5:385-396, 1988.
- Botham, K.M. Cyclic AMP and the regulation of cholesterol metabolism. *Biochem Soc Trans* 20:454-459, 1992.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:788-792, 1974.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Review Biochem* 52:223-261, 1983.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47, 1986.
- Burgos, M.H. and Gutierrez, L.S. The Golgi complex of the early spermatid in Guinea pig. *Anat Rec* 216:139-145, 1986.
- Caillol, M., Mondain-Monval, M., Rossano, B., Solari, A., and Martinet, L. Annual variations of in vitro GNRH release by hypothalamic explants in intact and castrated male mink: relations with LH, FSH and testosterone circulating serum levels. *J Neuroendocrinol* 7:681-687, 1995.
- Cao, G., Zhao, L.S.H., Hasegawa, T., Richardson, J.A., Parker, K.L., and Hobbs, H.H. Developmental and hormonal regulation of murine scavenger receptor, class B, type I. *Mol Endocrinol* 13:1460-1463, 1999.

- Carreau, S., Foucault, P., and Drosdowsky, M.A. La cellule de Sertoli: Aspects fonctionnels comparés chez le rat, le porc et l'homme. *Ann Endocrinol* 55:203-220, 1994.
- Chang, C.C.Y., Chen, J., Thomas, M.A., Cheng, D., Del Priore, V.A., Newton, R.S., Pape, M.E., and Chang, T.-Y. Regulation and immunolocalization of acyl-Coenzyme A: Cholesterol acyltransferase in mammalian cells as studied with specific antibodies. *J Biol Chem* 270:29532-29540, 1995.
- Chang, T.Y., Chang, C.C.Y., and Cheng, D. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Ann Review Biochem* 66:613-638, 1997.
- Charreau, E.H., Calvo, J.C., Nosu, K., Pignataro, O., Catt, K.J., and Dufau, M.L. Hormonal modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in gonadotropin-stimulated and -desensitized testicular Leydig cells. *J Biol Chem* 256:12719-12724, 1981.
- Cheng, D., Chang, C.C.Y., Qu, X.M., and Chang, T.-Y. Activation of acyl CoA:cholesterol acyltransferase by cholesterol or by oxysterol in a cell-free system. *J Biol Chem* 270:685-695, 1995.
- Christensen, A.K. Leydig cells. In: *Handbook of physiology*, edited by Greep R.O. Baltimore: 1975, p. 335-378.
- Chung, K.W. and Hamilton, J.B. Testicular lipids in mice with testicular feminization. *Cell Tiss Res* 160:69-80, 1975.
- Chung, S., Wang, S.P., Pan, L., Mitchell, G., Trasler, J., and Hermo, L. Infertility and testicular defects in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Endocrinology* 142:4272-4281, 2001.
- Clark, B.J., Wells, J., King, S.R., and Stocco, D.M. The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-

- 10 mouse Leydig tumor cells: characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269:28314-28322, 1994.
- Clermont, Y. Cycle of the seminiferous epithelium of the Guinea pig: a method for identification of the stages. *Fertil Steril* 11:563-573, 1960.
- Clermont, Y. Differentiation et evolution des cellules sexuelles 1° La lignée mâle. *Arch Anat Mic* 56:7-60, 1967.
- Clifford, G.M., Londos, C., Kraemer, F.B., Vernon, R.G., and Yeaman, S.J. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 275:5011-5015, 2000.
- Clifford, G.M., McCormick, D.K., Vernon, R.G., and Yeaman, S.J. Translocation of perilipin and hormone-sensitive lipase in response to lipolytic hormones. *Biochem Soc Trans* 25:S672, 1997.
- Cohen, P.E., Chisholm, O., Arceci, R.J., Stanley, E.R., and Pollard, J.W. Absence of colony-stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmop/csfmop) mice results in male fertility defects. *Biol Reprod* 55:310-317, 1996.
- Contreras, J.A., Karlsson, M., Osterlund, T., Laurell, H., Svensson, A., and Holm, C. Hormone-sensitive lipase is structurally related to acetylcholinesterase, bile salt-stimulated lipase, and several fungal lipases building of a three-dimensional model for the catalytic domain of hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem* 271:31426-31430, 1996.
- Cook, K.G., Colbran, R.J., Snee, J., and Yeaman, S.J. Cytosolic cholesterol ester hydrolase from bovine corpus luteum. Its purification, identification, and relationship to hormone-sensitive lipase. *Biochim Biophys Acta* 752:46-53, 1983.

- Cook, K.G., Yeaman, S.J., Stralfors, P., and Belfrage, P. Direct evidence that cholesteryl ester hydrolase from adrenal cortex is the same enzyme as hormone-sensitive lipase from adipose tissue. *Eur J Biochem* 125:245-249, 1982.
- Cordle, S.R., Colbran, R.J., and Yeaman, S.J. Hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 887:51-57, 1986.
- Correll, C.C. and Edwards, P.A. Mevalonic acid-dependant degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 269:633-638, 1994.
- Corvilain, B. Métabolisme des lipoprotéines. *Rev Méd Brux* 18:3-9, 1997.
- Cross N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:7-11, 1998.
- Davis, B.K. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch Androl* 5:249-254, 1980.
- Davis, B.K., Byrne, R., and Hangund, B. Studies on the mechanism of capacitation: II. Evidence for lipid transfert between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 558:257-266, 1979.
- Davis, J.T., Bridges, R.B., and Coniglio, J.G. Changes in lipid composition of the maturing rat testis. *Biochem J* 98:342-346, 1966.
- De Grella, R.F. and Simoni, R.D. Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. *J Biol Chem* 257:14256-14262, 1982.
- de Villiers, W.J.S. and Smart, E.J. Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J Leukoc Biol* 66:740-746, 1999.

- Demoraes, M.C.L., Touraine, P., Gagnerault, M.C., Savino, W., Kelly, P.A., and Dardenne, M. Prolactin receptors and the immune system. *Ann Endocrinol* 56:567-570, 1995.
- Dietert, S.E. Fine structure of the formation and fate of the residual bodies of mouse spermatozoa with evidence for the participation of lysosomes. *J Morphol* 120:317-346, 1966.
- Dombrowicz, D., Sente, B., Reiter, E., Closser, J., and Hennen, G. Control of proliferation and differentiation of Leydig cells and their putative precursors in immature hypophysectomised rat testis. *J Androl* 17:650-1996.
- Ducobu, J. Les recepteurs des lipoprotéines. Vieilles connaissances et nouveaux venus. *Rev Méd Brux* 18:10-15, 1997.
- Durham, L.A. and Grogan, W.M. Temperature sensitivity of cholesteryl ester hydrolases in the rat testis. *Lipids* 17:970-975, 1982.
- Durham, L.A. and Grogan, W.M. Characterization of multiple forms of cholesteryl ester hydrolase in the rat testis. *J Biol Chem* 259:7433-7438, 1984.
- Edwards, P.A. Effect of adrenalectomy and hypophysectomy on the circadian rhythm on β hydroxyl-methylglutaryl CoA reductase activity in rat liver. *J Biol Chem* 248:2912-2917, 1973.
- Egan, J.J., Greenberg, A.S., Chang, M.-K., Wek, S.A., Moos, M.C., and Londos, C. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8537-8541, 1992.
- Einarsson, K., Benthin, L., Ewerth, S., Hellers, G., Stahlberg, D., and Angelin, B. Studies on acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity in human liver microsomes. *J Lipid Res* 30:739-746, 1989.

- Escary, J.-L., Choy, H.A., Reue, K., and Schotz, M.C. Hormone-sensitive lipase overexpression increases cholesteryl ester hydrolysis in macrophage foam cells. *Arterioscler Thomb Vasc Biol* 18:991-998, 1998.
- Faust, J.R., Trzaskos, J.M., and Gaylor, J.L. Cholesterol biosynthesis. In: *Biology of cholesterol*, edited by P.L. Yeagle. Boca Raton,FL: CRC press, 1988, p. 19-38.
- Fawcett, D.W. *In Male Fertility and Sterility*. Serono symposium: 1973.
- Fawcett, D.W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: *Handbook of physiology, section 7 Endocrinology*, edited by D.W. Hamilton and Greep R.O. 1975, p. 21
- Field, F.J., Kam, N.T.P., and Mathur, S.N. Regulation of cholesterol metabolism in the intestine. *Gastroenterology* 99:539-551, 1990.
- Fielding, C.J. and Fielding, P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 36:211-228, 1995.
- Fielding, P.E. and Fielding, C.J. Intracellular transport of low density lipoproteins derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry* 35:14932-14938, 1996.
- Flint, A.P.F., Grinwich, D.L., and Armstrong, D.T. Control of ovarian cholesterol ester biosynthesis. *Biochem J* 132:313-321, 1973.
- Fofana, M., Maboundou, J.C., Bocquet, J., and Le Goff, D. Transfer of cholesterol between high density lipoproteins and cultured rat Sertoli cells. *Biochem Cell Biol* 74:681-686, 1996.
- Fofana, M., Travert, C., Carreau, C., and LeGoff, D. Evaluation of cholesteryl ester transfer in the seminiferous tubule cells of immature rats *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil* 118:79-83, 2000.

- Fong, T.H., Wang, S.M., and Lin, H.S. Immunocytochemical demonstration of a lipid droplet-specific capsule in cultures Leydig cells of the golden hamsters. *J Cell Biochem* 63:366-373, 1996.
- Freeman, M., Ashkenas, J., Rees, D.J., Kingsley, D.M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Krieger, M. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4931-4935, 1991.
- Fujimoto, T., Kogo, K., Ishiguro, K., Tauchi, K., and Nomura, R. Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new 'membrane domain' in the cell T. *J Cell Biol* 152:1079-1086, 2001.
- Garton, A.J. and Yeaman, S.J. Identification and role of the basal phosphorylation site on hormone-sensitive lipase. *Eur J Biochem* 191:245-250, 1990.
- Gasnier, F. Stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig. Dans: *Médecine et biologie de la reproduction*, édité par S. Hamamah, E. Saliba, M. Benahmed et F. Gold. Paris: Masson, 1999, p. 70-85.
- Gaytan, F., Romero, J.L., bellido, C., Morales, C., Reymundo, C., and Aguilar, E. Effects of growth hormone and prolactin on testicular macrophages in long-term hypophysectomized rats. *J Reprod Immunol* 27:73-84, 1994.
- Gerard, A., Nya, A.E., Egloff, M., Domingo, M., Degrelle, H., and Gerard, H. Endocytosis of human sex steroid-binding protein in monkey germ cells. *Ann NY Acad Sci* 637:258-276, 1991.
- Go, K.J. and Wolf, D. The role of sterols in sperm capacitation. *Adv Lipid Res* 20:317-330, 1983.
- Goldstein, J.L. and Brown, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-429, 1990.

- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:333-337, 1979.
- Greenwalt, D.E., Lipsky, R.H., Ockenhouse, C.F., Ikeda, H., Tandon, N.M., and Jamieson, G.A. Membrane glycoprotein CD36: A Review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 80:1105-1115, 1992.
- Griffiths, G., Warren, G., Stuhlfauth, I., and Jockusch, B.M. The role of clathrin-coated vesicles in acrosome formation. *Eur J Cell Biol* 26:52-60, 1981.
- Griswold, M.D. Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. In: *The Sertoli cell*, edited by Russel and Griswold. Clearwater, FL.: Cache River Press, 1993, p. 493-508.
- Grizard, G., Sion, B., Jouanel, P., Benoit, P., and Boucher, D. Cholesterol, phospholipids and markers of the function of the accessory sex glands in the semen of men with hypercholesterolaemia. *Int J Androl* 18:151-156, 1995.
- Grober, J., Laurell, H., Blaise, R., Fabry, B., Schaak, S., Holm, C., and Langin, D. Characterization of the promoter of human adipocyte hormone-sensitive lipase. *Biochem J* 328:453-461, 1997.
- Gunasegaram, R., Peh, K.L., Loganath, A., Chew, P.C.T., and Ratnam, S.S. In vitro formation of [¹⁴C]-cholesterol from 2-[¹⁴C]-acetate in human spermatozoa. *Med Sci Res* 23:315-316, 1995.
- Gunasekar, P.G., Kumaran, B., and Govindarajulu, P. Role of prolactin on Leydig, Sertoli and germ cellular neutral lipids in bonnet monkeys, *Macaca radiata*. *Endocrinol Japon* 38:1-8, 1991.

- Gwynne, J.T. and Strauss, J.F. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocrine Rev* 3:299-328, 1982.
- Hafiez, A.A. and Bartke, A. Effect of hypophysectomy on cholesterol metabolism in the testes of rat and mice. *J Endocrinol* 52:321-326, 1972.
- Haidl, G. and Opper, C. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Hum Reprod* 12:2720-2723, 1997.
- Hall, J.C., Hadley, J., and Doman, T. Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein and the membrane physical state during epididymal maturation. *J Androl* 12:76-87, 1991.
- Hall, P.F. The roles of calmodulin, actin, and vimentin in steroid synthesis by adrenal cells. *Steroids* 62:185-189, 1997.
- Hall, P.F. and Almahbobi, G. Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *Microsc Res Tech* 36:463-479, 1997.
- Hardie, D.G., Carling, D., and Sim, A.T.R. The AMP-activated protein kinase: a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *TIBS* 14:20-23, 1989.
- Heid, H.W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H.R., and Keenan, T.W. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tiss Res* 294:309-321, 1998.
- Hermo, L., Oko, R., and Morales, C.R. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int Dev Cytol* 154:106-189, 1994.
- Heshmati, H.M., Taleb, M., and Turpin, G. La barrière hémato-testiculaire. *Ann Endocrinol* 45:115-117, 1984.

- Hoffmann, A.M., Bergh, A., and Olivecrona, T. Changes of testicular cholesteryl ester hydrolase activity in experimentally cryptorchid rats. *J Reprod Fertil* 86:11-18, 1989.
- Holm, C., Belfrage, P., and Fredrikson, G. Immunological evidence for the presence of hormone-sensitive lipase in rat tissues other than adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 148:99-105, 1987.
- Holm, C., Belfrage, P., and Fredrikson, G. Human adipose tissue hormone-sensitive lipase: identification and comparison with other species. *Biochim Biophys Acta* 1006:193-197, 1989.
- Holm, C., Kirchgessner, T.G., Svenson, K.L., Fredrikson, G., Nilsson, O., Miller, C.G., Shively, J.E., Heinzmann, C., Sparkes, R.S., Mohandas, T., Lusic, A.J., Belfrage, P., and Schotz, M.C. Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science* 241:1503-1506, 1988.
- Huacuja, L., Delgado, N.M., Calzada, L., Wens, A., Reyes, R., Pedron, N., and Rosado, A. Exchange of lipid between spermatozoa and seminal plasma in normal and pathological human semen. *Arch Androl* 7:343-349, 1981.
- Hutson, J.C. Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biol Reprod* 43:885-890, 1990.
- Hutson, J.C., Carpenter, A.M., Hardy, D.M., and Lukyanenko, Y.O. Physiological relevance of macrophage-Leydig cell interactions. *Biol Reprod* 60 (suppl):170, 1999.(Abstract).
- Igdoura, S.A., Argraves, W.S., and Morales, C.R. Low density lipoprotein receptor-related protein-1 expression in the testis: regulated expression in Sertoli cells. *J Androl* 18:400-410, 1997.

- Johnson, A.D. Testicular lipids. In: *The testis*, edited by A.D. Johnson, W.R. Gomes and N.L. Vandemark. New York, NY: 1970, p. 194-258.
- Johnson, A.D., Vera Cruz, N.C., and Gomes, W.R. Synthesis and utilisation of cholesterol by sperm. *J Animal Sci* 26:946-952, 1967.
- Johnson, W.J., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis. In: *Subcellular Biochemistry, volume 28: cholesterol: its functions and metabolism in biology and medicine*, edited by R. Bittman. New York: 1997, p. 235-276.
- Josso, N. and Rey, R. La cellule de Sertoli, une cellule endocrine. *Med/Sci* 11:537-546, 1995.
- Kaplan, M.R. and Simoni, R.D. Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Cell Biol* 101:446-453, 1985.
- Kerr, J.B. and De Kretser, D.M. Cyclic variations in Sertoli cell lipid content throughout the spermatogenic cycle in the rat. *J Reprod Fertil* 43:1-8, 1975.
- Klemcke, H.G. and Brinkley, H.J. Endogenous rhythms on luteal and adrenal cholesterol ester hydrolase and serum PRL, LH and progesterone in mature pseudopregnant rats. *Biol Reprod* 22:1022-1028, 1980.
- Koshland, D.E.Jr. and Neet, K.E. The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Ann Review Biochem* 37:359-410, 1968.
- Kraemer, F.B., Patel, S., Saedi, M.S., and Sztalryd, C. 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* 34:663-671, 1993a.

- Kraemer, F.B., Patel, S., Singh-Bist, A., Gholami, S.S., Saedi, M.S., and Sztalryd, C. Detection of hormone-sensitive lipase in various tissues.II. Regulation in the rat testis by human chorionic gonadotropin. *J Lipid Res* 34:609-616, 1993b.
- Kraemer, F.B., Tavangar, K., and Hoffman, A.R. Developmental regulation of hormone-sensitive lipase mRNA in the rat: changes in steroidogenic tissues. *J Lipid Res* 32:1303-1310, 1991.
- Krieger, M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defence. *Curr Opin Lipidol* 8:275-280, 1997.
- Kuniyasu, A., Hayashi, S., and Nakayama, H. Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36. *Biochem Biophys Res Commun* 295:319-323, 2002.
- Lacroix, M., Parvinen, M., and Fritz, I.B. Localization of testicular plasminogen activator in discrete portions (stages VII-VIII) of the seminiferous tubule. *Biol Reprod* 25:143-146, 1981.
- Lacy, D. Certain aspects of testis structure and function. *Br Med Bull* 18:205-208, 1962.
- Lacy, D. The seminiferous tubule in mammals. *Endeavour* 26:101-109, 1967.
- Lacy, D. and Pettitt, A.J. Sites of hormone production in the mammalian testis, and their significance in the control of male fertility. *Br Med Bull* 26:87-91, 1970.
- Langin, D., Laurell, H., Stenson Holst, L., Belfrage, P., and Holm, C. Gene organization and primary structure of human hormone-sensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase of *Moraxella* TA144 an antarctic bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4897-4901, 1993.
- Le Goff, D. Follicular fluid lipoproteins in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid. *Biochim Biophys Acta* 1210:226-232, 1995.

- Leblond, C.P. and Clermont, Y. A definition of the stages of the cycles of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci* 55:548-573, 1952.
- Lee, O., Chang, C.C.Y., Lee, W., and Chang, T.-Y. Immunodepletion experiments suggest that acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) protein plays a major catalytic role in adult human liver, adrenal gland, macrophages, and kidney, but not in intestines. *J Lipid Res* 39:1722-1727, 1998.
- Lin, H.S., Sugawara, T., Strauss, J.F., Clark, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A., and Miller, W.L. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267:1828-1831, 1995.
- Liscum, L., Cummings, R.D., Anderson, R.G.W., DeMartino, G.N., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase: A transmembrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum with N-linked 'high-mannose' oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:7165-7169, 1983.
- Liscum, L. and Munn, N.J. Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1438:19-37, 1999.
- Loisel, G. Les graisses du testicule chez quelques mammifères. *Compt Rend Soc Biol* 55:1009-1015, 1903.
- Londos, C., Braseamle, D.L., Gruia-Gray, J., Servetnick, D.A., Schultz, C.J., Levin, D.M., and Kimmel, A.R. Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans* 23:611-615, 1995.
- Londos, C., Braseamle, D.L., Schultz, C.J., Segrest, J.P., and Kimmel, A.R. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Cell Dev Biol* 10:51-58, 1999.

- Lukyanenko, Y.O., Chen, J.J., and Hutson, J.C. Production of 25-hydroxycholesterol by testicular macrophages and its effects on Leydig cells. *Biol Reprod* 64:790-796, 2001.
- Maboundou, J.C., Fofana, M., Fresnel, J., Bocquet, J., and Le Goff, D. Effect of lipoproteins on cholesterol synthesis in rat Sertoli cells. *Biochem Cell Biol* 73:67-72, 1995.
- Mahmoud, I.Y., Cyrus, R.V., Bennett, T.M., Woller, M.J., and Montag, D.M. Ultrastructural changes in testes of the snapping turtle, *Chelydra serpentina* in relation to plasma testosterone, D 5-3 B-hydroxysteroid deshydrogenase, and cholesterol. *Gen Comp Endocrinol* 57:454, 1985.
- Mairal, A., Melaine, N., Laurell, H., Grober, J., Holst, L.S., Guillaudeux, T., Holm, C., Jégou, B., and Langin, D. Characterization of a novel testicular form of human hormone -sensitive lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 291:286-290, 2002.
- Martinet, L., Mondain-Monval, M., and Monnerie, R. Endogenous circannual rhythms and photorefractoriness of testis activity, moult and prolactin concentrations in mink (*Mustela vison*). *J Reprod Fertil* 95:325-338, 1992.
- Mathé, D. and Lutton, C. Le cholestérol: aspects dynamiques et métaboliques. *J Physiol* 79:41-97, 1984.
- Matsuda, H., Hakamata, H., Miyazaki, A., Sakai, M., Chang, C.C.Y., Chang, T.Y., Kobori, S., Shichiri, M., and Horiuchi, S. Activation of acyl CoA: cholesterol acyltransferase by cholesterol is not due to altered mRNA levels in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1301:76-87, 1996.
- McEnery, W.B. and Nelson, W.O. Cytochemical studies on testicular lipids. *Anat Rec* 106:221-227, 1950.

- Meigs, T.E. and Simoni, R.D. Farnesol as a regulator of HMG-CoA reductase degradation: characterization and role of farnesyl pyrophosphatase. *Arch Biochem Biophys* 345:1-9, 1997.
- Meiner, V., Cases, S., Myers, H.M., Sande, E.R., Bellosta, S., Schambelan, M., Pitas, R.E., McGuire, J., Herz, J., and Fareze, R.V. Disruption of the acyl-CoA: cholesterol acyltransferase gene in mice: evidence suggesting multiple cholesterol esterification enzymes in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14041-14046, 1996.
- Meiner, V., Tam, C., Gunn, M.D., Dong, L.M., and Weisgraber, K.H. 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* 38:1928-1933, 1997.
- Miller, S.C., Bowman, B.M., and Rowland, H.G. Structure, cytochemistry, endocytic activity and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial tissue macrophages. *Am J Anat* 168:1-13, 1983.
- Mills, N.C. Androgen effects on Sertoli cells. *Int J Androl* 13:123-134, 1990.
- Monod, J. From enzymatic adaptation to allosteric transitions. *Science* 154:475-483, 1966.
- Montagna, W. and Hamilton, J.B. Histological studies of human testes. I. The distribution of lipids. *Anat Rec* 109:635-640, 1951.
- Morris, M.D. and Chaikoff I.L. The origin of cholesterol in liver, small intestines, adrenal gland and testis of the rat: dietary versus endogenous contributions. *J Biol Chem* 234:1095-1097, 1959.

- Moyle, W.R., Jungas, R.L., and Greep R.O. Influence of luteinising hormone and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate on the metabolism of free and esterified cholesterol in mouse Leydig-cell tumors. *Biochem J* 134:407-413, 1973.
- Murphy, D.J. and Vance, J. Mechanism of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 24:109-115, 1999.
- Nazian, S.J., Brewer, L.D., and Ness, G.C. Pituitary regulation of the expression of the farnesyl pyrophosphate synthetase gene in the testes of the sexually maturing rat. *J Androl* 12:264-272, 1991.
- Nes, W.D., Lukyanenko, Y.O., Jia, Z.H., Quideau, S., Howald, W.N., Pratum, T.K., West, R.R., and Hutson, J.C. Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology* 141:953-958, 2000.
- Ness, G.C. Developmental regulation of the expression of genes encoding proteins involved in cholesterol homeostasis. *Am J Med Gen* 50:355-357, 1994.
- Ness, G.C. and Nazian, S.J. Developmental expression of multiple forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA in rat testis. *J Androl* 13:318-322, 1992.
- Ness, G.C., Sample, C.E., Smith, M., Pendleton, L.C., and Eichler, D.C. Characteristics of rat liver microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Biochem J* 233:167-172, 1986.
- Niemi, M. and Kormano, M. Cyclical changes in and significance of lipids and acid phosphatase activity in the seminiferous tubules of the rat testis. *Anat Rec* 151:159-170, 1965.
- Niemi, M., Sharpe, R.M., and Brown, W.R. Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tiss Res* 243:337-344, 1986.

- Nikolopoulou, M., Soucek, D.A., and Vary, J.C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 815:486-498, 1985.
- Noller, D.W., Flickinger, C.J., and Howards, S.S. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the guinea pig determined by tritiated thymidine autoradiography. *Biol Reprod* 17:532-534, 1977.
- Olsson, H. and Belfrage, P. Phosphorylation and dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Interactions between the regulatory and basal phosphorylation sites. *FEBS Lett* 232:78-82, 1988.
- Onstad, O. Studies on postnatal testicular changes, semen quality, and anomalies of reproductive organs in the mink. *Acta Endocr Copenh Suppl.* 117:1-117, 1967.
- Orgebin-Christ, M.C. and Djiane, J. Properties of a prolactin receptor from the rabbit epididymis. *Biol Reprod* 21:135-140, 1979.
- Osterlund, T., Danielsson, B., Degerman, E., Contreras, J.A., Edgren, G., Davis, R.C., Schotz, M.C., and Holm, C. Domain-structure analysis of recombinant rat hormone-sensitive lipase. *Biochem J* 319:411-420, 1996.
- Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F.B., Tsutsumi, O., and Yamada, N. 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, 2000.
- Paniagua, R., Rodriguez, M.C., Nistal, M., Fraile, B., and Amat, P. Changes in the lipid inclusion/Sertoli cell cytoplasm area ratio during the cycle of the human seminiferous epithelium. *J Reprod Fertil* 80:335-341, 1987.
- Parks, J.E. and Hammerstedt, R.H. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod* 32:653-668, 1985.

- Parvinen, M. Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocrine Rev* 3:404-417, 1982.
- Pelletier, R.-M. Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*), a seasonal breeder. *Am J Anat* 175:91-117, 1986.
- Pelletier, R.-M. Cyclic modulation of Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *Am J Anat* 183:68-102, 1988.
- Pelletier, R.-M. Blood-barriers of the epididymis and vas deferens act asynchronously with the blood barrier of the testis in the mink (*Mustela vison*). *Microsc Res Tech* 27:333-349, 1994.
- Pelletier, R.-M. A freeze-fracture study of cell junctions in the epididymis and vas deferens of a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *Microsc Res Tech* 30:1-17, 1995a.
- Pelletier, R.-M. 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* 16:400-409, 1995b.
- Pelletier, R.-M. The tight junctions in the testis, epididymis and vas deferens. In: *Tight Junctions*, edited by J.M. Anderson and M. Cereijido. London: CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, 2001, p. 183-197.
- Pelletier, R.-M. and Byers, S.W. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech* 20:3-33, 1992.
- Pelletier, R.-M. and Friend, D.S. Development of membrane differentiations in the guinea pig spermatid during spermiogenesis. *Am J Anat* 167:119-141, 1983a.

- Pelletier, R.-M. and Friend, D.S. The Sertoli cell junctional complex: Structure and permeability to filipin in the neonatal and adult guinea pig. *Am J Anat* 168:213-228, 1983b.
- Pelletier, R.-M., Okawara, Y., Vitale, M.L., and Anderson, J.M. Differential distribution of the tight-junction-associated protein ZO-1 isoforms α^+ and α^- in Guinea pig Sertoli cells: a possible association with f-actin and g-actin. *Biol Reprod* 57:367-376, 1997.
- Pelletier, R.-M. and Shivers, R.R. Filipin-sterol complexes in breeding and non-breeding mink (*Mustela vison*) Sertoli cell junctional membranes. *J Cell Biol* 103:365-372, 1986.
- Pelletier, R.-M. and Vitale, M.L. Filipin vs enzymatic localization of cholesterol in Guinea pig, Mink, and Mallard duck testicular cells. *J Histochem Cytochem* 42:1539-1554, 1994.
- Perryman, P.L. and Thorner, M.O. The effects of hyperprolactinaemia in sexual and reproductive function in men. *J Androl* 2:233-242, 1981.
- Petrie, R. and Morales, C.R. Receptors-mediated endocytosis of testicular transferrin by germinal cells of the rat testis. *Cell Tiss Res* 267:45-55, 1992.
- Pokel, J.D., Moyle, W.R., and Greep, R.O. Depletion of esterified cholesterol in mouse testes and Leydig cell tumors by luteinizing hormone. *Endocrinology* 91:323-325, 1972.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E., and Parton, R.G. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol* 152:1057-1070, 2001.

- Potter, J.E.R., Millette, C.F., and Kandustsch, A.A. Elevated cholesterol and dolichol synthesis in mouse pachytene spermatocytes. *J Biol Chem* 256:7150-7154, 1981.
- Prattes, S., Horl, G., Hammer, A., Blaschits, A., Graier, W.F., Sattler, W., Zechner, R., and Steyrer, E. Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures. *J Cell Sci* 113:2977-2989, 2000.
- Purvis, K., Clausen, O.P.F., Olsen, A., Harog, E., and Hanson, V. Prolactin and Leydig cell responsiveness to LH/hCG in the rat. *Arch Androl* 3:219-230, 1979.
- Rana, A.P.S., Majumder, G.C., Misra, S., and Ghosh, A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 1061:185-196, 1991.
- Reaven, E., Lua, Y., Nomoto, A., Temel, R., Williams, D.L., van der Westhuyzen, D.R., and Azhar, S. The selective pathway and a high-density lipoprotein receptor (SR-BI) in ovarian granulosa cells of the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1436:565-576, 1999.
- Reaven, E., Zhan, L., Nomoto, A., Leers-Sucheta, S., and Azhar, S. Expression and microvillar localisation of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis. *J Lipid Res* 41:343-356, 2000.
- Reinhart, M.P. Intracellular sterol trafficking. *Experientia* 46:599-611, 1990.
- Renston, J.P., Ihrig, T.J., Renston, R.H., Gondos, B., and Morin, R.J. Cholesterol ester hydrolysis by homogenates of whole testis, seminiferous tubules and interstitial cells of mature rats. *J Endocr* 75:235-243, 1977.

- Renston, R.H., Ihrig, T.J., Renston, J.P., and Gondos, B. Concentrations of free and esterified cholesterol in the testes of maturing rabbits. *J Reprod Fertil* 43:91-95, 1975.
- Rigotti, A., Trigatti, B.L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., and Krieger, M. 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, 1997.
- Robaire, B. and Hermo, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferents: structure, functions, and their regulation. In: *The physiology of reproduction*, edited by E. Knobil and J.D. Neill. New York: 1988, p. 999-1080.
- Roitelman, J., Olender, E.H., Bar-Nun, S., Dunn, W.A., and Simoni, R.D. Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: Implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 117:959-973, 1992.
- Russell, L.D. Sertoli-germ cell interrelations: A review. *Gamete Res* 3:179-202, 1980.
- Saez, J.M., Lejeune, H., Avalet, O., Habert, R., and Durand, P. Le contrôle des fonctions différenciées des cellules de Leydig. *Méd/Sci* 11:547-553, 1985.
- Saltiel, A.R. Another hormone-sensitive triglyceride lipase in fat cells? *Proc Natl Acad Sci USA* 97:535-537, 2000.
- Sanborn, B.M., Steinberger, A., and Lee, A. Subcellular distribution of androgen binding sites in cultured Sertoli cells before and after exposure to androgen. *J Steroid Biochem* 14:133-340, 1981.
- Sato, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co A reductase prevent phosphorylation by AMP-

activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9261-9265, 1993.

Schreiber, J.R., Weinstein, D.B., and Hsueh, A.J.H. Lipoproteins stimulate androgen production by cultured rat testis cells. *J Steroid Biochem* 16:39-43, 1982.

Schuler, L.A., Toaff, M.E., and Strauss, J.F. Regulation of ovarian cholesterol metabolism: control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A : cholesterol acyltransferase. *Endocrinology* 108:1476-1486, 1981.

Scott, T.W., Voglmayr, J.K., and Setchell, B.P. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Biochem J* 102:456-461, 1967.

Seki, N., Toyama, Y., and Nagano, T. Changes in the distribution of Filipin-sterol complexes in the boar sperm head plasma membrane during epididymal maturation and in the uterus. *Anat Rec* 232:221-230, 1992.

Servetnick, D.A., Braseamle, D.L., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R., Wolff, J., and Londos, C. Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenesis adrenal cortical and Leydig cells. *J Biol Chem* 270:16970-16973, 1995.

Setchell, B.P. and Waites, G.M.H. The blood-testis barrier. In: *Handbook of physiology*, edited by K.W. Hamilton and R.O. Greep. Washington: American Physiological Society, DC., 1975, p. 143-172.

Shand, J.H. and West, D.W. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity in the rat mammary gland: variation during pregnancy and lactation. *Lipids* 26:150-154, 1991.

Sheriff, D.S. Effect of prolactin on testicular lipid metabolism in pubertal rats. *Horm Res* 23:60-63, 1986.

- Shiratsuchi, A., Kawasaki, Y., Ikemoto, M., Arai, H., and Nakanishi, Y. Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Sertoli cells. *J Biol Chem* 274:5901-5908, 1999.
- Shiratsuchi, A., Umeda, M., Ohba, Y., and Nakanishi, Y. Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by Sertoli cells of the rat. *J Biol Chem* 272:2354-2358, 1997.
- Silverstein, S.C., Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. Endocytosis. *Ann Rev Biochem* 46:669-722, 1977.
- Small, C.A., Goodacre, J.A., and Yeaman, S.J. Hormone-sensitive lipase is responsible for the neutral cholesterol ester hydrolase activity in macrophages. *FEBS Lett* 247:205-208, 1989.
- Small, C.A., Yeaman, S.J., West, D.W., and Clegg, R.A. Cholesterol ester hydrolysis and hormone-sensitive lipase in lactating rat mammary tissue. *Biochim Biophys Acta* 1082:251-254, 1991.
- Steinberg, D. A docking receptor for HDL cholesterol esters. *Science* 271:460-261, 1996.
- Stenson Holst, L., Hoffman, A.R., Mulder, H., Sundler, F., Holm, C., Bergh, A., and Fredrikson, G. Localization of hormone-sensitive lipase to rat Sertoli cells and its expression in developing and degenerating testes. *FEBS Lett* 355:125-130, 1994.
- Stenson Holst, L., Langin, D., Mulder, H., Laurell, H., Grober, J., Bergh, A., Mohrenweiser, H.W., Edgren, G., and Holm, C. Molecular cloning, genomic organization, and expression of a testicular isoform of hormone-sensitive lipase. *Genomics* 35:441-447, 1996.

- Stralfors, P., Olsson, H., and Belfrage, P. Hormone-sensitive lipase. In: *The Enzymes*, edited by P.D. Boyer and E.G. Krebs. New York: 1987, p. 147-177.
- Strauss, J.F., Schuler, L.A., Rosenblum, M.F., and Tanaka, T. Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv Lipid Res* 18:99-157, 1981.
- Suckling, K.E. and Stange, E.F. Role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J Lipid Res* 26:647-671, 1985.
- Suckling, K.E., Stange, E.F., and Dietschy, J.M. Dual modulation of hepatic and intestinal acylCoA: cholesterol acyltransferase activity by (de-) phosphorylation and substrate supply *in vitro*. *FEBS Lett* 151:111-116, 1983a.
- Suckling, K.E., Tocher, D.R., Smellie, C.G., and Boyd, G.S. *In vitro* regulation of bovine adrenal cortical acylCoA: cholesterol acyl transferase and comparison with the rat liver enzyme. *Biochim Biophys Acta* 753:422-429, 1983b.
- Sugawara, T., Holt, J.A., Driscoll, D., Strauss III, J.F., Lin, D., Miller, W.L., Patterson, D., Clancy, K.P., Hart, I.M., Clark, B.J., and Stocco, D.M. Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression and mapping of the gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4778-4782, 1995.
- Sugkraroek, P., Kates, M., Leader, A., and Tanphaichitr, N. 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, 1991.
- Sundqvist, C., Ellis, Le.C., and Bartke, A. Reproductive endocrinology of the mink (*Mustela vison*). *Endocrine Rev* 9:247-266, 1988.
- Svensson, P.-A., Johnson, M.S.C., Ling, C., Carlsson, L.M.S., Billig, H., and Carlsson, B. Scavenger receptor class B type I in the rat ovary: possible role in high

- density lipoprotein cholesterol uptake and in the recognition of apoptotic granulosa cells. *Endocrinology* 140:2494-2500, 1999.
- Sviridov, D. Intracellular cholesterol trafficking. *Histol Histopathol* 14:305-319, 1999.
- Tabas, I., Rosoff, W.J., and Boykow, G.C. Acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase in macrophages utilizes a cellular pool of cholesterol oxidase-accessible cholesterol as substrate. *J Biol Chem* 263:1266-1272, 1988.
- Trigatti, B., Rayburn, H., Vinals, M., Braun, A., Miettinen, H., Penman, M., Hertz, M., Schrenzel, M., Amigo, L., Rigotti, A., and Krieger, M. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9322-9327, 1999.
- Trzeciak, W.H. and Boyd, G.S. The effect of stress induced by ether anaesthesia on cholesterol content and cholesteryl-esterase activity in rat-adrenal cortex. *Eur J Biochem* 37:327-333, 1973.
- Uelmen, P.J., Oka, K., Sullivan, M., Chang, C.C.Y., Chang, T.Y., and Chan, L. Tissue specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. *J Biol Chem* 270:26192-26201, 1995.
- Vahouny, G.V., Chandebhan, R., and Kharroubi, A. Sterol and lipid transfer proteins. *Adv Lipid Res* 22:83-113, 1987.
- VanMeer, G. Caveolin, cholesterol, and lipid droplets? *J Cell Biol* 152:F29-34, 2001.
- Venkatesan, S., Mitropoulos, K.A., Balasubramaniam, S., and Peters, T.J. Biochemical evidence for the heterogeneity of membranes from rat liver endoplasmic reticulum. Studies on the localisation of acyl-CoA: cholesterol acyl transferase. *Eur J Cell Biol* 21:167-174, 1980.

- Wang, N., Arai, T., Rinninger, F., and Tall, A.R. Liver-specific overexpression of SR-BI decreases levels of VLDL lipoprotein apo B, LDL lipoprotein apo B and HDL lipoprotein in transgenic mice. *J Biol Chem* 273:32920-32926, 1998.
- Wang, S.M. and Fong, T.H. A lipid droplets-specific capsule is present in rat adrenal cells:evidence from a monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 217:81-88, 1995.
- Warner, G.P., Stoudt, G., Bamberger, M., Johnson, W.J., and Rothblat, G.H. Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. *J Biol Chem* 270:5772-5778, 1995.
- Webb, N.R., Connell, P.M., Graf, G.A., Smart, E.J., de Villiers, W.J.S., de Beer, F.C., and van der Westhuyzen, D.R. 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, 1998.
- Webb, N.R., de Villiers, W.J.S., Connell, P.M., de Beer, F.C., and van der Westhuyzen, D.R. Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J Lipid Res* 38:1490-1495, 1997.
- Wee, S.F. and McLean Grogan, W. Testicular temperature-labile cholesteryl ester hydrolase. *J Biol Chem* 268:8158-8163, 1993.
- Werbin, H. and Chaikoff I.L. Utilization of adrenal gland cholesterol for synthesis of cortisol by the intact normal and ACTH-treated guinea pig. *Arch Biochem Biophys* 93:476-482, 1961.
- Wiebe, J.P. and Tilbe, K.S. *De novo* synthesis of steroids (from acetate) by isolated rat Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 89:1107-1113, 1979.

- Wood, S.L., Emmison, N., Borthwick, A.C., and Yeaman, S.J. The protein phosphatases responsible for dephosphorylation of hormone-sensitive lipase in isolated rat adipocytes. *Biochem J* 295:531-535, 1993.
- Wright, W.W., Parvinen, M., Musto, N.A., Gunsalus, G.L., Phillips, D.M., Mather, J.P., and Bardin, C.W. Identification of stage-specific proteins synthesized by rat seminiferous tubules. *Biol Reprod* 29:257-270, 1981.
- Yago, N., Kobayashi, S., Sekiyama, S., Kurōkawa, H., and Iwai, Y. Further studies on the submitochondrial localization of cholesterol side-chain cleavage enzyme. *J Biochem* 68:775-780, 1970.
- Yeagle, P.L. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 822:267-287, 1985.
- Yeagle, P.L. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J* 3:1833-1842, 1989.
- Yeaman, S.J. Hormone-sensitive lipase - a multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1052:128-132, 1990.
- Zibara, K., Malaud, E., and McGregor, J.L. 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* 2:14-21, 2002.
- Zipf, W.B., Payne, A.H., and Kolch, R.P. Prolactin, growth hormone and luteinizing hormone in the maintenance of testicular luteinizing hormone receptors. *Endocrinology* 103:595-600, 1978.

