

2m11.3172.6

Université de Montréal

Expression différentielle des récepteurs «scavenger» de classe B  
de type I (SR-BI) et de type II (SR-BII) dans le testicule  
de souris et de vison

Par

Casimir D. Akpovi

Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès science (M.Sc.)

Mars 2004

© Casimir D. Akpovi



W

4

V58

2004

V.072

**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.

Identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Expression différentielle des récepteurs «scavenger» de classe B  
de type I (SR-BI) et de type II (SR-BII) dans le testicule  
de souris et de vison

présenté par :

Casimir D. Akpovi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur :	Dr. Nicole Leclerc
Directeur de recherche :	Dr. R.-Marc Pelletier
Codirectrice de recherche :	Dr. Maria L. Vitale
Membre du jury :	Dr. Bruce Murphy

## RÉSUMÉ

Les cellules de Sertoli possèdent la capacité de synthétiser du cholestérol à partir de l'acétate *in vitro*. Toutefois, il n'y a aucune évidence que ces cellules en font autant *in vivo* ou qu'elles en font assez pour justifier l'égle répartition du cholestérol total dans les deux compartiments cellulaires du testicule que sont le tissu interstitiel et les tubules séminifères. En outre, le fait que la barrière hémato-testiculaire prévient le libre passage de substances incluant le cholestérol et les cellules du sang vers les tubules suggère que le cholestérol est transporté dans l'épithélium séminifère par un mécanisme qui contournerait la barrière. Nous avons mesuré l'expression des récepteurs «scavenger» de classe B de type I (SR-BI) et son isoforme SR-BII qui, selon notre hypothèse, seraient impliqués dans ce processus. Nous avons utilisé deux modèles animaux, la souris (*Mus musculus*) qui est un animal à activité reproductive continue comme chez l'homme et le vison (*Mustela vison*) dont le cycle reproductif est saisonnier c'est-à-dire qu'il se caractérise par une phase active de spermatogenèse suivie d'une phase inactive. Nous avons détecté une bande immunoréactive de 85 kDa et de 82 kDa de SR-BI, respectivement chez la souris et le vison, dans le testicule, le foie, le rein, le cerveau et le cœur. La bande immunoréactive de 85 kDa de SR-BII détectée chez les deux animaux était significativement plus intense dans le testicule comparé aux autres tissus testés. Dans le testicule, l'expression de SR-BI et de SR-BII était mesurée durant le développement post-natal chez la souris et le vison et à chaque mois du cycle reproductif annuel saisonnier chez le vison dans les fractions enrichies en tubules séminifères (STf) et en tissu interstitiel (ITf). L'expression de chaque récepteur était ensuite quantifiée afin d'accéder au rôle individuel de chacun d'eux dans chacun des deux compartiments

cellulaires du testicule en relation avec l'activité spermatogénétique. Chez la souris, seule l'expression de SR-BI augmentait avec l'activité spermatogénétique dans les tubules et avec l'achèvement de la puberté dans le compartiment interstitiel alors que chez le vison, l'expression maximale de SR-BI et de SR-BII coïncidait avec la fin du développement dans les deux compartiments cellulaires du testicule. Chez le vison adulte, l'expression de SR-BI augmentait significativement d'octobre à février et baissait de mars à juin dans les ITf et les STf. A l'opposée, l'expression de SR-BII était faible entre octobre et décembre et élevée entre janvier et février dans les STf. Dans les ITf cependant, l'expression de SR-BII était significativement augmentée de novembre à juin, mais diminuait sitôt après. Ces résultats supportent l'hypothèse que le SR-BI et le SR-BII seraient impliqués dans le transport intratesticulaire et intratubulaire du cholestérol et que les deux récepteurs joueraient des rôles différents dans ce processus.

**MOTS CLÉS** : vison, activité spermatogénétique, récepteur «scavenger» de classe B de type I (SR-BI), récepteur «scavenger» de classe B de type II (SR-BII), cholestérol.

## SUMMARY

The Sertoli cells have been shown to possess the capacity to synthesize cholesterol from acetate *in vitro*. However, there is no evidence that cells do so *in vivo* nor that they would be responsible for maintaining the total cholesterol concentration similar in the two cellular compartments of the testis namely, the seminiferous tubules and the interstitial tissue. Moreover, the fact that a blood-testis barrier prevents the free passage of substances including cholesterol and cells from the blood into the tubules suggests that the compound is transported into the seminiferous epithelium by a mechanism that allows bypassing the barrier. We measured the expression of the scavenger receptor class B type I (SR-BI) and its isoform SR-BII who we hypothesize are involved in this process. The mink, a seasonal breeder and the mouse were used as the animal models in this study. We detected an immunoreactive band of 85 kDa and 82 kDa of SR-BI, respectively in the mouse and mink, in the testis, the liver, the kidney, the brain and the heart. The immunoreactive band of 85 kDa of SR-BII detected in the two animals was significantly more intense in the testis compared with other tissues. In the testis, SR-BI and SR-BII expression were measured during the postnatal development in the mouse and mink and once a month throughout the annual seasonal reproductif cycle in seminiferous epithelium (STf) and interstitial tissue fractions (ITf) respectively to assess the individual role of each receptor in each of the two compartment of the testis in relation to the spermatogenic activity. In the mouse, only SR-BI expression increased with spermatogenetic activity in the tubules and with the completion of the puberty in the interstitial compartment whereas in mink, the maximum expression of SR-BI and SR-BII coincided with the end of the development in the two cellular compartments of the testis. In adult mink, SR-BI expression significantly increased from October to

February and decreased from March to June in the STf and ITf. Conversely, SR-BII expression significantly decreased from October to December but increased from January to February in the STf. In the ITf however, SR-BII expression significantly decreased from November to June but decreased thereafter. The results support the concepts that SR-BI and SR-BII are involved in the intratesticular and intratubular cholesterol movement and transport and that the two receptors play distinct roles in these processes.

**KEY WORDS:** mink, spermatogenic activity, scavenger receptor class B type I, scavenger receptor class B type II, cholesterol.



TABLE DES MATIÈRES	PAGE
Page titre .....	i
Identification du jury .....	ii
Résumé .....	iii
Summary .....	v
Table des matières .....	vii
Liste de schémas .....	xii
Liste des figures .....	xiii
Liste des abréviations .....	xiv
Remerciements .....	xvi
Avant-propos .....	xviii
<b>1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1 Aperçu de la spermatogenèse .....	2
1.2 Lipides testiculaires : localisations et rôles .....	4
1.2.1 Triglycérides et (TG) phospholipides.....	4
1.2.2 Cholestérol total (libre et estérifié) .....	6
1.2.2.1 Tissu interstitiel .....	6
1.2.2.2 Tubules séminifères .....	8
1.2.2.3 Spermatozoïdes .....	10
1.3 Transporteurs de cholestérol dans le testicule .....	12
1.4 Récepteur «Scavenger» de classe B de type I (SR-BI) .....	13
1.4.1 Propriétés moléculaires .....	13
1.4.1.1 Structures moléculaires .....	13
1.4.1.2 Isoforme de SR-BI .....	15
1.4.1.3 Ligands .....	17
1.4.2 SR-BI et la captation sélective des esters de cholestérol dans le testicule .....	19
1.4.2.1 Rôle des HDL .....	19
1.4.2.2 Mécanisme de captation sélective des esters de cholestérol .....	20

1.4.3	Régulation de l'expression de SR-BI et SR-BII dans le testicule	22
1.4.4	Localisation de l'expression de SR-BI et SR-BII dans le testicule	23
1.4.4.1	Cellules de Leydig	23
1.4.4.2	Macrophages	24
1.4.4.3	Cellules de Sertoli et cellules germinales	25
1.5	Hypothèse de travail	25
<b>2</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>28</b>
2.1	Prélèvement et traitement des tissus	28
2.1.1	Justification du choix des animaux	28
2.1.1.1	Souris	28
2.1.1.2	Vison	28
2.1.2	Prélèvement des testicules	29
2.1.3	Isolation des fractions enrichies en tubules séminifères (STf) et en tissu interstitiel (ITf)	30
2.1.3.1	Digestion enzymatique	30
2.1.3.2	Isolation manuelle	31
2.1.4	Isolation des spermatozoïdes épидидymaires	32
2.1.5	Préparation des fractions membranaire et cytosolique de spermatozoïdes	32
2.1.6	Prélèvement et traitement des autres tissus	33
2.2	Anticorps et produits chimiques	33
2.2.1	Anticorps	33
2.2.1.1	Premiers anticorps	33
2.2.1.2	Deuxièmes anticorps conjugués à la peroxydase	34
2.2.2	Produits chimiques	34

2.3	Western blot .....	34
2.3.1	Dosage des protéines des échantillons .....	34
2.3.2	Électrophorèse sur gels dénaturants SDS-PAGE .....	35
2.3.3	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose .....	35
2.3.4	Immunobuvardage des membranes .....	36
2.3.5	Quantification des bandes obtenues en Western blot .....	36
<b>3</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Étude de l'expression de SR-BI .....</b>	<b>39</b>
3.1.1	Identification de la bande immunoréactive qui correspond à SR-BI .....	39
3.1.2	Étude de l'expression de SR-BI chez la souris .....	39
3.1.2.1	Résultats des analyses de Western blot.....	39
3.1.2.1.1	Analyses de SR-BI dans des tissus de souris normale adulte .....	39
3.1.2.1.2	Analyses de SR-BI dans le testicule de souris au cours du développement post-natal .....	40
3.1.2.1.3	Analyse de l'expression de la vimentine dans les STf de souris .....	40
3.1.2.2	Résultats des analyses densitométriques .....	41
3.1.2.2.1	Expression de SR-BI dans des tissus de souris normale adulte .....	41
3.1.2.2.2	Expression de SR-BI dans le testicule de souris au cours du développement post-natal .....	41
3.1.3	Étude de l'expression de SR-BI chez le vison .....	42
3.1.3.1	Résultats des analyses de Western blot .....	42
3.1.3.1.1	Analyses de SR-BI dans des tissus de vison ....	42
3.1.3.1.2	Analyses de SR-BI dans le testicule de vison ...	43
3.1.3.1.3	Analyses de l'expression de la vimentine et de la clustérine dans les STf de vison .....	43

3.1.3.1.4	Expression de SR-BI dans les spermatozoïdes épидидymaires de vison .....	44
3.1.3.2	Résultats des analyses densitométriques .....	44
3.1.3.2.1	Expression de SR-BI dans des tissus de vison ..	44
3.1.3.2.2	Expression de SR-BI dans le testicule du vison.	45
<b>3.2</b>	<b>Étude de l'expression de SR-BII .....</b>	<b>46</b>
3.2.1	Identification de la bande immunoréactive qui correspond à SR-BII .....	46
3.2.2	Étude de l'expression de SR-BII chez la souris .....	47
3.2.2.1	Résultats des analyses de Western blot.....	47
3.2.2.1.1	Analyses de SR-BII dans des tissus de souris normale adulte .....	47
3.2.2.1.2	Analyses de SR-BII dans le testicule de souris au cours du développement post-natal .....	47
3.2.2.2	Résultats des analyses densitométriques .....	47
3.2.2.2.1	Expression de SR-BII dans des tissus de souris normale adulte .....	47
3.2.2.2.2	Expression de SR-BII dans le testicule de souris au cours du développement post-natal .....	48
3.2.3	Étude de l'expression de SR-BII chez le vison .....	48
3.2.3.1	Résultats des analyses de Western blot .....	48
3.2.3.1.1	Analyses de l'expression de SR-BII dans des tissus de vison .....	48
3.2.3.1.2	Analyses de l'expression de SR-BII dans le testicule de vison .....	48
3.2.3.1.3	Expression de SR-BII dans les spermatozoïdes épидидymaires de vison .....	49
3.2.3.2	Résultats des analyses densitométriques .....	49
3.2.3.2.1	Expression de SR-BII dans des tissus de vison .	49

	3.2.3.2.2 Expression de SR-BII dans le testicule du vison	50
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	74
4.1	Méthodologie: isolation des fractions enrichies en tubules séminifères (STf) et en tissu interstitiel (ITf)	74
4.2	Étude de l'expression de SR-BI et SR-BII	75
4.2.1	Expression de SR-BI	75
4.2.1.1	Contrôle	75
4.2.1.2	Expression de SR-BI chez la souris	75
4.2.1.3	Expression de SR-BI chez le vison	79
4.2.2	Expression de SR-BII	83
4.2.2.1	Contrôle	83
4.2.2.2	Expression de SR-BII chez la souris	84
4.2.2.3	Expression de SR-BII chez le vison	86
4.3	<b>Conclusion</b>	89
4.4	<b>Perspectives futures</b>	90
<b>5</b>	<b>Bibliographie</b>	92

**Liste des schémas**

	PAGE
Schéma 1	Diagramme schématique de la spermatogenèse durant le développement post-natal chez la souris ..... 4
Schéma 2	Représentation schématique d'une portion du testicule ..... 11
Schéma 3	Représentation structurale de la protéine de SR-BI ..... 14
Schéma 4	Diagrammes schématiques montrant les domaines C-terminales et l'expression relative de l'ARNm de SR-BI et SR-BII ..... 17
Schéma 5	Modèle de prise sélective de lipides dérivés de HDL médié par SR-BI ..... 22
Schéma 6	Illustration des stades cellulaires caractéristiques de l'épithélium séminifère à chaque mois du cycle reproductif annuel saisonnier chez le vison adulte ..... 38

<b>Liste des figures</b>	<b>PAGE</b>
Figure 1	Analyses par Western blot de l'expression de SR-BI chez la souris..... 52
Figure 2	Quantification de l'expression de SR-BI chez la souris.....54
Figure 3	Analyses par Western blot de l'expression de SR-BI chez le vison ..... 56
Figure 4	Analyses par Western blot de l'expression de SR-BI dans les spermatozoïdes épидидymaires de vison .....56
Figure 5	Quantification de l'expression de SR-BI chez le vison.....60
Figure 6	Analyses par Western blot de l'expression de SR-BII chez la souris ..... 63
Figure 7	Quantification de l'expression de SR-BII chez la souris .....65
Figure 8	Analyses par Western blot de l'expression de SR-BII chez le vison ..... 67
Figure 9	Analyses par Western blot de l'expression de SR-BII dans les spermatozoïdes épидидymaires de vison .....69
Figure 10	Quantification de l'expression de SR-BII chez le vison .....71

**Liste des abréviations**

mA:	milliampère
BBP:	bleu de bromophénol
bpV (phen) :	Potassium Bisperoxo(1,10-phenanthroline)oxovanadate(V)
BSA:	albumine sérique de bovin
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
HSL:	hormone sensitive lipase
HDL:	high density lipoprotein
ITf:	interstitiel tissu enriched fractions
j:	jour
K-O:	knock-out
LDL:	low density lipoprotein
PMSF:	phenylmethylsulfonyl fluoride
PBS:	phosphate buffered saline
PS:	phosphatitylsérine
Rpm:	révolutions par minute
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
Spz:	spermatozoa
SR-BI:	scavenger receptor class B type I
SR-BII:	scavenger receptor class B type II
STf:	seminiferous tubules enriched fractions
TBS:	tris buffered saline



*Je dédie ce travail à tous ceux qui  
peinent pour faire de ma vie  
une réussite.*

## Remerciement

Ce mémoire est le fruit des efforts louables et des sacrifices consentis par certaines personnes à qui je ne témoignerai jamais assez ma reconnaissance :

Mes plus vifs remerciements et ma plus profonde reconnaissance s'adressent à mon directeur, Dr. **Réal-Marc Pelletier**. À un moment où j'avais perdu tout espoir, il a cru en moi en m'offrant une opportunité unique, celle de réaliser ma maîtrise au sein de son équipe. En patron exemplaire, il a su me prodiguer un savant mélange de sagesse et de rigueur scientifique au cours de palpitantes discussions souvent remplies d'émotions.

Je remercie chaleureusement ma codirectrice de recherche, Dr. **María Leiza Vitale** pour ses conseils, son assistance et pour tous les efforts qu'elle a consentis pour la réalisation de ce travail.

Je voudrais remercier Dr. **Louise Brissette** pour les souris knock-out qu'elle a bien voulu mettre à notre disposition.

J'exprime toute ma gratitude à Dr. **Eloisa Carbajal** pour ses conseils et toute la patience dont elle a fait preuve alors que je devrais apprendre d'elle toutes les techniques nécessaires pour l'accomplissement de ce travail.

A **Emile Silvas** et à **Robin Young**, qui ont été pour moi plus que des collègues, je témoigne toute ma reconnaissance pour l'amitié et l'assistance qu'ils ont su me procurer.

Tous mes remerciements à Dr. **Mireille Le Jossec** pour son assistance et ses conseils qui m'ont été d'une grande aide pour la réalisation de ce travail.

J'aimerais également exprimer toute ma gratitude à **Roger F. Jutras** pour son soutien, son assistance et son aide.

À mes collègues de laboratoire dont **Marie-Eve Fortin, Zheng Guifu, Sara Solinet et Li Chen**, j'exprime toutes mes reconnaissances pour la bonne ambiance qu'elles ont su faire régner aux laboratoires, pour leurs aides, leur amitié et leur soutien.

J'exprime également ma profonde gratitude à mes parents qui m'ont continuellement encouragé dans mes projets d'études. Je les remercie pour leur soutien et leur présence.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, je voudrais dire merci.

### **Avant-propos**

Nous avons participé à différents congrès au cours desquels certains résultats contenus dans ce mémoire ont été présentés.

### **Abstracts publiés dans les journaux revus par les pairs**

Akpovi CD, Vitale ML, Pelletier RM (2004). Expression of the scavenger receptor class B type I (SR-BI) and its isoform SR-BII in the tissues and in the two cellular compartments of the testis in a seasonal breeder, the mink (*Mustela vison*). *Biology of Reproduction*. In press.

Chen L, Akpovi CD, Ong H, Vitale ML, Pelletier RM (2004). CD36 influences differently the expression of distinct isoforms of the hormone-sensitive lipase in each compartment of the testis. *Biology of Reproduction*. In press.

Akpovi CD, Vitale ML, Pelletier RM (2003). L'expression du "scavenger receptor class B type I" (SR-BI) dans le testicule augmente avec l'activité spermatogénétique. *Médecine/Sciences* 19 (Suppl 2): Abstr. 55, 14.

Akpovi CD, Vitale ML, Pelletier RM (2002). Etude de l'expression de la protéine du "scavenger receptor class B type II" (SR-BII) dans le testicule de vison (*Mustela vison*). *Médecine/Sciences* 18 (Suppl 2): Abstr. 184, 38.

### **Présentation par poster**

Akpovi CD, Vitale ML, Pelletier RM. (2004). The expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) and of its isoform SR-BII varies with the spermatogenic activity. Journée annuelle de la recherche du département d'obstétrique-gynécologie. Université de Montréal.

Akpovi CD, Vitale ML, Pelletier RM. (2004). Expression des récepteurs «scavenger» de classe B de type I (SR-BI) et de type II (SR-BII) dans le testicule au cours du développement post-natal chez la souris. 72<sup>e</sup> congrès de l'ACFAS.

Akpovi CD, Vitale ML, Pelletier RM (2003). Expression différentielle du "scavenger receptor class B type II" (SR-BII) dans différents tissus du vison (*Mustela vison*). 71<sup>e</sup> congrès de l'ACFAS.

Akpovi CD, Vitale ML, Pelletier RM (2003). Variation de l'expression du "scavenger receptor class B type II" (SR-BII) dans le testicule au cours du cycle reproductif annuel et saisonnier chez le vison (*Mustela vison*). 20<sup>e</sup> journée scientifique du département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal.

## 1. Introduction

Les tissus stéroïdogéniques tels que la surrénale, les gonades et le placenta sont uniques en ce sens qu'ils nécessitent du cholestérol non seulement pour la biogenèse membranaire, mais aussi comme précurseur de la synthèse d'hormones stéroïdiennes (Gwynne et Strauss, 1982 ; Stocco et Clark, 1996). Ces tissus sont équipés d'enzymes qui effectuent les réactions conduisant à la synthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol (Hall, 1984 ; Hanukoglu, 1992). Bien que le type d'hormone produite diffère avec le tissu stéroïdogénique, la première étape du processus biosynthétique, commune à tous ces tissus, est la conversion du cholestérol en pregnenolone (Jefcoate et coll., 1992 ; Stocco et Clark, 1996). La stéroïdogénèse dépend d'un apport constant de cholestérol dans la cellule (Liscum et Munn, 1999 ; Stocco, 2000). Plusieurs sources contribuent au maintien du "pool" intracellulaire du cholestérol. 1) Le cholestérol peut être synthétisé *de novo* dans le réticulum endoplasmique lisse (Andersen et Dietschy, 1978 ; Spady et Dietschy, 1983), 2) il peut être obtenu à partir des lipoprotéines sériques, 3) il peut être le résultat de l'hydrolyse d'esters de cholestérol stockés dans des gouttelettes lipidiques (Pedersen, 1988 ; Hui, 1996) 4) et enfin, il peut provenir des membranes cellulaires (Lange et coll., 1988).

La cellule de Sertoli est une cellule bipolaire. Elle est capable d'endocyter, à partir de sa région basale, des constituants hydrophobiques tel que le cholestérol (Fofana et coll., 1996) et sa région apicale de phagocyter les corps résiduels riches en gouttelettes lipidiques et relâchés par les spermatides matures (Pelletier et Vitale, 1994).

Dans les cellules de Leydig, la contribution à la production hormonale du cholestérol synthétisé *de novo* est d'environ 60 % et celle du cholestérol dérivé de lipoprotéines sériques est autour de 40 % (Morris et Chaikoff, 1959). Des études ont

rapporté que la captation des esters de cholestérol dérivés des LDL et des HDL au niveau des cellules de Leydig contribuerait à la synthèse de la testostérone (Azhar et Menon, 1982 ; Risbridger et Hedger, 1992). Le système des pores de l'endothélium capillaire permet le passage des LDL et des HDL du sang vers les cellules du tissu interstitiel notamment des cellules de Leydig (Mayerhofer et coll., 1989). Les cellules de Sertoli par contre sont séparées de l'accès aux lipoprotéines sériques par une barrière hémato-testiculaire qui sépare l'épithélium séminifère en un compartiment basal où se retrouvent les cellules germinales jeunes et un compartiment lumenal contenant les cellules germinales méiotiques et post-méiotiques. Cette barrière hémato-testiculaire, faite de jonctions occlusives (Pelletier et Byers, 1992 ; Pelletier, 2001), exclurait le passage de cholestérol dérivé des LDL sanguins vers les tubules, mais permettrait celui des HDL (Yurchenko et Schittny, 1990 ; Le Goff 1994).

Cette présente étude se propose d'examiner l'implication possible du récepteur «scavenger» de classe B de type I (SR-BI), spécialisé dans la captation et la livraison sélective du cholestérol (notamment dérivé des HDL) (Krieger, 1999 ; Williams et coll., 1999 ; Silver et Tall, 2001), et de son isoforme SR-BII dans le transport sélectif du cholestérol sanguin au-delà de la barrière hémato-testiculaire

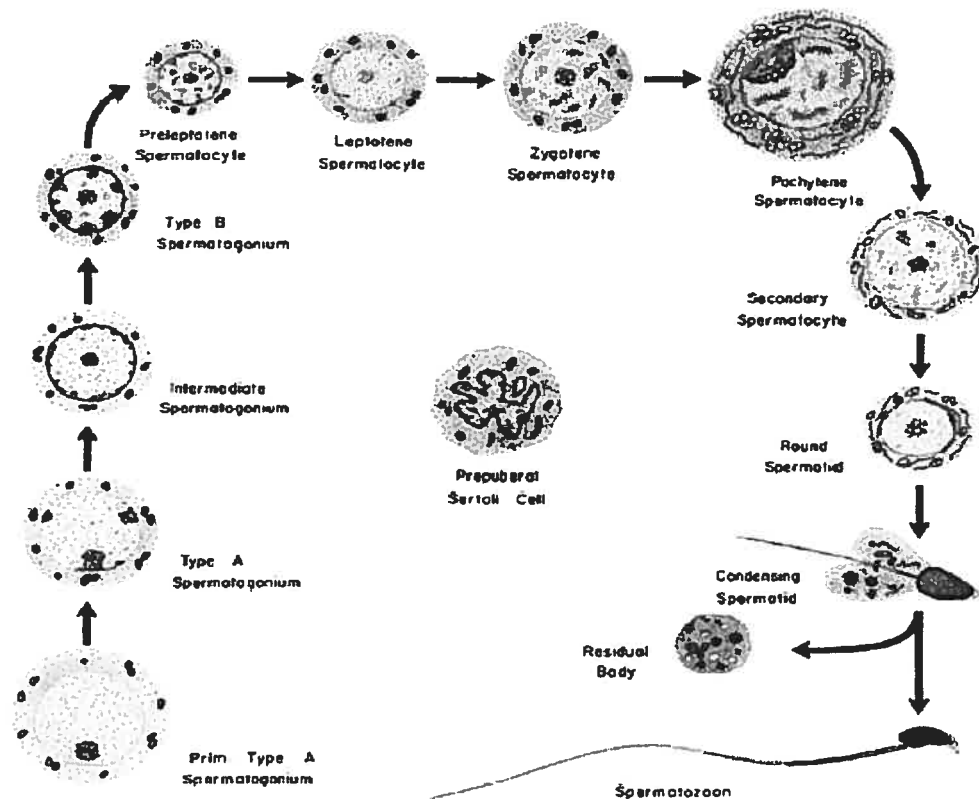
## 1.1 **Aperçu de la spermatogenèse**

La spermatogenèse se déroule dans les tubules séminifères qui sont entourés par des cellules myoïdes et qui contiennent les cellules de Sertoli et les cellules germinales à différents stades de développement (Leblond et Clermont, 1952). Les cellules de Sertoli et les cellules germinales sont intimement liées, anatomiquement et fonctionnellement, entre elles (Jégou et coll., 1995).

La spermatogenèse comprend trois phases (Clermont, 1972) : (i) la prolifération par mitose des spermatogonies, (ii) la méiose des spermatocytes qui se caractérise par la réduction du nombre des chromosomes c'est-à-dire au passage au stade haploïde et (iii) la spermiogenèse qui est l'étape de différenciation des cellules germinales haploïdes (spermatides) en spermatozoïdes.

L'épithélium séminifère présente des associations particulières de cellules de Sertoli avec des cellules germinales à différentes étapes de leur développement, chaque association a été appelée un stade du cycle de l'épithélium séminifère. Les stades surviennent de façon successive. Douze stades ont été définis chez la souris (Oakberg, 1956) et le vison (Pelletier, 1986). Le schéma 1 représente la morphologie cellulaire caractéristique de chaque stade chez la souris. La spermatogenèse chez le vison adulte est active seulement quelques mois, durant la phase active du cycle reproductif autour du mois de mars (Onstad, 1967 ; Hemmingsen, 1967 ; Pelletier, 1986). Cette phase active est suivie par une régression testiculaire progressive qui débute en avril et finit en juillet (Pelletier, 1986). À la fin de la régression testiculaire, seules les spermatogonies souches et les cellules de Sertoli sont présentes dans les tubules séminifères (Pelletier, 1986). Ainsi, chaque nouvelle phase active du cycle reproductif est une ré-initiation complète.





**Schéma 1 :** Diagramme schématisique de la spermatogenèse durant le développement post-natal chez la souris montrant le volume relatif et les caractéristiques morphologiques des cellules germinales à chacun des stades de l'épithélium séminifère. (Bellvé et coll., 1977)

## 1.2 Lipides testiculaires : localisations et rôles

### 1.2.1 Triglycérides (TG) et phospholipides

Dans les membranes cellulaires, les acides gras sont à la fois éléments structuraux et composants bioactifs. On a reconnu depuis longtemps que les acides gras (n-6) étaient essentiels au développement normal du testicule et à la fertilité des gamètes (Evans et coll. 1934). Des données issues d'études effectuées sur le rat ont indiqué que la synthèse des acides gras 22: 6(n-6) et 22: 6(n-3) est très active dans les cellules de Sertoli alors qu'elle l'est très peu dans les cellules germinales (Beckman et Coniglio

1980 ; Retterstøl et coll., 2000). Cette observation est en accord avec l'hypothèse que les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont transportés de la cellule de Sertoli aux cellules germinales (Beckman et coll., 1978). La concentration en TG dans des homogénats de testicule entier était augmentée lorsque la spermatogenèse était perturbée. C'est le cas chez le lapin ayant subi une cryptorchidie expérimentale (Fleeger et coll., 1968 ; Johnson et coll., 1968), chez le rat déficient en vitamine A (Butler et coll., 1968) et chez l'homme qui démontre une obstruction du canal déférent (Sheriff et Govindarajuhu, 1977). Chez le vison (animal à reproduction saisonnière), Kabbaj et coll., (2003) ont rapporté une variation élevée du taux des TG dans les tubules séminifères durant la régression testiculaire chez l'adulte.

Durant la spermatogenèse chez les mammifères, plus de la moitié des cellules germinales en différenciation meurent par apoptose avant leur maturation en spermatozoïdes (Allan et coll., 1987). Des études en microscopie électronique réalisées chez des rongeurs ont montré que des cellules germinales en dégénérescence sont phagocytées par les cellules de Sertoli (Russell et Clermont, 1977). En effet, des cellules de Sertoli en culture primaire phagocytent les cellules germinales en apoptose par un mécanisme impliquant des phospholipides, phosphatidylsérine (PS), exposés à la surface des cellules en apoptose. (Shiratsuchi et coll., 1997). On pense que les PS qui sont normalement présentes dans la face interne de la membrane plasmique deviennent exposées à la surface cellulaire durant l'apoptose (Zachowski, 1993) par un mécanisme médié par des caspases et dont les détails restent à élucider (Fadok et coll., 1998). L'acide palmitique (AP) et l'acide stéarique (AS) semblent impliqués dans l'apoptose des cellules de Leydig dans le tissu interstitiel (Lu et coll., 2003) tout comme les PS dans l'apoptose des cellules germinales.

### 1.2.2 Cholestérol total (libre et estérifié)

Le métabolisme du cholestérol est intimement associé au bon fonctionnement du système endocrinien. En plus du rôle fondamental du cholestérol dans toutes les cellules de mammifère en tant que constituant clé de la structure et de la fonction membranaire, il est le précurseur d'hormones stéroïdiennes. Par exemple chez les souris des deux sexes dépourvues du gène codant pour la desmostérol réductase (donc ne possédant pas de cholestérol) tous les organes de présentent un aspect normal à l'exception du testicule qui présente un aspect dégénératif et les souris mâles ainsi traitées sont stériles (Wechsler et coll., 2003). Dans le testicule entier de souris normale, la proportion du cholestérol libre par rapport au cholestérol total avoisine 95 %. Avant la puberté, les esters de cholestérol représentent 50 % du cholestérol total (Bartke, 1971).

Le rôle du cholestérol diffère dans les deux compartiments cellulaires du testicule (schéma 2). Dans le tissu interstitiel, le cholestérol est nécessaire pour la synthèse de la testostérone, tandis que dans le tubule séminifère, la teneur en cholestérol de la membrane des cellules germinales en développement sera déterminante pour la fertilité des gamètes mâles (Go et Wolf, 1983).

#### 1.2.2.1 Tissu interstitiel

Dans les cellules stéroïdogéniques, le cholestérol est le principal substrat pour la production d'hormones stéroïdiennes. La contribution du cholestérol synthétisé *de novo*, la mobilisation du cholestérol intracellulaire et la captation de cholestérol dérivé de lipoprotéines dans la biosynthèse stéroïdienne varient suivant les tissus (Fofana et coll., 1996). Le métabolisme du cholestérol dans le tissu interstitiel, fait intervenir différentes enzymes, dont la lipase hormono-sensible (HSL) qui hydrolyse les esters de cholestérol

en cholestérol libre qui est un des précurseurs de la testostérone (Holm et coll., 2000). Différents travaux effectués sur la souris mâle rendue expérimentalement dépourvue du gène de la HSL (HSL<sup>-/-</sup>) ont permis de mieux comprendre la signification biologique et fonctionnelle de cette hormone. Les résultats issus de ces travaux indiquent un taux anormalement élevé d'ester de cholestérol dans le testicule accompagné d'une absence d'activité de cholestéryl estérase et une stérilité due à l'oligospermie (Wang et coll., 2001). Les macrophages du tissu interstitiel peuvent accumuler de grandes quantités d'esters de cholestérol dans des gouttelettes lipidiques (Brown et Goldstein, 1983). Kabbaj et coll. (2003) ont montré, par immunohistochimie et immunofluorescence, la présence de la HSL dans les macrophages et dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins dans le tissu interstitiel du testicule. L'expression de la HSL dans les macrophages du tissu interstitiel indique que ces cellules pourraient être impliquées dans le métabolisme du cholestérol interstitiel. Les macrophages constituent une proportion importante des cellules présentes dans le tissu interstitiel du testicule adulte (Wing et Lin, 1977) et, nombreux et étroits contacts entre ceux-ci et les cellules de Leydig ont été rapportés (Hutson, 1992). L'élimination expérimentale ou génétique des macrophages du testicule causerait une diminution de la production de la testostérone et un arrêt de la spermatogenèse (Cohen et coll., 1996). Les macrophages testiculaires synthétisent le 25-hydroxycholestérol, à partir du cholestérol, qui est converti en testostérone par les cellules de Leydig (Nes et coll., 2000).

### 1.2.2.2 . Tubules séminifères

Les tubules séminifères sont de petits tubes creux à l'intérieur desquels se trouvent essentiellement deux types de cellules : les cellules germinales et les cellules somatiques de Sertoli. Ces dernières soutiennent et nourrissent les cellules germinales durant leur développement (Jutte et coll., 1981 ; Bishop et Griswold, 1987). La base des cellules de Sertoli est exposée aux changements de concentration de lipides et de cholestérol sériques. Chez le rat, la concentration en lipides de la région basale du tubule séminifère est plus abondante que dans le reste de l'épithélium séminifère et Lynch et Scott (1951) ont rapporté que lorsque les spermatides matures sont présentes dans le tubule, les lipides sont localisés à l'apex de l'épithélium, tandis que et lorsqu'elles sont absentes, les lipides sont concentrés dans la région basale. Cette observation est confirmée par les résultats obtenus par d'autres chercheurs. Ceux-ci ont rapporté que le nombre et la taille des gouttelettes lipidiques dans les cellules de Sertoli varient en fonction du stade du cycle de l'épithélium séminifère chez le rat (Kerr et De Kretser, 1975), le vison (Onstad, 1967) et l'homme (Paniagua et coll., 1987). D'autres études ont montré que la concentration en gouttelettes lipidiques et l'activité des hydrolases étaient cycliques, mais ne se déroulent pas au même moment (Posalaki et coll., 1968).

Dans les cellules de Sertoli notamment, la teneur en gouttelettes lipidiques était faible lorsque l'activité des enzymes hydrolytiques était élevée et que les spermatides étaient présentes dans le tubule. Inversement, lorsque les spermatides matures étaient absentes, l'activité des hydrolases dans les cellules de Sertoli était faible et la teneur en lipides de celles-ci était élevée (Kerr et De Kretser, 1975). Ceci suggère un lien entre la phagocytose des corps résiduels par les cellules de Sertoli et l'accumulation de lipides dans ces cellules (Posalaki et coll., 1968). Toutefois, la diminution des gouttelettes

lipidiques dans les cellules de Sertoli était accompagnée d'une augmentation de l'activité lysosomiales des cellules germinales (Posalaki et coll., 1968). Chez la plupart des animaux à reproduction saisonnière, le contenu en lipides du tubule séminifère varie au cours du cycle reproductif annuel. Chez l'oiseau (Marshall, 1955 ; Pelletier et Vilate, 1994), les amphibiens (Lofts et Boswell, 1960) et les reptiles (Lofts et Boswell, 1960), une accumulation de matériel lipidique a été rapportée dans les tubules durant la régression testiculaire.

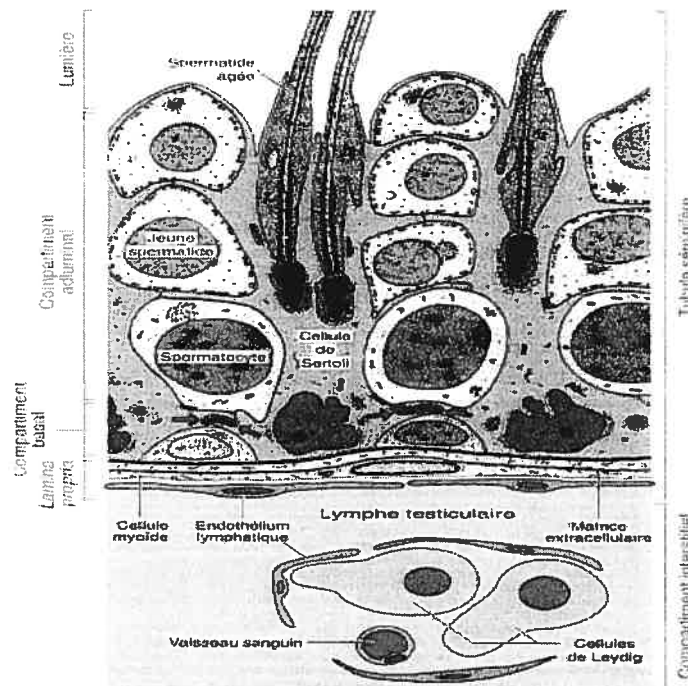
Chez le vison, mammifère à activité reproductive saisonnière, Onstad (1967) a rapporté la présence de gouttelettes lipidiques possédant des propriétés caractéristiques du cholestérol (biréfringent et soluble en acétone), dans les cellules de Sertoli durant l'activité spermatogénétique maximale et au début de la régression testiculaire. Chez la souris présentant le syndrome de féminisation testiculaire, Chung et Hamilton (1975) ont rapporté un excès de cholestérol dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig. Yamamoto et coll. (1999) ont montré que la fonction sécrétrice des cellules de Sertoli, notamment celle des androgen-binding protein (ABP), était affectée chez le lapin hypercholestérolémique. Une fonction sécrétrice normale des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig est requise pour l'activation et le maintien de la spermatogenèse (Steinberger et coll., 1973). Ensemble, ces résultats suggèrent l'existence d'une corrélation entre la qualité de la spermatogenèse et le contenu en lipide, notamment du cholestérol, dans le tubule et le testicule entier. L'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol augmente durant la maturation des cellules germinales. Ceci inclut l'ARNm de la farnesyl phosphatase synthase (Rozman et coll., 1999; Teruya et coll., 1990) et de la squalène synthase (faiblement exprimée dans les pachytènes et dans les spermatides rondes) (Rozman et coll., 1999 ; Tacer et coll., 2002). L'expression

d'autres gènes cibles des "sterol regulatory element-binding proteins" (SREBP) augmenterait avec la maturation des cellules germinales suggérant l'expression de ces gènes à des stades plus avancés de la spermatogenèse. Ceci inclut l'ARNm du récepteur de LDL (LDLR), du 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), de la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase), l'activité enzymatique de l'ATP citrate lyase et l'acétyl-CoA carboxylase (Bajpai et coll., 1998 ; Ness, 1994 ; Ness et Nazian, 1992). Ainsi, la régulation de la biosynthèse du cholestérol varie avec le stade du cycle de l'épithélium séminifère.

### 1.2.2.3 Spermatozoïdes

Chez les mammifères, les spermatozoïdes présents dans les canaux excréteurs mâles sont incapables de féconder l'ovule, ils subiront des modifications nécessaires qui leur permettront de subir la capacitation et la réaction de l'acrosome pendant leur séjour dans les voies génitales femelles (Chang, 1951). Pour être fertile, le spermatozoïde éjaculé doit traverser une période de conditionnement appelée capacitation qui représente l'un des événements clés nécessaires pour assurer leur fertilité. L'événement majeur de ce processus d'initiation est la perte de cholestérol de la membrane plasmique du spermatozoïde (Go et Wolf, 1983). Dans le testicule, l'incorporation de cholestérol dans la membrane plasmique est critique pour le maintien des fonctions vitales de la cellule germinale en développement. Dans l'épididyme, les cellules germinales matures contiennent un taux élevé de cholestérol (libre et total) (plus que les cellules de Sertoli) (Beckman et Coniglio, 1979). La membrane plasmique de la cellule serait stabilisée par une concentration élevée en cholestérol (Yeagle, 1985). L'efflux du cholestérol de la membrane plasmique a un effet direct sur la destabilisation de la membrane et

contribuerait à augmenter sa perméabilité, perméabilité indispensable à la fertilité des spermatozoïdes (Davis, 1980 ; Go et Wolf, 1983). Différents mécanismes moléculaires ont été proposés pour expliquer l'efflux du cholestérol de la membrane plasmique. La sortie du cholestérol de la membrane plasmique pourrait se faire par diffusion passive, par interaction avec des lipoprotéines pauvres en lipides ou par efflux passif ou actif médié par des mécanismes de transport (Rothblat et coll., 1999 ; Fielding et Fielding, 2001). Les principales molécules proposées pour être capables de médier ces processus sont le SR-BI et le CD36 (Krieger, 1998), les membres de la famille de ATP-binding cassette (ABC) transporter (Santamarina-fojo et coll., 2001) et la caveoline (Fielding et Fielding, 1995), bien que le rôle de ce dernier candidat soit controversé (Matveev et coll., 2001).



**Schéma 2 :** Représentation schématique d'une portion de testicule indiquant la composition cellulaire de l'épithélium séminifère et du tissu interstitiel. (Jégou et coll., 1995)



### 1.3 Transporteurs de cholestérol dans le testicule

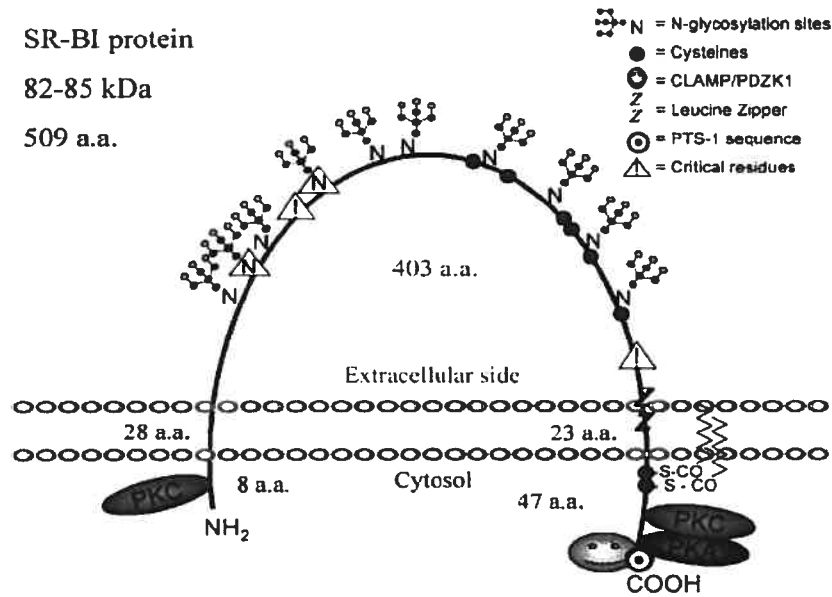
Le transport de substances hydrophobiques du sang vers les cellules du tissu interstitiel a été attribué à l'albumine et aux lipoprotéines. Les lipoprotéines jouent un rôle important dans le transport du cholestérol, d'esters de glycérol, de vitamines, d'esters de stéroïdes (Lavallée et coll., 1996), de xénobiotiques lipophiles comme les carnogènes (Polyakov et coll., 1996) et des médicaments (Rifai et coll., 1996). Les lipoprotéines de faible densité (LDL) via les récepteurs des apoprotéines B et E (LDLR, CD36) et les lipoprotéines de densité élevée (HDL) via le SR-BI livrent aux tissus périphériques le cholestérol nécessaire pour la biogenèse membranaire et la stéroïdogénèse (Schreiber et coll., 1982 ; Acton et coll., 1996). Le LDL se lie aux LDLR à la surface cellulaire et le complexe LDL-récepteur formé entre dans la cellule par endocytose. Ensuite, le LDL se dissocie de son récepteur au niveau des endosomes pour être dégradé dans les lysosomes où les esters de cholestérol sont hydrolysés en cholestérol libre et en acide gras (Landschulz et coll., 1996). En revanche, le transport de cholestérol médié par SR-BI n'est pas associé à une dégradation significative de l'apoprotéine AI ou AII, les apoprotéines majeures de HDL (Johnson et coll., 1991). Des récepteurs de VLDL (VLDLR) (Oka et coll., 1994) et de LDL (LDLR) (Yamazaki et coll., 1996) ont été détectés dans le testicule entier. Par immunohistochimie, Arenas et coll. (2004) ont rapporté la présence de CD36 dans les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli de testicules cryptorchidiques. Selon Andersen et Dietschy, (1978) les HDL seraient la principale source de cholestérol sanguin nécessaire pour la stéroïdogénèse dans le tissu interstitiel. Fofana et coll., (2000) ont montré que les cellules de Sertoli seraient capables de capter le cholestérol dérivé des HDL, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

## 1.4 Récepteur «Scavenger» de classe B de type I (SR-BI)

### 1.4.1 Propriétés moléculaires

#### 1.4.1.1 Structure moléculaire

Plusieurs récepteurs potentiels des HDL ont été décrits (Fidge, 1999; Barth et Argraves, 2001). Le SR-BI est considéré comme le récepteur principal des HDL (Silver et coll., 2001) dans la médiation de la captation sélective des esters de cholestérol dans le testicule (Krieger, 1999 ; Williams et coll., 1999 ; Silver et Tall, 2001). Le SR-BI est un membre de la classe B de la famille des récepteurs éboueurs (scavenger receptor) qui inclut, entre autres, le cluster déterminant 36 (CD36) (Febbraio et coll., 2001) et le CLA-1 (CD36- and LIMPII-analogous-1) (Vega et coll., 1991). Le SR-BI fut le premier membre de cette classe à être cloné. Le clonage fut effectué sur une lignée de cellules Var-261 d'ovaires du hamster (CHO) (Acton et coll., 1994). L'ADN complémentaire de SR-BI a été isolé chez le hamster (Acton et coll., 1996), le rat (Johnson et coll., 1998), la souris (Acton et coll., 1996), et l'homme (Calvo et Vega, 1993). Le gène de SR-BI a été localisé sur le chromosome 12 chez l'homme et le rat, ce qui confirme que le SR-BI et le CLA-1 représentent des gènes homologues (Johnson et coll., 1998). Le SR-BI est largement conservé dans les différentes espèces étudiées : le SR-BI de rat partage 90 %, 88 %, et 78 % d'homologie respectivement avec celui de la souris, du hamster et de l'homme (Johnson et coll., 1998).



**Schémas 3:** Représentation graphique de la protéine de SR-BI de rongeur. Les triangles indiquent les résidus critiques dont la mutation (M158 et Q402/418) et/ou la perte de la N-glycosilation (N108 et N173) conduit à l'annulation de la captation sélective de lipide (Rhainds et Brissette, 2004).

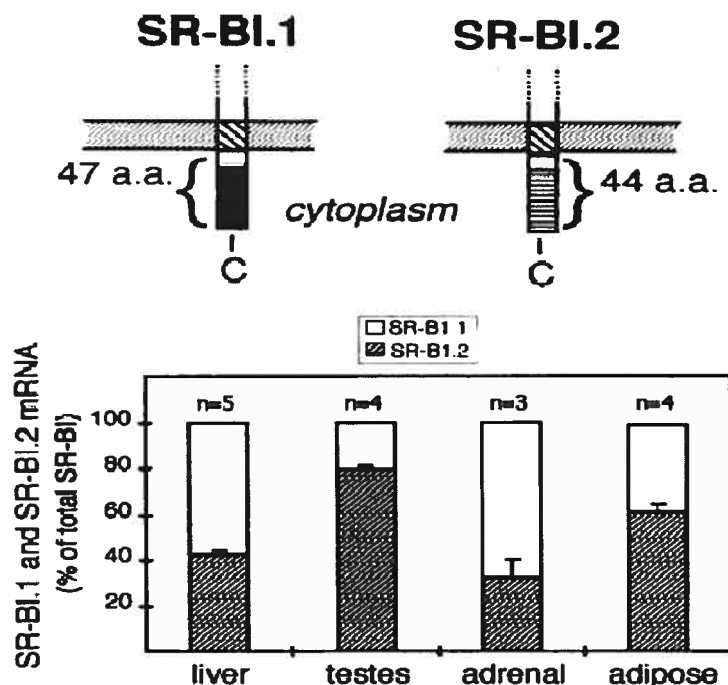
Le SR-BI est une protéine transmembranaire de 509 acides aminés et de poids moléculaire apparent de 57 kDa (Acton et coll., 1994). Il est constitué d'une large boucle extramembranaire, de deux domaines transmembranaires dont les extrémités, N-terminal et C-terminal sont intracellulaires (schéma 3). Vinals et coll. (2003) ont montré que tous les 11 sites potentiels de glycosylation (résidus 102, 108, 116, 173, 212, 227, 255, 288, 310, 330, 383) dans la boucle extracellulaire de SR-BI chez les rongeurs sont N-glycosylés. Neuf sites de glycosylation ont été identifiés chez l'homme et le hamster. Le poids moléculaire de la forme glycosylée de la protéine est 82-85 kDa. Le SR-BI présente des sites d'acylation (acylation par des acides palmitoléique ou myristoléique) au niveau des acides aminés Cys<sup>462</sup> et Cys<sup>470</sup> (Gu et coll., 1998). Calvo et Vega (1993)

ont aussi indiqué des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase A en Ser<sup>481</sup> et par la protéine kinase C en Ser<sup>4</sup> et Ser<sup>477</sup> et un domaine leucine zipper (domaine de dimérisation) entre les résidus 427-455. D'autres analyses de la séquence de SR-BI ont montré une séquence de ciblage peroxisomale, le "peroxysomal targeting sequence type I" (PTS1) dans la partie C-terminal (Johnson et coll., 1998). La présence de PTS1 dans la structure de SR-BI suggère que SR-BI joue un rôle dans le métabolisme ( $\beta$ -oxydation) du cholestérol et des acides gras (Johnson et coll., 1998). Un autre domaine, nommé domaine de liaison au CLAMP (ou PDZK1), a été localisé dans la partie C-terminal de SR-BI. Le PDZK1 est une protéine contenant un domaine multi-PDZ et qui interagit avec diverses protéines membranaires, incluant le SR-BI (Ikemoto et coll., 2000). Kocher et coll. (2003) ont précisé que PDZK1 exerce un contrôle tissu-spécifique et de façon post-transcriptionnelle sur l'expression de SR-BI *in vivo*. L'expression de SR-BI dans les souris dépourvues de PDZK1 est réduite de 95 % dans le foie, de 50 % dans l'intestin proximal, mais elle n'est pas affectée dans les organes stéroïdogéniques comme le testicule, la glande surrénale et l'ovaire (Kocher et coll., 2003).

#### 1.4.1.2 Isoforme de SR-BI

Une isoforme de SR-BI appelée SR-BII a été identifiée chez la souris et dans certaines lignées de cellules humaines (Webb et coll., 1997). Cette isoforme résulte d'un épissage alternatif d'un précurseur ARN unique et possède un domaine cytoplasmique C-terminal plus court que celui de SR-BI (Acton et coll., 1996). L'ARNm de SR-BII représente une fraction importante des ARNm totaux (SR-BI et SR-BII) dans différents tissus testés chez la souris (40 % dans le foie, 35 % dans les surrénales, 60 % dans le tissu adipeux) et constitue la forme prédominante dans les testicules (80 %) (schéma 3)

(Webb et coll., 1997). Le SR-BII partage plusieurs propriétés avec le SR-BI, notamment l'affinité de liaison aux HDL (Webb et coll., 1998). L'analyse structurale de SR-BII révèle que ses séquences peptidiques sont identiques à celles de SR-BI excepté au niveau du domaine intracellulaire C-terminal (schéma 4). Le SR-BII se distingue de SR-BI par l'absence de la séquence de ciblage peroxisomale (PTS1). Cependant, la signification biologique de cette différence reste à être élucidée. L'expression hépatique de SR-BII n'est pas affectée chez la souris dépourvue de PDZK1 (Ikemoto et coll., 2000). Cette observation s'appuie sur le fait que le domaine de liaison au PDZK1 est absent dans la structure de SR-BII. L'expression tissulaire de la protéine de SR-BII est constitutivement moins importante que celle de SR-BI dans les conditions basales. Le SR-BII représente 12 % de la masse totale de SR-BI et de SR-BII dans le foie de souris et 5 % dans la glande surrénale et le testicule. Ceci suggère que l'ARNm de SR-BII soit moins stable que l'ARNm de SR-BI (de Villiers et Smart, 1999).



**Schéma 4. Haut:** Diagramme schématique montrant les domaines C-terminal de SR-BI et SR-BII. On note un domaine cytoplasmique C-terminal de 47 acides aminés pour SR-BI et de 44 acides aminés pour SR-BII.

**Bas :** Expression relative de l'ARNm de SR-BI et l'ARNm de SR-BII dans différents tissus de souris (Webb et coll., 1997).

#### 1.4.1.3 Ligands

Le SR-BI est un récepteur multiligands (Rigotti et coll., 1997 ; Krieger, 1999). Il a été nommé récepteur éboueur (scavenger receptor) à cause de sa capacité à se lier au LDL modifié (oxydé et acétylé) (Acton et coll., 1994). En plus de se lier au HDL et de médier la prise sélective d'esters de cholestérol dérivés de cette lipoprotéine, le SR-BI peut se lier aux lipoprotéines qui ne sont pas des HDL tel que les LDL et les VLDL (Acton et coll., 1994) et permettre la prise sélective de cholestérol via le LDL (Stangl et coll., 1999; Swarnakar et coll., 1999). Différentes études de liaisons de ligands réalisées

sur des cellules en cultures ont montré que le SR-BI reconnaissait une série d'autres ligands. Le SR-BI se lie à l'albumine sérique de bovin (BSA) (Acton et coll., 1994), à des glycoprotéines modifiées (Ohgami et coll., 2001) et à des phospholipides anioniques, mais pas aux zwitterioniques présentés sous forme de liposomes (Rigotti et coll., 1995 ; Fukasawa et coll., 1996). Des travaux des mêmes auteurs révèlent que le SR-BI serait capable de se lier aux cellules sénescents, endommagées ou en apoptose et qui possèdent un niveau élevé de phosphatidylsérine (PS) à la surface de la membrane plasmique (Shiratsuchi et coll., 1997). Les cellules transfectées en culture surexprimant le SR-BI sont aussi capables de se lier aux cellules en apoptose (Fukasawa et coll., 1996). Scarselli et coll. (2002) ont rapporté que la glycoprotéine E2 (GPE2) de la membrane du virus de l'hépatite C est un ligand de SR-BI humain indiquant que ce dernier est un récepteur du virus de l'hépatite C. L'analyse des mécanismes par lesquels différents ligands ayant des structures diverses se lient au SR-BI suggère l'existence de multiples classes de sites de liaison (Krieger, 1999 ; Gu et coll., 2000).

Le LDL fut la première lipoprotéine native qui possède une forte affinité ( $k_d \sim 10\text{nM}$ ) de liaison au SR-BI à être identifiée (Acton et coll., 1994). Avant cette découverte, le seul récepteur connu pour le LDL était le LDLR (Goldstein et coll., 1985). Parallèlement, l'inefficacité de SR-BI à médier l'endocytose puis la dégradation de LDL modifié a été rapportée par Acton et coll. (1994). Le SR-BI se lie aux HDL avec une grande affinité de façon indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et de l'apoprotéine E (ApoE). L'habilité de SR-BI à se lier à nombre de lipoprotéines natives suggère qu'il pourrait être responsable de nombreuses activités de liaison aux lipoprotéines (Brisette et Noël, 1986; Johnson et coll., 1991; Fidge, 1999). D'autres récepteurs de surface de HDL,

ayant des structures, expressions tissulaires et activités fonctionnelles diverses existent sans doute (Rigotti et coll., 2003).

#### 1.4.2 SR-BI et la captation sélective des esters de cholestérol dans le testicule

##### 1.4.2.1 Rôle des HDL

Les HDL se lient aux membranes cellulaires de testicule de rat avec une grande affinité ( $K_d=1-3 \mu\text{g/ml}$ ) (Xu et coll., 1997). Cette liaison des HDL diffère de celle des LDL par deux voies ; elle n'est pas affectée par le  $\text{Ca}^{2+}$  ou par l'acide éthylènediaminetétra-acétique, et elle n'est ni sensible à la pronase ni à la trypsine (Chen et coll., 1980). Chen et coll. (1980) ont rapporté que les VLDL, à l'opposée des LDL, pouvaient se lier aux sites de liaison des HDL dans le tissu interstitiel du testicule de rat.

Le rein, la rate et le cœur de rat n'ont montré aucune affinité de liaison aux HDL contrairement à la grande surrénale dont la capacité de liaison aux HDL est semblable à celle décrite dans le testicule (Chen et coll., 1980). Aussi, le LDL marqué à l'iode radioactif testé pour son habilité à se lier aux membranes testiculaires n'a révélé aucune affinité saturante (Chen et coll., 1980). Ces auteurs conclurent qu'il existe des sites spécifiques de liaison aux HDL dans le tissu interstitiel du testicule et autres tissus stéroïdogéniques. Des travaux semblables réalisés par les mêmes auteurs (Chen et coll., 1980) sur des fractions de tubules séminifères leur ont permis d'établir qu'il existe une activité similaire de liaison des HDL au niveau des tubules séminifères bien que la signification biologique de celle-ci ne soit pas élucidée. L'administration d'hCG induit une augmentation de l'expression de SR-BI dans les cellules de Leydig suivie d'une augmentation de la captation d'EC dérivés des HDL (Landschulz et coll., 1996). Rinninger et coll. (1994) ont rapporté une corrélation entre la captation sélective des



esters de cholestérol des HDL et la liaison du complexe HDL-EC à un récepteur spécifique et ils ont suggéré l'existence d'une étape d'interaction de l'apoprotéine des HDL avec un récepteur de la membrane plasmique, étape indispensable à la captation sélective des esters de cholestérol dérivés des HDL.

#### 1.4.2.2 Mécanisme de captation sélective des esters de cholestérol

Le mécanisme moléculaire par lequel les cellules internalisent sélectivement les esters de cholestérol reste à établir. Cependant, les informations disponibles suggèrent l'existence d'un processus général comprenant deux phases (Azhar et Reaven, 2002). Durant une première phase de transit, les esters de cholestérol entrent dans la membrane plasmique de la cellule (Reaven et coll., 1996) ensuite les esters de cholestérol sont transloqués de la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule. La première phase du processus ne nécessite pas d'énergie et implique un passage unidirectionnel de la particule de lipoprotéine donatrice vers la membrane plasmique ou vers certains microdomaines spécifiques de la membrane plasmique (Azhar et Reaven, 2002). Des fractions de membrane plasmiques isolées de diverses cellules ont montré des captations sélectives des esters de cholestérol *in vitro*, Ce qui indique que la participation d'aucun autre composant cytoplasmique n'est nécessaire à la réalisation de la phase initiale de la captation sélective (Knecht et Pittman, 1989 ; Parkes et Angel, 1990). En revanche, la phase d'internalisation du mécanisme requiert de l'énergie et nécessite la participation de facteur(s) protéinique(s) intracellulaire(s) qu'il reste à identifier (Reaven et coll., 1996). Différents inhibiteurs du métabolisme de l'énergie et du cytosquelette, peuvent interférer avec la translocation des esters de cholestérol à l'intérieur de la cellule (Reaven et coll., 1996). Le segment final de la captation sélective des esters de

cholestérol utilise une voie non lysosomiale dans le processus de stockage du cholestérol ou lors de son utilisation pour la stéroïdogénèse (Sparrow et Pittman, 1990; Reaven et coll., 1995). Des études suggèrent que les esters de cholestérol internalisés sélectivement sont transportés directement dans des poches lipidiques pour stockage sans être au préalable hydrolysés par la cholestéryl estérase acide lysosomiale (Reaven et coll., 1995, 1996; Azhar et coll., 1999).

Pour l'heure, deux modèles sont proposés pour expliquer le mécanisme de la captation sélective des lipides dérivés des lipoprotéines par le SR-BI. Gu et coll. (1998) ont proposé que le SR-BI permet une héli-fusion entre la monocouche phospholipidique de la particule de HDL et la face externe de la membrane plasmique rendant ainsi possible le transfert des lipides de la particule de HDL à la membrane cellulaire. D'un autre côté, Rodrigueza et coll. (1999) ont proposé un modèle dans lequel le SR-BI forme un canal non aqueux à travers lequel les lipides migrent des particules de HDL vers la membrane plasmique de la cellule suivant leur gradient de concentration comme représenté au schéma 5.

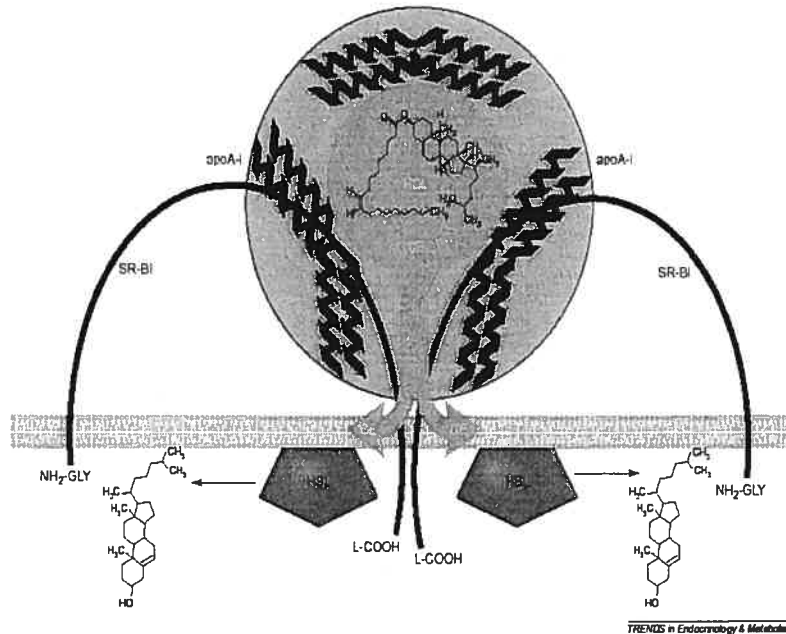


Schéma 5: Modèle de la captation sélective d'esters de cholestérol dérivés des HDL médiée par le SR-BI. (La proximité de la HSL par rapport au SR-BI est spéculative). (Margery et Williams, 2003)

#### 1.4.3 Régulation de l'expression de SR-BI et SR-BII dans le testicule

Les mécanismes de régulation de SR-BI commencent à être élucidés. Le promoteur du gène de SR-BI humain contient la séquence «consensus-DNA» qui se lie à divers facteurs de transcription dont le steroidogenic factor-1 (SF-1), CCAAT / enhancer-binding protein (C / EBP), sterol regulatory element-binding proteins-1 (SREBP-1) (Cao et coll., 1997 ; Lopez et McLean, 1999), liver X receptor (LXR) (Malerod et coll., 2002) et le liver receptor homolog 1 (LRH-1) (Schoonjans et coll., 2002). La régulation de l'expression de SR-BI par les hormones trophiques, le cholestérol et les acides gras polyinsaturés *in vivo* (Svensson et coll., 1999 ; Wang et coll., 1996 ; Fluiter et coll., 1998 ; Bachorik et coll., 1978 ; Spady et coll., 1999 ; Sun et coll., 1999 ; Mizutani et coll., 1997 ; Azhar et coll., 1999 ; Cao et coll., 1999) passe par l'intermédiaire de ces facteurs de transcription. La régulation de SR-BI par les hormones

trophiques (LH, FSH, hCG, ACTH) dans les tissus stéroïdogéniques passe par la voie de signalisation AMPc / protéine kinase A qui stimule l'activité transcriptionnelle de SF-1 (Parker, 1998) et de C / EBP (Lekstrom-Himes et Xanthopoulos, 1998). Les cellules de Leydig de rat sensibilisées à l'hCG surexpriment le SR-BI (Landschulz et coll., 1996 ; Reaven et coll., 2000) et accroissent l'incorporation de cholestérol dérivé des HDL dans la testostérone (Reaven et coll., 2000). L'expression de SR-BI dans les tissus stéroïdogéniques, en culture ou *in vivo* peut être aussi régulée par le cholestérol (Wang et coll., 1996; Sun et coll., 1999; Cao et coll., 1999), ce qui suggère que l'expression de SR-BI est contrôlée par un mécanisme de rétro-contrôle.

#### 1.4.4 Localisation de l'expression de SR-BI et SR-BII dans le testicule

##### 1.4.4.1 Cellules de Leydig

L'expression de SR-BI est significativement plus élevée que celle de SR-BII dans le testicule entier de souris toutefois, l'ARNm de SR-BII est la forme la plus importante (80 %) dans cet organe (Acton et coll., 1996 ; Webb et coll., 1997). La protéine de SR-BI a été rapportée dans le testicule de rat adulte normal par Reaven et coll. (2000). L'ARNm de SR-BI/CLA-1 est faiblement exprimé dans le testicule de l'homme (Cao et coll., 1997 ; Murao et coll., 1997) et l'expression de la protéine a été rapportée dans les cellules de Leydig chez l'homme (Arena, et coll., 2004). L'expression de SR-BII a été rapportée dans les cellules de Leydig de rat (Reaven et coll., 2000).

#### 1.4.4.2 Macrophages

L'expression de SR-BI (ARNm et protéine) est faible dans les monocytes humains mais elle est élevée dans les macrophages (Ji et coll., 1997; Hirano et coll., 1999). Des agonistes des récepteurs nucléaires peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR-)  $\alpha$  et  $\gamma$ , la 15-deoxy- $\delta$ -12,4-prostaglandine J2 (Zuckerman et coll., 2000), la testostérone (Langer et coll., 2002) augmentent l'expression de SR-BI dans les macrophages. Par contre, cette expression est diminuée par les lipopolysaccharides (LPS), l'interféron  $\gamma$  et le Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Buechler et coll., 1999), ainsi que par le transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Zuckerman et coll., 2001). La suppression de SR-BI par les LPS dans le macrophage dépend de la modulation de l'activité du promoteur du gène de SR-BI par la protéine kinase p21 activée (Hullinger et coll., 2001). Les LPS activent la voie de la protéine kinase p21 qui induit une diminution de la liaison du facteur de transcription de SR-BI et de son promoteur (Hullinger et coll., 2001). La réduction de l'expression de l'ARNm de SR-BI dans les macrophages sensibilisés aux LPS implique aussi l'activation du facteur nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Baranova et coll., 2002). Le LDL oxydé réduit aussi l'expression de l'ARNm et la protéine de SR-BI dans les macrophages. Cet effet de LDL sur le SR-BI dépend du degré d'oxydation du LDL et peut être mimé par le 7-kétocholestérol, mais pas par du cholestérol non oxydé (Han et coll., 2001). Il y a peu d'informations sur l'expression de SR-BI ou de SR-BII dans les macrophages testiculaires. Arena, et coll. (2004) ont rapporté l'expression de SR-BI/CLA-1 dans les macrophages testiculaires chez l'homme en utilisant la technique d'immunofluorescence.

#### 1.4.4.3 Cellules de Sertoli et cellules germinales

Chez le rat, le SR-BI (ARNm et protéine) a été rapporté dans les cellules de Sertoli et dans les cellules germinales toutefois, cette expression était plus importante dans les cellules de Sertoli (Shiratsuchi et coll. 1999). Les cellules de Sertoli sont des cellules qui “nourrissent” les cellules germinales au cours de leur développement (Jutte et coll., 1981 ; Bishop et Griswold, 1987) et qui phagocytent les cellules germinales en apoptose (Shiratsuchi et coll., 1997). Acton et coll. (1996) puis Webb et coll. (1997) ont rapporté que l’expression de la protéine et de l’ARNm de SR-BI et de SR-BII était significativement plus élevée dans le testicule de la souris que dans celui du rat. Les mêmes sources ont précisé que l’ARNm de SR-BII représentait la forme la plus abondante dans ce tissu. Des résultats non publiés de Reaven et coll. cités par Azhar et Reaven (2002) disent que l’expression de SR-BII augmenterait avec le développement dans les cellules germinales chez les rongeurs. Le SR-BI/CLA-1 a été rapporté dans le cytoplasme de la cellule de Sertoli, dans les corps résiduels et dans l’acrosome des spermatides rondes, mais pas dans les spermatogonies (Arena, et coll., 2004).

#### 1.5 Hypothèse de travail

Récemment réalisées dans notre laboratoire sur le vison, ont démontré que la concentration en cholestérol total était la même dans le compartiment interstitiel et dans les tubules séminifères malgré l’existence de la barrière hémato-testiculaire qui limite le libre passage du cholestérol sanguin (Kabbaj et coll., 2003). Bien que les cellules de Sertoli soient capables de synthétiser du cholestérol à partir de l’acétate (Wiebe et Tilbe, 1979), leur contribution ne pourrait, à elle seule, justifier cette répartition du composé. À notre connaissance, il n’y a aucune donnée disponible sur les moyens qu’utilise la

cellule de Sertoli *in vivo* pour faire entrer le cholestérol sanguin dans l'épithélium séminifère. Trois hypothèses sont à considérer : 1) une diffusion du composé à travers de la membrane basale du tubule séminifère; 2) une endocytose des LDL via des récepteurs spécifiques ou 3) une prise sélective des HDL via des récepteurs sélectifs. L'existence de la barrière hémato-testiculaire rend peu crédible la première hypothèse. Maboundou et coll. (1995) ont montré que, à l'opposée des LDL, les HDL réduisent la synthèse du cholestérol dans les cellules de Sertoli *in vitro*. Chen et coll. (1980) avaient annoncé l'existence de récepteurs spécifiques -sans les localiser- des HDL dans les tubules. C'est pourquoi nous considérons que l'hypothèse de la prise sélective de cholestérol dérivé des HDL via des récepteurs spécifiques serait la plus plausible. Dans cette présente étude, nous nous proposons d'étudier les changements dans l'expression protéinique de facteurs spécialisés dans la captation et la livraison sélective du cholestérol, le SR-BI et le SR-BII, dans les deux compartiments cellulaires du testicule, et ceci en fonction de l'activité spermatogénétique.

Nous avons utilisé deux modèles animaux, la souris (*Mus musculus*) qui est un animal à activité reproductive continue comme chez l'homme et le vison (*Mustela vison*) dont le cycle reproductif annuel est saisonnier, c'est-à-dire qu'il se caractérise par une phase active suivie d'une phase inactive de la spermatogenèse. La première étape du présent travail a consisté à séparer le testicule en fractions enrichies en tubules séminifères (STf) et en tissu interstitiel (ITf) à différents âges durant le développement post-natal chez les deux espèces animales et à chaque mois du développement et du cycle reproductif annuel saisonnier chez le vison adulte. Dans une seconde étape, nous avons quantifié les variations dans l'expression protéinique de chacun des deux récepteurs dans chacun des deux compartiments cellulaires du testicule, et ce, chez les

deux espèces animales. Nous avons ensuite normalisé l'expression de chacun des deux récepteurs par cellule de Sertoli dans les STf afin d'examiner l'impact de l'activité spermatogénétique sur le profil de l'expression des récepteurs dans le compartiment séminifère du testicule.

Nous avons montré que chez la souris, seule l'expression de SR-BI augmentait avec l'activité spermatogénétique dans les tubules et avec l'achèvement de la puberté dans le compartiment interstitiel. Chez le vison, l'expression maximale des deux récepteurs coïncidait avec l'activité spermatogénétique maximale. Les résultats que nous avons obtenus supportent l'hypothèse que le SR-BI et le SR-BII seraient impliqués dans le transport intratesticulaire et intratubulaire du cholestérol.



## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1 Prélèvement et traitement des tissus**

#### 2.1.1 Justification du choix des animaux

##### 2.1.1.1 Souris

Les anticorps que nous avons utilisés sont faits contre les protéines de souris. C'est pourquoi nous avons utilisé des souris SR-BI  $-/-$  et SR-BI  $+/+$  comme contrôles négatif et positif des analyses de Western blot que nous avons effectuées. Les souris que nous avons utilisées comme contrôle nous ont été gracieusement offertes par Dr Louise Brissette. La souris est un animal à activité reproductive continue comme l'homme et un modèle disponible facilement. Elle constitue pour notre laboratoire un deuxième modèle animal dans l'étude de la spermatogenèse. Elle offre également la possibilité de réaliser des modèles transgéniques contrairement au vison qui constitue un modèle animal plus difficile à manipuler.

##### 2.1.1.2 Vison

Notre laboratoire utilise le vison (*Mustela vison*) comme modèle animal depuis plusieurs années et différents travaux nous ont permis de mieux définir ce modèle (Pelletier, 1986; Pelletier, 2001) dont la différence tranche avec un modèle à activité reproductive continue tel que la souris (Oakberg, 1956). C'est un modèle unique dans lequel la séquence des événements de la ré-inittiation saisonnière de la spermatogenèse est semblable à celle de l'initiation de la spermatogenèse au cours du développement post-natal. Les caractéristiques de la régression testiculaire chez l'adulte sont semblables à celles de l'initiation de la spermatogenèse au cours du développement, mais dont la séquence des événements est inversée. Ainsi, l'utilisation du modèle de vison offre

l'avantage de distinguer la dynamique de l'expression du SR-BI et du SR-BII durant le développement post-natal et durant le cycle reproductif saisonnier annuel chez l'adulte.

Autre avantage, au fil des études réalisées sur le modèle de vison dans notre laboratoire, nous avons constaté que la plupart des anticorps commerciaux qui reconnaissent les protéines humaines réagissent sur des tissus de vison. Ceci constitue un avantage majeur parce que nous avons l'avantage de travailler sur un modèle plus accessible que l'homme tout en utilisant des anticorps facilement accessibles. Enfin, l'orchite auto-immune serait spontanée chez le vison (Tung et coll., 1984) comme chez l'homme. Le vison pourrait constituer de ce fait un modèle d'intérêt réel pour les recherches, notamment pour la recherche de solutions aux problèmes d'infertilité masculine due à des causes immunologiques chez l'humain.

### 2.1.2 Prélèvement des testicules

Les visons ont été achetés dans les fermes : Visonnière Armand Richard (St-Damase, Québec), Fourrures Mario Boutin Inc. (Deauville, Québec) et RBR Fur Farm (St-Thomas, Ontario) et les souris à la compagnie Charles River (St-Contant, QC, Canada). Les animaux ont été anesthésiés à l'aide d'une injection de Somnotol (pentobarbital sodique, 0.2ml/kg) (Cambridge, ON, Canada) puis les testicules ont été prélevés en prenant soin d'enlever les vaisseaux sanguins et la capsule entourant les testicules. Les animaux ont été utilisés à différents stades du développement testiculaire post-natal. Cela correspond à 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 et 270 jours chez le vison et 1-3, 7, 14, 21, 28, 35 et 54 jours chez la souris. Chez le vison adulte, les testicules ont été prélevés durant la dernière semaine de chaque mois du cycle reproductif annuel. Nous avons séparé les testicules en fractions enrichies en tubules séminifères (STf) et en

tissu interstitiel (ITf) (à l'exception des testicules de visons de 60 et 90 jours et de souris de 1-3 et 7 jours d'âge qui étaient trop petits pour être séparés), manuellement et par digestion enzymatique, dans des tampons contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases et dans du tampon exempt d'inhibiteurs. Étant donné la petite taille des testicules de souris, ceux-ci ont dû être poolés par tranche d'âges pour l'isolation enzymatique. La séparation des tubules séminifères du tissu interstitiel était essentielle pour diverses raisons : 1) le cholestérol est présent dans les deux compartiments (Loisel, 1903) mais son rôle diffère dans ces compartiments ; 2) la présence des récepteurs « scavenger » de classe B de type I et de type II a été rapportée dans les deux compartiments (Landschulz et coll., 1996 ; Arenas et coll., 2004).

### 2.1.3 Isolation des fractions enrichies en tubules séminifères (STf) et en tissu interstitiel (ITf)

#### 2.1.3.1 Digestion enzymatique

Les testicules prélevés ont été digérés dans du minimum essentiel médium (MEM) (Gibco BRL Products, Burlington, ON, Canada) contenant 0.25mg/ml de collagénase D (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada) et 0.1mg/ml d'inhibiteur de la trypsine (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, É-U) sous agitation douce (80 cycles/minute) dans un bain d'eau maintenue à 37 °C. Lorsque cela parut nécessaire, notamment avec les tissus de jeunes animaux, les testicules furent séparés doucement à l'aide de fines pinces afin d'accélérer la digestion. Une fois la digestion complétée, les réactions enzymatiques sont arrêtées par addition d'un volume égal de MEM sans enzymes. Le produit de digestion est ensuite transféré dans des tubes de 15ml et laissé sédimenter pendant 1 heure dans la glace. Les tubes furent ensuite centrifugés

deux fois à 840 rpm (centrifugeuse Beckman GS-6R, rotors GH-3.8, Beckman, Mississauga, ON, Canada) pendant 20 min afin de séparer les fractions enrichies en tissu interstitiel (surnageant) de celles en tubules séminifères. Les différentes fractions étaient identifiables grâce à la coloration différente des tissus : brun pour le tissu interstitiel et beige pâle pour les tubules séminifères. Les fractions sont isolées à l'aide de pipettes Pasteur puis lavées deux fois avec du PBS 1X (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et centrifugées à 2500 rpm pendant 10 minutes. Les fractions sont ensuite mises en suspension dans du PBS 1X seul ou contenant 1mM EDTA (BDH, Toronto, ON, Canada), 2mM PMSF (Sigma-Aldrich, Toronto, ON, Canada) 2 µg/ml de leupeptine (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada) et 2 µg/ml d'aprotinine (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada), aliquotées et congelées à -80°C. Nous avons vérifié, au microscope optique, la pureté des fractions enrichies en tubules séminifères et en tissu interstitiel.

#### 2.1.3.2 Isolation manuelle

Les tubules séminifères et le tissu interstitiel furent manuellement séparés dans du PBS 1X seul ou contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases fait de 1 mM EDTA, (BDH, Toronto, ON, Canada), 2 mM PMSF (Sigma-Aldrich, Toronto, ON, Canada), 2 µg/ml de leupeptine (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada), 2 µg/ml d'aprotinine (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada) et 10 µM bpv (phen) (Calbiochem, San Diego, Californie, É-U) à l'aide de fines pinces dans de la glace. Lorsque les tubules séminifères sont bien séparés du tissu interstitiel, le produit obtenu est distribué dans des tubes de 15 ml et laissé sédimenter pendant 1 heure dans de la glace. La suite du traitement est le même que décrit précédemment et les deux fractions

obtenues sont suspendues dans les tampons correspondants puis aliquotées et congelées à -80°C.

#### 2.1.4 Isolation des spermatozoïdes épидидymaires

Des épидидymes fraîchement prélevés chez la souris et le vison furent découpés en petits morceaux à l'aide d'une paire de ciseaux ou de lames de rasoir dans du PBS 1X seul ou contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases selon le cas (comme décrits plus haut). Le produit obtenu est mis sous agitation lente, dans la glace, pendant environ 1 heure. Les spermatozoïdes, en suspension dans le tampon, sont séparés du reste du tissu à travers un filtre doté de pores de 74 µm de diamètre. Le filtrat est centrifugé pendant 4 minutes à 2000 rpm (GS-6R Beckman centrifuge (Beckman, Mississauga, ON, Canada). Le culot recueilli est mis en suspension dans une solution de 10 mM Tris-HCl pH 8 contenant 1 mM EDTA pendant 5 minutes pour lyser les cellules épithéliales et cellules sanguines contenues dans le culot (Herrada et Wolgemuth, 1997), puis centrifugé à nouveau à 2000 rpm pendant 15 minutes. Les spermatozoïdes recueillis sont lavés deux fois et mis en suspension dans le tampon correspondant puis aliquotés et conservés à -80 °C.

#### 2.1.5 Préparation des fractions membranaire et cytosolique de spermatozoïdes

Les spermatozoïdes épидидymaires ont été mis en suspension dans la solution contenant des inhibiteurs de protéases et d'anti-phosphatase décrite plus haut et broyés pendant 5 à 10 secondes, dans la glace, au sonicateur (Fisher Sonic dismembrator, modèle 300, Fisher Scientific, Farmington, NY, É-U). Le produit obtenu était centrifugé à 2000 rpm (GS-6R Beckman centrifuge (Beckman, Mississauga, ON, Canada) pendant

10 minutes à 4 °C. Le surnageant était ensuite séparé du culot constitué de noyaux et de débris cellulaires. Le surnageant recueilli était centrifugé à 15000g (Beckman Microfuge E, Mississauga, ON, Canada) pendant 25 minutes à 4 °C. Le culot représentait la fraction membranaire et le surnageant la fraction cytosolique.

#### 2.1.6 Prélèvement et traitement des autres tissus

En plus des testicules, nous avons prélevé le foie, le rein, la glande surrénale, l'intestin grêle, le poumon, l'hypophyse antérieure, le cerveau et le cœur aussi bien chez le vison que chez la souris. Ces tissus ont été homogénéisés dans une solution contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases telle que décrit plus haut.

## 2.2 Anticorps et produits chimiques

### 2.2.1 Anticorps

#### 2.2.1.1 Premiers anticorps

- Anti-SR-BI polyclonal (IgG) réagissant sur des tissus de souris, de rat, et de cobaye, fait chez le lapin. Il a été obtenu à partir d'un immunogène contenant la portion comprise entre les acides aminés 496-509 et la partie N-terminal de la protéine de SR-BI et acheté chez Novus Biologicals, Inc. (Littleton, É-U).

- Anti-SR-BII (IgG) polyclonal réagissant sur des tissus de souris, de rat, et de cobaye, fait chez le lapin. Il a été obtenu à partir d'un immunogène contenant la portion comprise entre les acides aminés 491-506 et la partie N-terminal de la protéine de SR-BII et acheté chez Novus Biologicals, Inc. (Littleton, É-U).

- Anti-vimentin polyclonal IgG fait chez la chèvre, Sigma (St Louis, É-U).

- Anti-clusterin monoclonal fait chez la souris (Novocastra Laboratories Ltd, K-U).

### 2.2.1.2 Deuxièmes anticorps conjugués à la peroxydase

- Anti-lapin IgG, Anti-chèvre IgG et Anti-souris IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (Mississauga, ON, Canada)

### 2.2.2 Produits chimiques

- BSA, inhibiteur de trypsine, Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, É-U).

- Collagénase D, leupeptine et aprotinine, Roche Molecular Biochem. (Laval, QC, Canada)

- Kit de chemiluminescence lumi light plus Western blotting substrate et BM chemiluminescence blotting substrate (POD), Boehringer manheim (Laval, QC, Canada)

- MEM, Gibco BRL Products (Burlington, ON, Canada)

- Somnotol, MTC Pharmaceuticals (Cambridge, ON, Canada)

- Réactif Bradford, Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada)

- bpV (phen), Calbiochem (San Diego, Californie, É-U)

## 2.3 Western blot

### 2.3.1 Dosage des protéines des échantillons

La concentration en protéines des échantillons fut mesurée suivant la méthode de Bradford (1976) et les réactifs utilisés furent achetés chez Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Nous avons établi une courbe standard à l'aide de concentrations connues de BSA et avons déterminé la concentration en protéines totales de chacun des échantillons à partir de cette courbe standard.

### 2.3.2 Électrophorèse sur gels dénaturants SDS-PAGE

Les protéines totales contenues dans les divers échantillons ont été diluées dans du tampon d'échantillon 2X (8M d'urée, 3 % SDS, 5 %  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0.005 % de BBP, 70 mM Tris-HCl pH 6.8) et chauffées dans un bain d'eau bouillante pendant 3 minutes. Entre 20 et 30  $\mu$ g de protéines totales ont été placées dans les puits de gel de polyacrylamide. La concentration en acrylamide des gels d'entassement et de séparation était de 4 % et de 10 % respectivement. La migration était effectuée à un voltage de 120 V pendant environ 2 heures (tampon du gel séparateur : 1.0M Tris-0.5 M glycine ; tampon du gel d'entassement : 0.5M Tris-HCl pH 6.7 ; tampon d'électrode : 0.1M tris, 0.15M glycine, 0.1 % SDS).

### 2.3.3 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Après la migration, les protéines séparées contenues dans le gel ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose dotée de pores de 45  $\mu$ m. Ce transfert de protéines du gel à la membrane a été effectué à 4 °C, à un courant de 300 mA pendant 2 heures ou à 27 V toute la nuit (Mini Transblot electrophoretic cell, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Le tampon de transfert utilisé contenait 25mM Tris-HCl pH 8.3, 150 mM glycine et 20 % (v/v) méthanol. Les membranes ont été ensuite colorées au rouge de Ponceau (0.2 % rouge de Ponceau et 3 % TCA dans l'eau distillée) afin d'évaluer la qualité du transfert, l'uniformité de la migration des protéines, la dégradation possible des échantillons et l'emplacement des étalons de poids moléculaire. Les membranes étaient ensuite rincées dans du PBS1X jusqu'à ce que le rouge ait disparu.



#### 2.3.4 Immunobuvardage des membranes

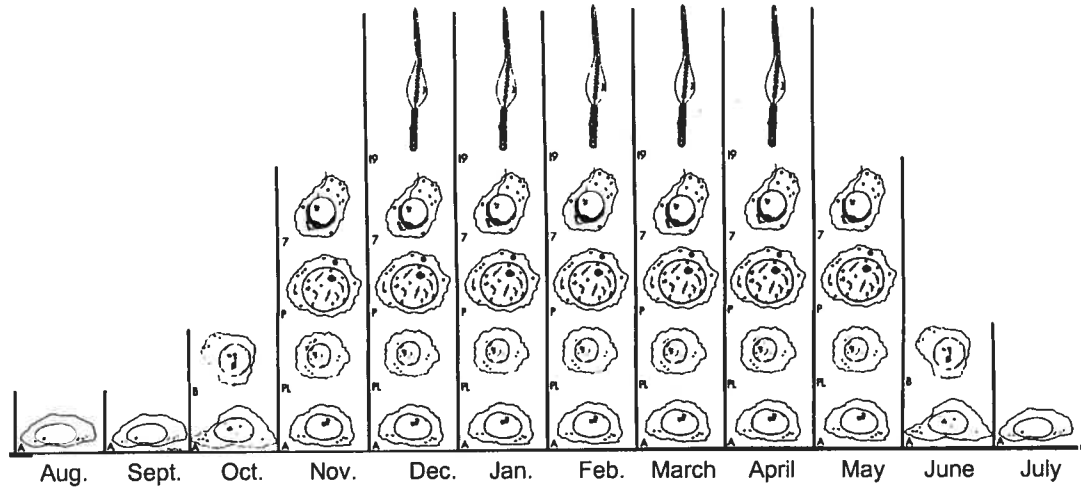
Les membranes décolorées ont été saturées par une incubation d'une heure à 37 °C dans du PBS-lait écrémé 5 %. Elles ont été ensuite incubées dans du PBS-lait 5 % contenant l'anticorps dirigé contre la protéine étudiée : anti-SR-BI (1 :2000), anti-SR-BII (1 :1000), anti-vimentin (1 :500) et anti-clusterin (1 :200). La durée et la température de l'incubation étaient de deux heures à 37 °C et toute la nuit à 4 °C. Après cette incubation, les membranes étaient lavées (4 fois 15 minutes) à 37°C à l'aide d'une solution de PBS-Tween-20, 0.05 % (PBST-0.05 %). Elles étaient par la suite incubées dans du PBS-lait écrémé 5 % contenant le deuxième anticorps couplé à la peroxydase, soit anti-rabbit-HRP ou soit anti-souris-HRP selon le premier anticorps utilisé (1:2000 dans chaque cas). Les membranes étaient lavées à nouveau avec du PBST-0.05 % (3 fois 15 minutes) puis avec du TBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 24.8 mM Tris-Base, pH 7.4) pendant 15 minutes. L'emplacement du complexe anticorps-antigène sur la membrane était révélé par l'utilisation de solutions de chemiluminescence. La lumière émise par l'action de la peroxydase est captée sur film Kodak X-OMAT XAR-5 (Eastman Kodak, Rochester, NY, É-U).

#### 2.3.5 Quantification des bandes obtenues en Western blot

Nous avons quantifié l'intensité des bandes obtenues en Western blot afin d'évaluer la concentration relative en protéines des différents échantillons que nous avons analysés. Pour ce faire, nous avons numérisé les films de Western blots au scanner Astra 1200S (Umax Data System Inc. Hsinchu, Taiwan). La concentration relative en protéines correspondante aux bandes immunoréactives dans les différents échantillons a été évaluée par densitométrie en utilisant le programme Scion Image Software (Scion

corporation, MD, É-U). La mesure de l'intensité relative des bandes était effectuée trois fois par échantillon et par film. Le nombre de films utilisés pour les analyses de SR-BI et de SR-BII était de trois pour les échantillons de ITf et six pour les STf. Nous avons ensuite calculé la moyenne de toutes les mesures obtenues pour chaque bande dans chacun des échantillons. Les valeurs obtenues sont exprimées en unités arbitraires et les calculs statistiques étaient effectués avec le programme Sigma Plot 2001. Les résultats sont présentés sous forme de graphiques et exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (standard error of the mean).

### 3. Résultats



**Schéma 6:** Les changements dans la composition cellulaire de l'épithélium séminifère durant le cycle reproductif du vison adulte est illustré pour les 12 mois de l'année. Seules les stades cellulaires les plus âgés de chaque association cellulaire identifiée dans les coupes de tubules séminifères sont indiqués. (Pelletier, 1986 modifié)

Le schéma 6 représente le calendrier du cycle reproductif saisonnier annuel du vison adulte (Pelletier, 1986) et auquel nous référerons. Ce schéma décrit le contenu en cellules germinales les plus âgées présentes dans les tubules séminifères durant la dernière semaine de chaque mois de l'année. Le cycle reproductif saisonnier annuel du vison adulte se divise en deux phases : une phase active et une phase inactive. La phase active de la spermatogenèse est caractérisée par une activité mitotique et méiotique accrue qui résulte en un grand nombre de cellules germinales. La phase inactive se caractérise par un arrêt de l'activité mitotique et méiotique et de la spermatogenèse. Au mois d'août, seules les spermatogonies de type  $A_0$  sont présentes le long de la membrane limitante de l'épithélium séminifère. Elles donneront ensuite naissance à de nombreuses spermatogonies de type B par division mitotique. Pour cette raison, cette période est

considérée comme celle de la ré-initiation de la phase active de l'activité spermatogénétique chez le vison adulte.

### **3.1 Étude de l'expression de SR-BI**

#### **3.1.1 Identification de la bande immunoréactive qui correspond à SR-BI**

Nous avons testé la spécificité de l'anticorps anti-SR-BI en soumettant 20 µg de protéines totales d'homogénats de STf de souris dépourvues de SR-BI (SR-BI<sup>-/-</sup>), de souris de type sauvage (SR-BI<sup>+/+</sup>) et de vison de type sauvage à une analyse par Western blot. Nous avons détecté 5 bandes immunoréactives dans les STf de souris SR-BI<sup>+/+</sup> (140-, 85-, 72-, 64- et 57- kDa) et 6 bandes (150-, 130-, 97-, 82-, 68- et 57- kDa) dans les STf de vison. Toutes les bandes détectées dans l'échantillon de souris SR-BI<sup>+/+</sup> étaient présentes dans les STf de souris SR-BI<sup>-/-</sup> à l'exception de la bande de 85 kDa. Chez le vison, cette bande avait un poids moléculaire de 82 kDa (fig.1A). C'est pourquoi nous n'avons considéré que les bandes de 85 et 82 kDa comme correspondantes à SR-BI respectivement chez la souris et le vison.

#### **3.1.2 Étude de l'expression de SR-BI chez la souris**

##### **3.1.2.1 Résultats des analyses de Western blot**

###### **3.1.2.1.1 Analyses de SR-BI dans des tissus de souris normale adulte**

La figure 1B montre les résultats de l'analyse par Western blot de l'expression de SR-BI dans différents tissus de souris. Vingt µg de protéines totales d'homogénats de STf, de ITf, de foie, de cœur, de rein, de cerveau, et d'hypophyse antérieure ont été soumis à cette analyse. Nous avons détecté une bande immunoréactive de 85 kDa de

SR-BI dans chacun de ces tissus. Toutefois, c'est dans le foie et le testicule (ITf et STf) que l'intensité de la bande était la plus forte.

#### 3.1.2.1.2 Analyses de SR-BI dans le testicule de souris au cours du développement post-natal

*Analyses par Western blot de SR-BI dans les ITf*: Par analyses de Western blot, nous avons détecté une bande immunoréactive de 85 kDa correspondante à SR-BI dans les ITf à tous les âges durant le développement (fig. 1C) et son intensité augmentait avec le développement et particulièrement aux âges de 28j, 35j et 54j.

*Analyses par Western blot de SR-BI dans les STf*: Les analyses par Western blot réalisées sur les STf ont révélé une bande immunoréactive de 85 kDa correspondante à SR-BI à tous les âges au cours du développement (fig.1D). L'intensité de la bande augmentait avec le développement et atteignait un pic à 35j puis diminuait à 54j.

#### 3.1.2.1.3 Analyse de l'expression de la vimentine dans les STf de souris

L'analyse par Western blot de la vimentine a été effectuée sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour l'analyse de SR-BI dans les STf. Vingt  $\mu\text{g}$  de protéines totales ont été soumis à cette analyse et le résultat obtenu, représentatif de deux expériences indépendantes, est présenté à la figure 1E. L'intensité de la bande immunoréactive de 58 kDa de la vimentine était relativement constante à partir de 14j.

### 3.1.2.2 Résultats des analyses densitométriques

#### 3.1.2.2.1 Expression de SR-BI dans des tissus de souris normale adulte

L'expression de SR-BI était plus élevée dans le testicule et le foie que dans le rein, le cœur, le cerveau et l'hypophyse antérieure. De plus, l'expression de SR-BI était relativement élevée dans l'hypophyse antérieure mais pas dans le cœur et au cerveau (fig. 2A).

#### 3.1.2.2.2 Expression de SR-BI dans le testicule de souris au cours du développement post-natal

*Expression de SR-BI dans les ITf:* Nous avons mesuré une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de l'expression de SR-BI à 28j. L'expression maximale de SR-BI était atteinte aux âges à 35j et 54 jours (fig. 2B.a).

*Expression de SR-BI dans les STf de souris :* Nous avons mesuré une augmentation significative de l'expression de SR-BI entre 7 et 14j ( $p < 0.0005$ ), entre 14 et 21j ( $p < 0.005$ ) et entre 28 et 35j ( $p < 0.05$ ). L'expression maximale de SR-BI était atteinte à 35j suivie d'une baisse significative ( $p < 0.002$ ) à 54j (fig. 2B.b).

Dans les tubules séminifères, il existe deux types cellulaires : les cellules germinales dont le nombre augmente au cours du développement et les cellules de Sertoli qui ne se divisent plus environ vingt jours après la naissance (Baker et O'Shaughnessy, 2001). La proportion de chaque type cellulaire par échantillon analysé pouvant varier, nous avons analysé l'expression de la vimentine, protéine des filaments intermédiaires, exprimée exclusivement dans les cellules de Sertoli (fig. 1E et 2C.a). En rapportant l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BI à celle de la vimentine [ $\text{Intensité (SR-BI) / Intensité (vimentine)}$ ] obtenues à partir d'un même échantillon, nous

avons normalisé nos mesures de SR-BI par rapport à la quantité de cellules de Sertoli dans chaque échantillon. Le profil de la variation des taux de SR-BI normalisés n'indiquait aucune variation significative durant le développement fig. 2C.b.

Les protéines de SR-BI et de SR-BII sont issues d'un épissage alternatif d'un même ARN natif. Dans le testicule, l'ARNm de SR-BII représente 80 % de la masse totale des ARNm des deux protéines. Afin d'examiner si cette tendance se reflétait au niveau protéinique dans les STf, nous avons établi le profil de la masse de SR-BI par rapport à la masse totale de SR-BI et SR-BII durant le développement postnatal (fig.2D.a). Cette proportion de SR-BI était voisine de 50 % durant tout le développement chez la souris. Le profile de SR-BI/SR-BII (fig. 2D.b) était similaire à la variation de l'expression de SR-BI durant le développement.

### 3.1.3 Étude de l'expression de SR-BI chez le vison

#### 3.1.3.1 Résultats des analyses de Western blot

##### 3.1.3.1.1 Analyses de SR-BI dans des tissus de vison

Pour déterminer l'expression tissulaire de SR-BI chez le vison, nous avons soumis 20 µg de protéines totales d'homogénats de différents tissus à une analyse par Western blot. La figure 3A montre le résultat de cette analyse. La bande immunoréactive de SR-BI était considérablement plus intense dans le testicule (STf et ITf) de vison adulte du mois de février et dans le foie que dans les glandes surrénales, l'intestin grêle, le rein, le cerveau, le cœur et le poumon.

### 3.1.3.1.2 Analyses de l'expression de SR-BI dans le testicule de vison

*Analyses par Western blot de SR-BI dans les ITf de vison :* La bande immunoréactive de SR-BI était détectable à tous les âges durant le développement post-natal chez le vison. L'intensité de la bande augmentait avec le développement ; elle était particulièrement plus intense à 150j et 180j puis diminuait progressivement (fig. 3B.a). En revanche chez le vison l'adulte (fig. 3B.b) deux phases apparaissaient, une phase de forte intensité constante de la bande de SR-BI allant de juillet à février suivie d'une phase de faible intensité de mars à juin.

*Analyses par Western blot de SR-BI dans les STf de vison :* La variation de l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BI dans les STf du vison durant le développement post-natal (fig. 3C.a) était similaire à celle décrite dans les ITf. Chez l'adulte par contre, l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BI augmentait avec l'activité reproductive (contrairement aux ITf) ; elle était très intense en février puis moins intense en mars. L'intensité minimale était observée en mai. Une longue exposition des négatifs (15 minutes) de Western blot a révélé un triplet de bandes immunoréactives aux mois d'avril, mai et juin (fig. 3C.b). L'existence de ce triplet dans les ITf n'est pas exclue, cependant nous n'y avons détecté qu'une simple bande pendant les 3 mois mentionnés plus haut.

### 3.1.3.1.3 Analyses de l'expression de la vimentine et de la clustérine dans les STf de vison

Les analyses de Western blot de la vimentine et de la clustérine ont été faites sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour SR-BI dans les STf.



L'intensité de la bande immunoréactive de la vimentine était forte à 60j et 90j comparée au reste du développement post-natal (fig. 3D.a). Chez l'adulte, cette intensité était maximale en août puis diminuait au fur et à mesure que le cycle avançait ; elle était faible en juin (fig. 3D.b). Nous avons aussi analysé la clustérine, un autre marqueur des cellules de Sertoli afin de pouvoir confronter les résultats obtenus avec les deux marqueurs. La bande immunoréactive de la clustérine était intense de juillet à octobre et faible de novembre à juin (fig. 3E).

#### 3.1.3.1.4 Expression de SR-BI dans les spermatozoïdes épидидymaires de vison

Les analyses de Western blot de SR-BI ont révélé une faible bande immunoréactive dans les spermatozoïdes épидидymaires de vison. De plus, nous avons séparé les spermatozoïdes en fractions enrichies en membranes et en cytosol. Nous avons détecté une forte bande immunoréactive de SR-BI dans la fraction enrichie en membranes. Cette bande n'était pas détectable dans la fraction cytosolique et ce même après une exposition prolongée des négatifs (fig. 4).

#### 3.1.3.2 Résultats des analyses densitométriques

##### 3.1.3.2.1 Expression de SR-BI dans des tissus de vison

L'expression de SR-BI était élevée dans le testicule et le foie, moyenne dans la surrénale, le rein et le poumon et faible dans l'intestin grêle, le cerveau et le cœur (fig. 5A).

### 3.1.3.2.2 . Expression de SR-BI dans le testicule du vison

*Expression de SR-BI dans les ITf de vison* : L'expression de SR-BI était faible à 60j et à 90j puis elle augmentait significativement ( $p < 0.01$ ) à 120j. L'expression maximale de SR-BI était atteinte à 180j puis diminuait légèrement (fig. 5B.a). Chez l'adulte (fig. 5B.b), l'expression de SR-BI dans les ITf était élevée et constante d'août à février. Cette expression baissait ensuite de façon significative ( $p < 0.005$ ) de mars à juin. Au mois de juillet l'expression de SR-BI augmentait de façon significative ( $p < 0.05$ ) par rapport à juin.

*Expression de SR-BI dans les STf de vison* : L'expression de SR-BI dans les STf au cours du développement (fig. 5C.a) était similaire à celle décrite dans les ITf. Cette expression était significativement ( $p < 0.005$ ) plus élevée à 150j et 180j puis baissait ( $p < 0.01$ ) durant le reste du développement. Chez l'adulte, l'expression de SR-BI était élevée de juillet à février puis baissait à un niveau significativement plus bas ( $p < 0.005$ ) de mars à juin (fig. 5C.b). Contrairement aux ITf, l'expression de SR-BI dans les STf progressait d'octobre à février. Normalisée par cellule de Sertoli, l'expression de SR-BI (fig. 5F.a) baissait significativement ( $p < 0.005$ ) entre 180j et 210j puis demeurait stable durant le reste du développement. Normalisée par cellule de Sertoli en utilisant la vimentine comme marqueur (fig. 5F.b), l'expression de SR-BI au cours du cycle reproductif était maximale en décembre, janvier et février ( $p < 0.001$ ). En utilisant un autre marqueur des cellules de Sertoli, la clusterine, nous avons obtenu nous avons obtenu un profil semblable (fig. 5G.a).

La proportion de SR-BI par rapport à la masse totale de SR-BI et SR-BII dans les STf diminuait avec le développement (fig. 5H.a). Cette proportion était d'environ 100 % au début du développement à 60j et 90j, puis baissait à 25 % ( $p < 0.002$ ) entre 210j et

270j. Chez l'adulte, la proportion de SR-BI par rapport à la somme des deux protéines était voisine de 80 % de juillet à février puis elle était réduite à 25 % ( $p < 0.001$ ) de mars à juin (fig. 5H.b). Le rapport SR-BI/SR-BII était élevé en octobre, novembre et décembre, mais faible en mai, avril et juin (fig. 5G.b).

### 3.2 Étude de l'expression de SR-BII

Toutes les analyses par Western blot de SR-BII, effectuées chez la souris comme chez le vison, étaient réalisées sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour les analyses de SR-BI

#### 3.2.1 Identification de la bande immunoréactive qui correspond à SR-BII

Par analyses de Western blot et en utilisant un anticorps dirigé contre SR-BII, nous avons détecté 4 bandes immunoréactives (180-, 97-, 85- et 72 kDa) dans les STf de souris SR-BII<sup>+/+</sup>. A l'exception de la bande de 85 kDa, toutes les bandes détectées chez la souris SR-BII<sup>+/+</sup> l'étaient aussi chez la souris SR-BII<sup>-/-</sup>. Quatre bandes immunoréactives (97-, 85-, 68- et 57 kDa) ont été également détectées dans les STf de vison (fig. 6A). Etant donné que seule la bande de 85 kDa était absente dans l'échantillon de souris rendue expérimentalement dépourvue du gène de SR-BII, nous avons retenu que seule cette bande correspondait à SR-BII chez les deux espèces animales.

### 3.2.2 Étude de l'expression de SR-BII chez la souris

#### 3.2.2.1 Résultats des analyses de Western blot

##### 3.2.2.1.1 Analyses de SR-BII dans des tissus de souris normale adulte

La bande immunoréactive de SR-BII était détectée dans le testicule, le foie, le rein, le cœur, le cerveau et l'hypophyse antérieure (fig. 6B), mais c'est dans le foie et le testicule que son intensité était la plus élevée.

##### 3.2.2.1.2 Analyses de SR-BII dans le testicule de souris au cours du développement post-natal

*Analyses par Western blot de SR-BII dans les ITf*: Une bande immunoréactive de 85 kDa correspondante à SR-BII était détectée à tous les âges dans les ITf de souris et son intensité variait peu au cours du développement post-natal (fig. 6C).

*Analyses par Western blot de SR-BII dans les STf*: Les analyses par Western blot faites sur les STf de souris en utilisant l'anticorps anti-SR-BII ont révélé une forte bande immunoréactive détectable à tous les âges au cours du développement. Les résultats de ces analyses sont présentés à la figure 6D, représentative de 6 expériences indépendantes. L'intensité de la bande variait peu durant le développement.

#### 3.2.2.2 Résultats des analyses densitométriques

##### 3.2.2.2.1 Expression de SR-BII dans des tissus de souris normale adulte

Le résultat des analyses densitométriques des immunoblots de SR-BII dans les tissus de souris est représenté à la figure 7A. Il montre que l'expression de SR-BII était plus élevée dans le testicule (STf et ITf) et le foie que dans le cœur, le rein, le cerveau et l'hypophyse antérieure.

### 3.2.2.2.2 Expression de SR-BII dans le testicule de souris au cours du développement post-natal

*Expression de SR-BII dans les ITf de souris* : Dans les ITf, l'expression de SR-BII variait peu avec le développement testiculaire post-natal (fig. 7B).

*Expression de SR-BII dans les STf de souris* : L'expression de SR-BII variait peu dans les STf (fig. 7C.a) jusqu'à 35j d'âge, mais, elle baissait de façon significative ( $p < 0.05$ ) à 54j comparé à 35j. Cette baisse de SR-BII à 54j n'était pas significative lorsque l'expression de la protéine était normalisée par cellule de Sertoli (fig. 7C.b). La proportion de SR-BII par rapport à la masse protéinique totale de SR-BI et de SR-BII était voisine de 50 % dans les STf durant le développement post-natal (fig. 7D).

### 3.2.3 Étude de l'expression de SR-BII chez le vison

#### 3.2.3.1 Résultats des analyses de Western blot

##### 3.2.3.1.1 Analyses de SR-BII dans des tissus de vison

L'intensité de la bande de SR-BII était élevée dans les STf et les ITf de vison adulte du mois de février, faible dans le rein et le cerveau (fig. 8A) et à peine détectable dans la surrénale, l'intestin grêle, le cœur, le poumon et le foie.

##### 3.2.3.1.2 Analyses de l'expression de SR-BII dans le testicule de vison

*Analyses par Western blot de l'expression de SR-BII dans les ITf de vison* : La bande immunoréactive de SR-BII n'était pas détectable dans les ITf aux âges de 60, 90 et 120j au cours du développement post-natal (fig. 8B.a). Toutefois, elle était détectée à 150j puis augmentait avec le développement. Son intensité était maximale à 270j. Chez l'adulte au cours du cycle reproductif, la bande immunoréactive de SR-BII était peu ou

pas détectable de juillet à octobre. Elle était détectable en novembre puis augmentait en intensité avec le cycle reproductif pour atteindre un maximum en février (fig. 8B.b).

*Analyses par Western blot de l'expression de SR-BII dans les STf de vison* : Le résultat des analyses par Western blot de SR-BII dans les STf était semblable au résultat obtenu dans les ITf. Au cours du développement, des traces de SR-BII étaient détectées entre 60j et 150j d'âge. Ensuite, l'intensité de la bande devenait plus intense à 180j puis augmentait avec le développement pour atteindre son maximum à 270j (fig. 8C.a). Chez l'adulte (fig. 8C.b), l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BII était faible de juillet à décembre puis augmentait significativement en janvier. L'intensité de la bande de SR-BII était maximale en février puis elle baissait durant les mois suivants.

#### 3.2.3.1.3 Expression de SR-BII dans les spermatozoïdes épидидymaires de vison

La figure 9 montre le résultat de l'analyse par Western blot de SR-BII effectuée sur des fractions de membranes et de cytosol obtenues à partir de spermatozoïdes épидидymaires de vison du mois de février. L'intensité de la bande immunoréactive de SR-BII était plus forte dans la fraction membranaire comparée à cette cytosolique ou à l'homogénat de spermatozoïdes entiers.

#### 3.2.3.2 Résultats des analyses densitométriques

##### 3.2.3.2.1 Expression de SR-BII dans des tissus de vison

L'expression de SR-BII était essentiellement limitée au testicule. Contrairement au SR-BI, nous n'avons détecté que des traces de SR-BII dans le foie du vison. L'expression de la protéine était aussi faible dans les autres tissus testés : la surrénale, l'intestin grêle, le rein, le cerveau, le cœur et le poumon (fig. 10A).

### 3.2.3.2.2 Expression de SR-BII dans le testicule de vison

*Expression de SR-BII dans les ITf de vison* : Nous n'avons pas détecté de SR-BII à 60, 90 et 120 jours. L'expression de la protéine augmentait significativement ( $p < 0.05$ ) à 150j puis de 180 à 210j ( $p < 0.001$ ) et à 240j ( $p < 0.05$ ). L'expression maximale de SR-BII était maximale à 270j (fig. 10B.a).

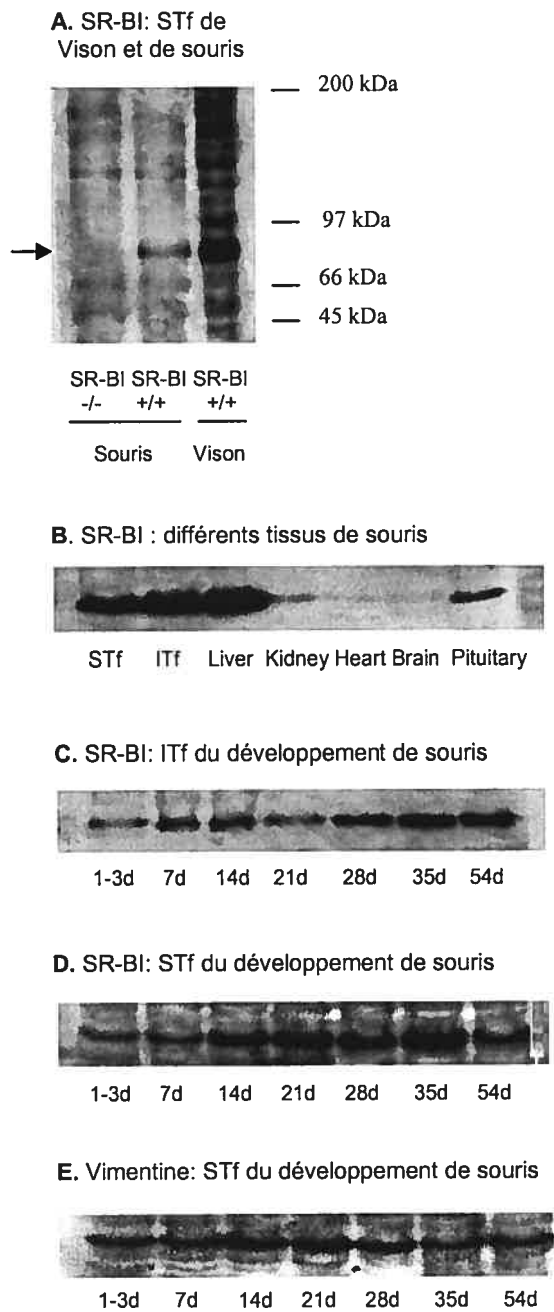
Chez l'adulte, l'expression de SR-BII était maximale en janvier et février et minimale de juillet à octobre (fig. 10B.b).

*Expression de SR-BII dans les STf de vison* : Au cours du développement du vison, l'expression de SR-BII dans les STf était similaire à celle décrite dans les ITf, c'est-à-dire une faible expression de 60j à 150j suivie d'une augmentation significative d'abord à 180j ( $p < 0.005$ ) et ensuite de 210j à 270j (fig. 10C.a). Le profil de l'expression de SR-BII normalisée par cellule de Sertoli (fig. 10D.a) était identique à celui de SR-BII dans les STf au cours du développement. Dans les STf du vison adulte, l'expression de SR-BII diminuait significativement en octobre, novembre et décembre. Elle augmentait ensuite en janvier ( $p < 0.01$ ) puis en février ( $p < 0.05$ ) où son niveau maximal était atteint (fig. 10C.b). L'expression de SR-BII normalisée par cellule de Sertoli dans les STf du vison adulte diminuait de façon significative de juillet à décembre puis augmentait de façon significative en janvier et en février ( $p < 0.001$ ) pour atteindre son niveau maximal en mars. Elle diminuait ensuite progressivement au cours des mois suivants pour atteindre son niveau minimal de juillet (fig. 10D.b). Le profil de l'expression de SR-BII normalisée par cellule de Sertoli fait en utilisant la clusterine comme marqueur était identique à celui de SR-BII (fig. 10E). La proportion de SR-BII par rapport à la masse protéinique totale de SR-BI et SR-BII était voisine de 0 % puis augmentait significativement entre 60 et 150j ( $p < 0.0005$ ) puis entre 180 et 270j ( $p < 0.0002$ ) au cours

du développement. Chez l'adulte, cette proportion était significativement plus élevée de mars à juin comparée à la période du cycle allant de juillet à décembre (fig. 10F.b).





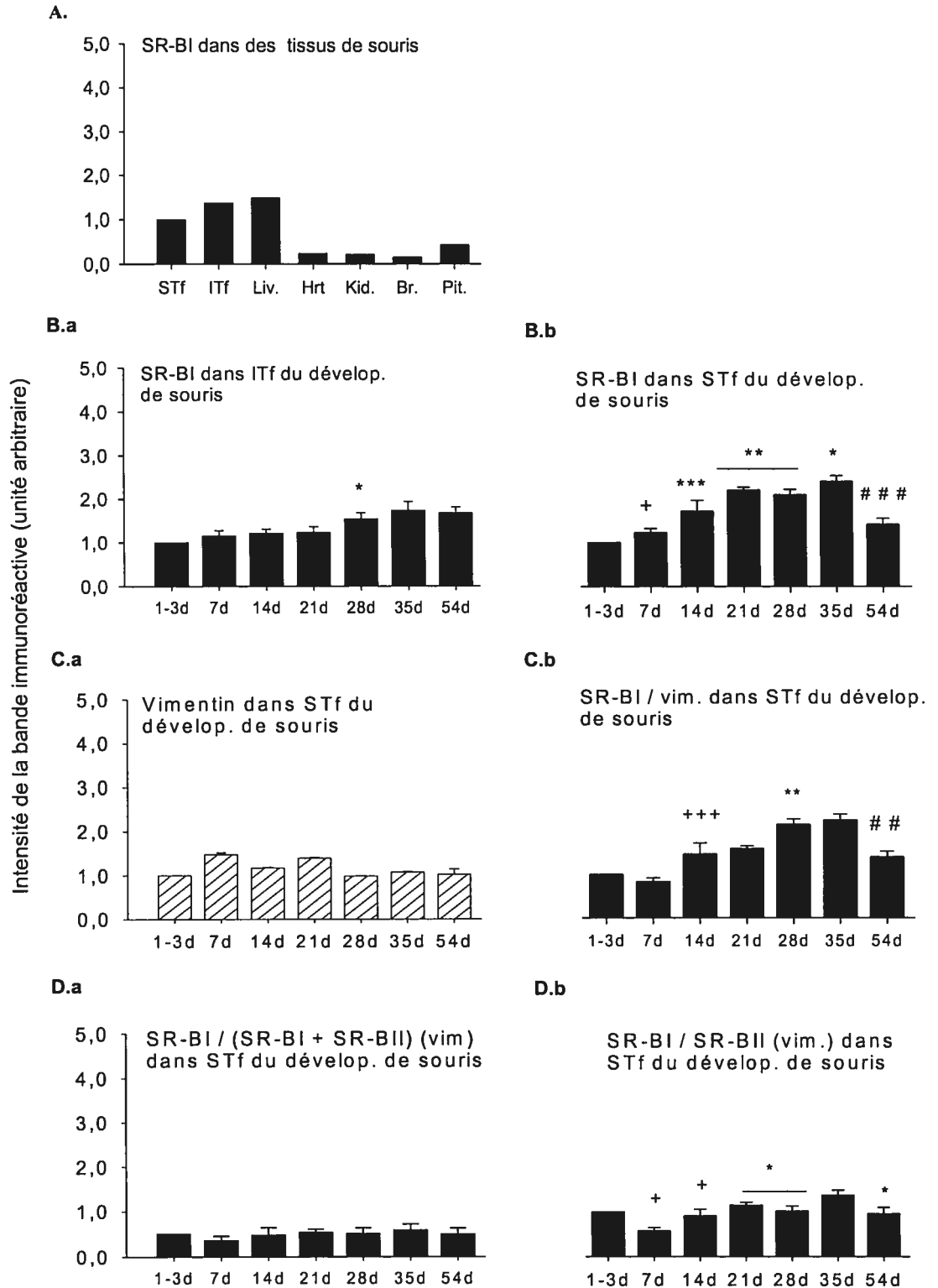
**Figure 1**

**Figure 2** Quantification de l'expression de SR-BI chez la souris

Les bandes immunoréactives obtenues par analyses de Western blot ont été numérisées et leur intensité quantifiée par densitométrie en utilisant le programme de Scion Image Software. La densité optique des bandes est exprimée en unité arbitraire.

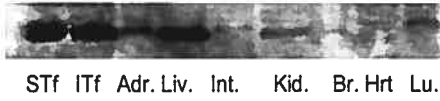
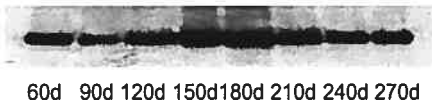
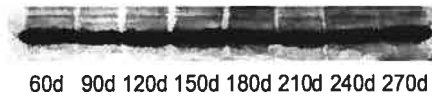
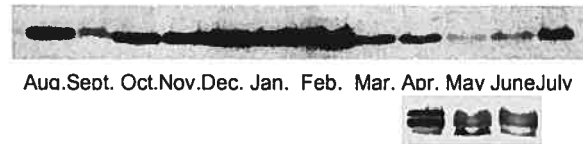
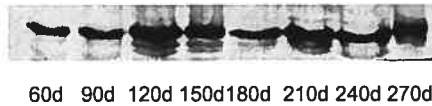
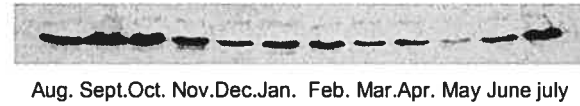
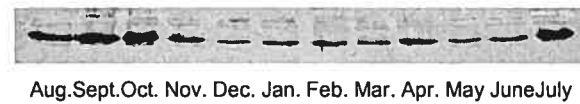
*Expression tissulaire de SR-BI* : l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BI était élevée dans le foie et le testicule (STf et ITf) et faible dans le cœur, le rein, le cerveau, et l'hypophyse (A). **B.a** : *Expression de SR-BI dans les ITf de souris au cours du développement post-natal*; **B.b** : *Expression de SR-BI dans les STf de souris au cours du développement post-natal*. (C.b) Normalisé par cellule de Sertoli (en utilisant la vimentine comme marqueur de la cellule de Sertoli), le profil de l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BI était demeuré inchangé dans les STf au cours du développement chez la souris. Le rapport SR-BI / (SR-BI + SR-BII) (D.a) représente le profil de la proportion de la masse protéinique de SR-BI par rapport à la masse totale de SR-BI et de SR-BII. La figure (D.b) montre le profil de l'expression de SR-BI rapportée à celle de SR-BII (SR-BI/SR-BII). (<sup>+</sup>p<0.01; <sup>+++</sup>p<0.0001; \*p<0.05; \*\*p<0.005; \*\*\*p<0.0005; ##p<0.002; ###p<0.0002) (Adr = surrénale; Liv = foie; Kid = rein; Br = cerveau; Hrt = cœur; Pit = hypophyse antérieure)

Figure 2



**Figure 3** Analyses par Western blot de l'expression de SR-BI chez le vison

La figure **A** montre l'analyse par Western blot de SR-BI dans différents tissus de vison. *Expression de SR-BI dans les ITf*: Vingt  $\mu\text{g}$  de protéines totales de l'homogénat de ITf de chaque âge ont été analysées par Western blot. Les figures sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Une bande immunoréactive de SR-BI était détectée dans les ITf à tous les âges au cours du développement post-natal (**B.a**) et au cours du cycle reproductif annuel saisonnier chez l'adulte (**B.b**). *Expression de SR-BI dans les STf*: les figures **C.a** et **C.b**, représentatives de 6 expériences indépendantes, indiquent respectivement l'analyse par Western blot de SR-BI dans les STf au cours du développement et au cours du cycle reproductif chez l'adulte du vison. Trois bandes immunoréactives étaient détectables pendant la régression testiculaire en avril, mai et juin chez l'animal adulte. *Profil de la vimentine et de la clustérine*: Nous avons examiné l'expression de la vimentine, marqueur des cellules de Sertoli, dans les STf de vison au cours du développement post-natal (**D.a**) et du cycle spermatogénétique chez l'adulte (**D.b**). La figure **E** montre l'expression de la clustérine, un autre marqueur de cellules de Sertoli, dans les STf de vison au cours du cycle reproductif chez l'adulte. (Adr = surrénale; Liv = foie; Int = intestin grêle; Kid = rein; Br = cerveau; Hrt = coeur; Lu = poumon)

**Figure 3****A. SR-BI: différents tissus de vison****B.a SR-BI: ITf du développement de vison****B.b SR-BI: ITf de vison adulte****C.a SR-BI: STf du développement de vison****C.b SR-BI: STf de vison adulte****D.a Vimentine: STf du développement de vison****D.b Vimentine: STf de vison adulte****E. Clustérine: STf de vison adulte**

**Figure 4** Analyses par Western blot de l'expression de SR-BI dans les spermatozoïdes épидидymaires de vison

Des spermatozoïdes (Spz) recueillis dans l'épididyme ont été lavés et séparés en fractions enrichies en membranes (Memb.) et en cytosol (Cytol.). Vingt  $\mu\text{g}$  de protéines totales de chaque fraction ont été analysées par Western blot en utilisant l'anticorps anti-SR-BI. La bande immunoréactive de SR-BI était forte dans la fraction membranaire mais n'était pas détectable dans la fraction cytosolique. L'intensité de la bande de SR-BI n'apparaissait pas plus forte après une longue exposition.

**Figure 4**

SR-BI: Spz (fractions) de  
vison



Spz Memb Cytol



**Figure 5** Quantification de l'expression de SR-BI chez le vison

A) *Quantification de l'expression tissulaire de SR-BI chez le vison* : les mesures de la densité optique des bandes immunoréactives ont été normalisées par rapport à celle de l'échantillon de rein. *Variation de l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BI dans les ITf de vison* : au cours du développement post-natal (**B.a**) et du cycle spermatogénétique chez l'adulte (**B.b**). *Variation de l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BI dans les STf de vison au cours du développement post-natal* (**C.a**) et, au cours du cycle reproductif chez l'adulte (**C.b**). *Profil de la vimentine dans les STf de vison* : au cours du développement post-natal (**D.a**) et au cours du cycle reproductif chez l'adulte (**D.b**). La figure E montre *le profil de la clustérine* chez l'adulte du vison au cours du cycle reproductif. **F.a** et **F.b** montrent respectivement le profil de l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BI normalisée par cellule de Sertoli au cours du développement et chez l'adulte. **G.a**) Nous avons aussi examiné l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BI par cellule de Sertoli en utilisant la clustérine comme marqueur des cellules de Sertoli. Les figures **H.a** et **H.b** montrent respectivement le profil de la masse de SR-BI par rapport à la masse totale de SR-BI et de SR-BII chez le vison au cours du développement post-natal et au cours du cycle reproductif chez l'adulte. (**G.b**) La normalisation de la bande immunoréactive de SR-BI par rapport à celle de SR-BII montrait une forte intensité du rapport en octobre, novembre et décembre, et faible en mai, avril et juin. (Adr = surrénale; Liv = foie; Kid = rein; Br = cerveau; Hrt = cœur; Lu = poumon)

**Figure 5**

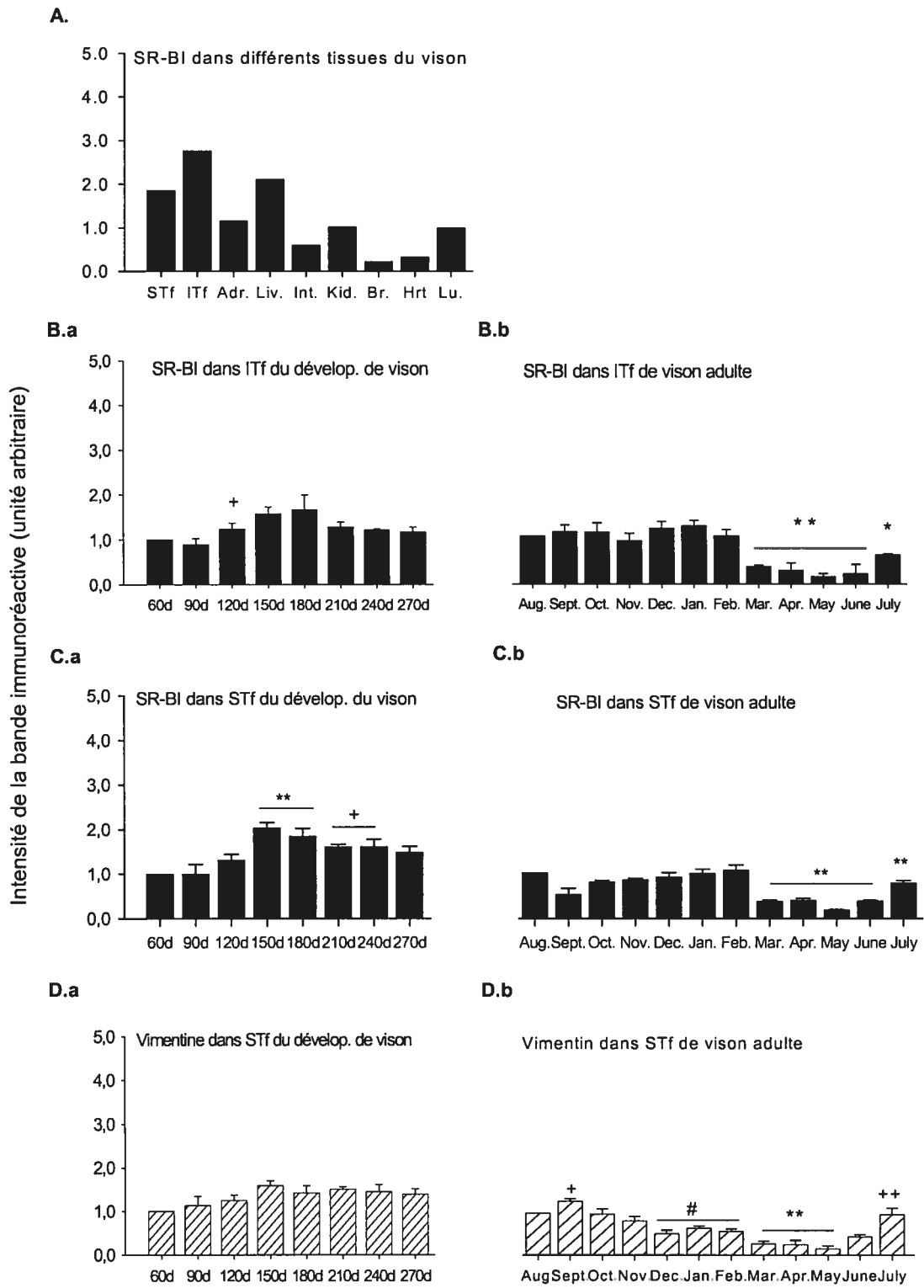
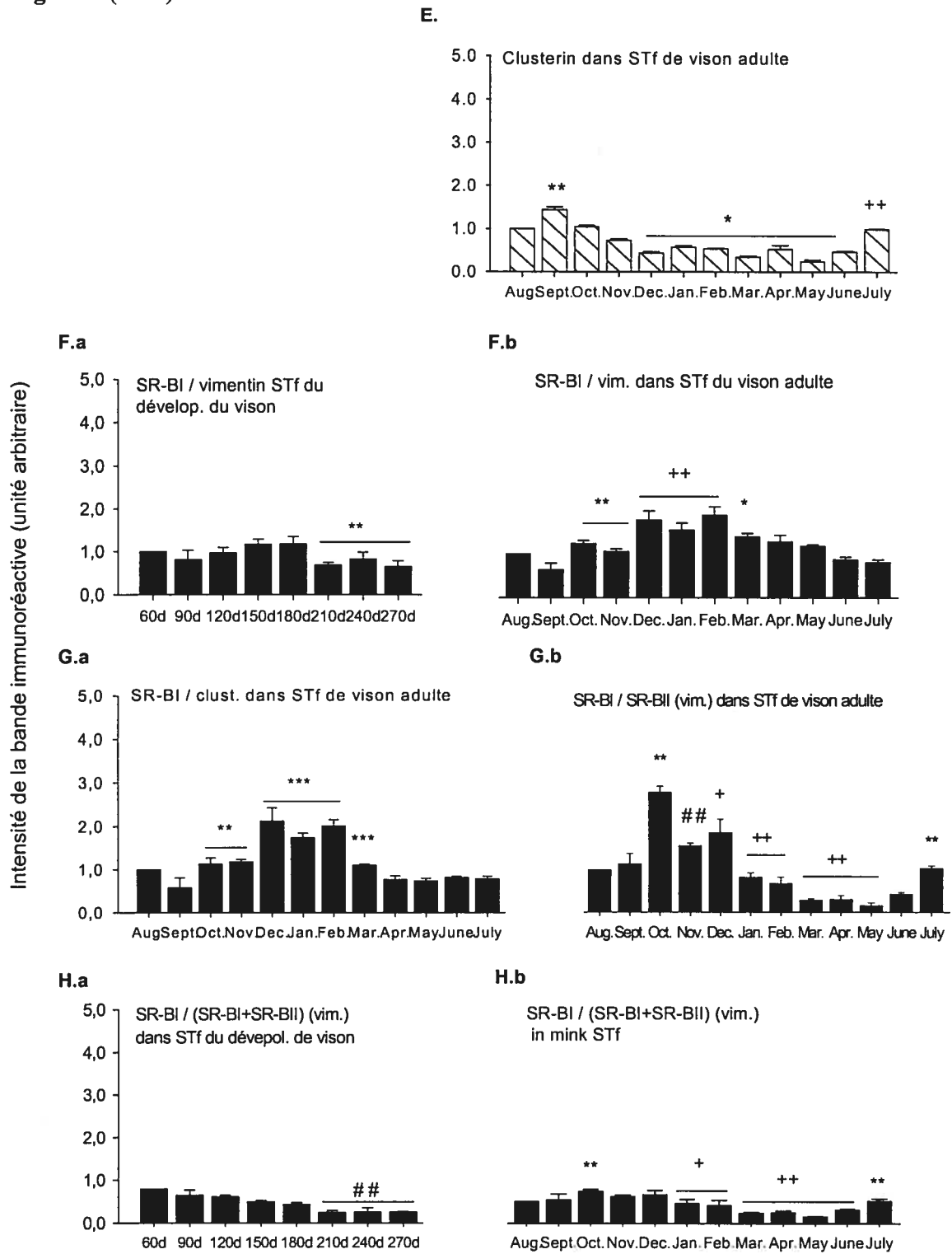
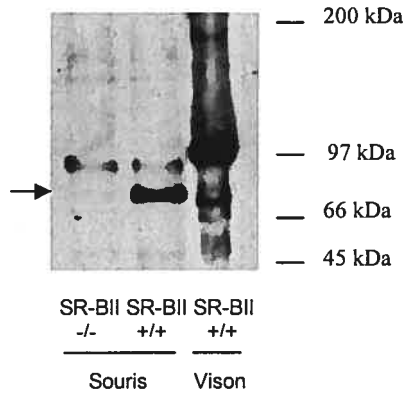
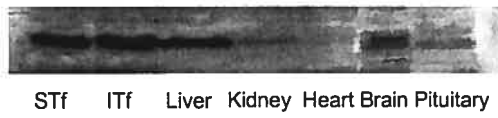
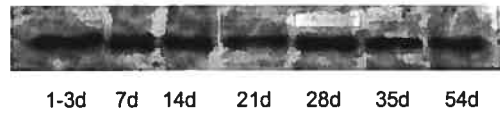
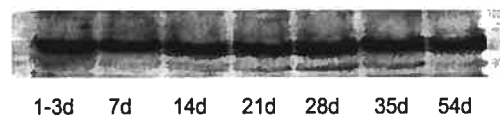


Figure 5 (suite)



**Figure 6** . Analyses par Western blot de l'expression de SR-BII chez la souris

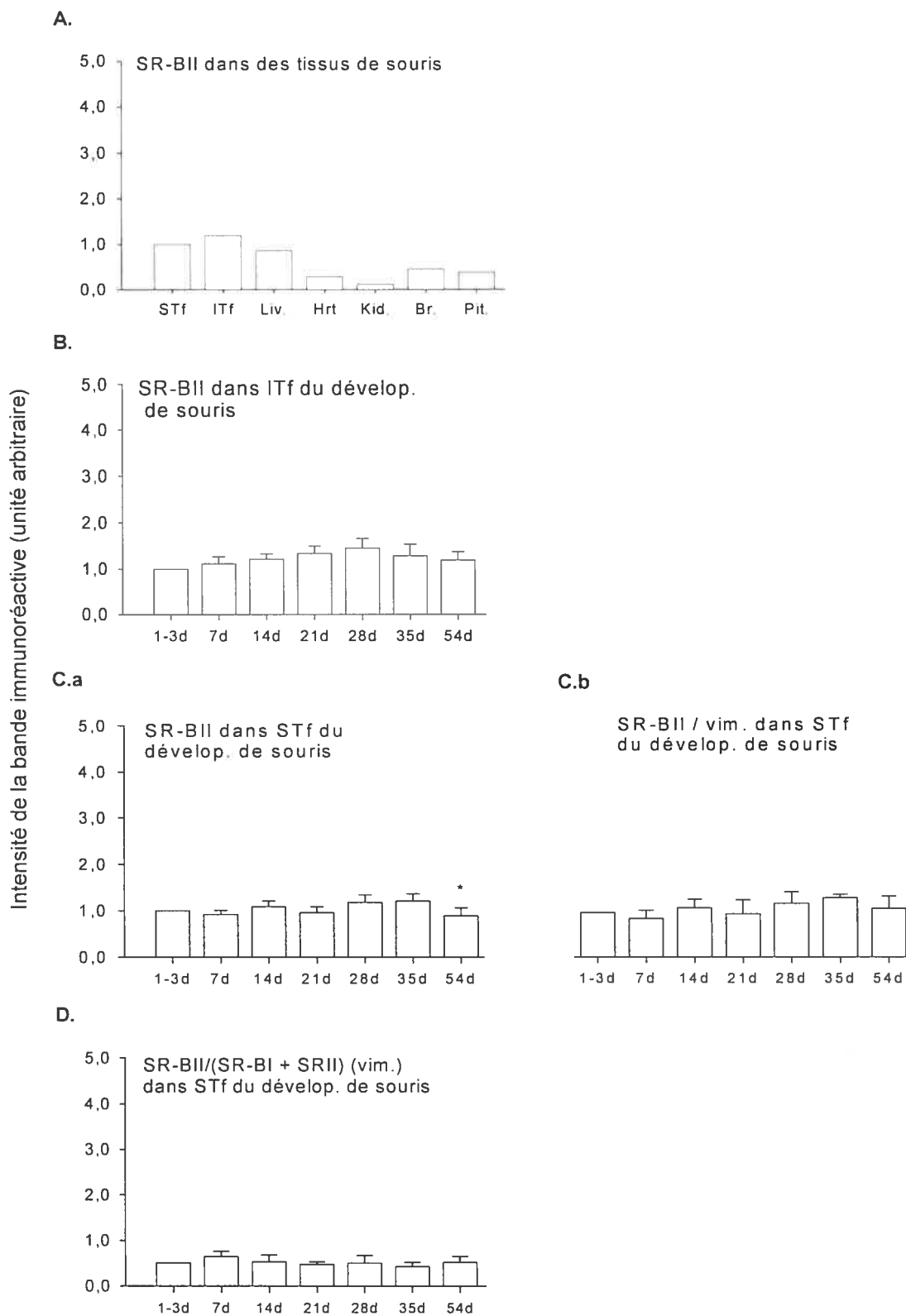
(A) *Contrôle de la spécificité de l'anticorps anti-SR-BII chez la souris et le vison* : 20 µg de protéines totales de STf de souris à l'état sauvage (SR-BII+/+), de vison du mois de février et de souris dépourvue de SR-BII (SR-BII-/-) ont été analysées par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre SR-BII. Plusieurs bandes immunoréactives étaient détectées dans les échantillons analysés. Toutefois, seule la bande de 85 kDa (indiquée par la flèche) était absente dans l'échantillon de souris SR-BII-/- mais présentes dans ceux de souris SR-BII+/+ et de vison. (B) Analyses par Western blot de SR-BII dans différents tissus de souris adulte. L'intensité de la bande immunoréactive de SR-BII était plus forte dans le testicule (ITf et STf) et le foie que dans le cœur, le rein, le cerveau et l'hypophyse. Vingt µg de protéines totales d'homogénat de ITf et de STf de souris à différents âges ont été soumises aux analyses par Western blot en utilisant l'anticorps dirigé contre SR-BII. Les figures C et D montrent les résultats des analyses par Western blot de SR-BII respectivement dans les ITf et dans les STf de souris au cours du développement post-natal.

**Figure 6****A. SR-BII: STf de vison et de souris****B. SR-BII : différents tissus de souris****C. SR-BII: ITf du développement de souris****D. SR-BII: STf du développement de souris**

**Figure 7** Quantification de l'expression de SR-BII chez la souris

**A)** *Analyses quantitatives de l'expression tissulaire de la protéine de SR-BII chez la souris.* L'intensité de la bande immunoréactive de la protéine de SR-BII était plus intense dans le testicule et le foie que dans les autres tissus testés dont le cœur, le rein, le cerveau et l'hypophyse. *Analyse quantitative de l'expression de SR-BII dans les ITf de souris:* la figure **B** montre l'analyse densitométrique de la bande immunoréactive de SR-BII dans les ITf au cours du développement testiculaire post-natal chez la souris et représente 3 expériences indépendantes. *Analyse quantitative de l'expression de SR-BII dans les STf de souris:* **C.a)** L'intensité de la bande immunoréactive de SR-BII ne variait pas de façon significative dans les STf au cours du développement post-natal chez la souris. Le résultat était le même lorsque cette intensité était normalisée par cellule de Sertoli (**C.b**). **D)** La proportion de SR-BII par rapport à la masse totale de SR-BI et de SR-BII n'indiquait aucune variation au cours du développement post-natal dans les STf de souris. (\* $p < 0.05$ ); (Adr = surrénale; Liv = foie; Kid = rein; Br = cerveau; Hrt = cœur; Pit = Pituitary)

Figure 7



**Figure 8** Analyses par Western blot de l'expression de SR-BII chez le vison

A) *Expression tissulaire de SR-BII* : 20 µg de protéines totales de l'homogénat de chaque tissu étaient analysées. *Analyses par Western blot de SR-BII dans les ITf de vison* : **B.a**) l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BII était détectable à partir de 150j et maximale à 270j. **B.b**) Chez l'adulte au cours du cycle reproductif, l'intensité de cette bande était faible entre les mois de juillet à octobre et très forte de janvier à juin (les fig. B.a et B.b sont représentatives de 3 expériences indépendantes). *Analyse par Western blot de SR-BII dans les STf de vison* : les figures **C.a** et **C.b**, qui représentent 6 expériences indépendantes, indiquent respectivement l'analyse de SR-BII dans les STf de vison au cours du développement post-natal et au cours du cycle reproductif annuel saisonnier chez l'adulte. (Adr = surrénale; Liv = foie; Int = intestin grêle; Kid = rein; Br = cerveau; Hrt = cœur; Lu = poumon)



## Figure 8

### A. SR-BII : différents tissus de vison



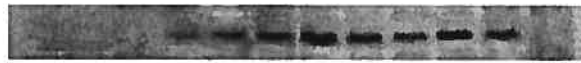
STf ITf Adr. Liv. Int. Kid. Br. Hrt Lu.

### B.a SR-BII: ITf du développement de vison



60d 90d 120d 150d 180d 210d 240d 270d

### B.b SR-BII: ITf de vison adulte



Aug. Sept. Oct. Nov. Dec. Jan. Feb. Mar. Apr. May June July

### C.a SR-BII: STf du développement de vison



60d 90d 120d 150d 180d 210d 240d 270d

### C.b SR-BII: STf de vison adulte



Aug. Sept. Oct. Nov. Dec. Jan. Feb. Mar. Apr. May June July

**Figure 9** Analyses par Western blot de l'expression de SR-BII dans les spermatozoïdes épидидymaires de vison

L'intensité de la bande immunoréactive de SR-BII était forte dans l'homogénat de spermatozoïdes (Spz) et dans la fraction membranaire (Memb.) mais faible dans la fraction cytosolique (Cytol) de spermatozoïdes.

**Figure 9**

SR-BII: Spz (fractions)  
de vison



Cytol Memb Spz

**Figure 10** Quantification de l'expression de SR-BII chez le vison

A) *Analyses quantitatives de l'expression tissulaire de SR-BII chez le vison:* L'intensité la bande immunoréactive de SR-BII était analysée par densitométrie dans chaque échantillon et normalisée par rapport à l'échantillon de rein. L'intensité de la bande immunoréactive de SR-BII était significativement plus élevée dans le testicule, notamment dans les ITf, comparée aux autres tissus testés. *Analyses quantitatives de l'expression de SR-BII dans les ITf et les STf de vison:* Les figures **B.a** et **B.b** montrent les analyses quantitatives de l'intensité de la bande immunoréactive de SR-BII dans les ITf respectivement au cours du développement post-natal et au cours du cycle reproductif chez l'adulte. Les figures **C.a** et **C.b** montrent l'expression de SR-BII dans les STf respectivement au cours du développement post-natal et au cours du cycle reproductif chez l'adulte. Nous avons normalisé l'expression de SR-BII par cellule de Sertoli au cours du développement (**D.a**) et au cours du cycle reproductif (**D.b**). **E)** Le profil de l'expression de SR-BII chez le vison adulte normalisée par cellule de Sertoli en utilisant la clustérine comme marqueur était similaire à celui obtenu avec la vimentine. **F.a)** La variation de la proportion de SR-BII par rapport à la masse totale de SR-BI et SR-BII au cours du développement post-natal et **F.b)** au cours du cycle reproductif annuel chez l'adulte du vison. (<sup>†</sup>p<0.01; <sup>††</sup>p<0.001; \*p<0.05; \*\*p<0.005; \*\*\*p<0.0005; <sup>#</sup>p<0.02; <sup>##</sup>p<0.002; <sup>###</sup>p<0.0002); (Adr = surrénale; Liv = foie; Kid = rein; Br = cerveau; Hrt = cœur; Lu = poumon)

Figure 10

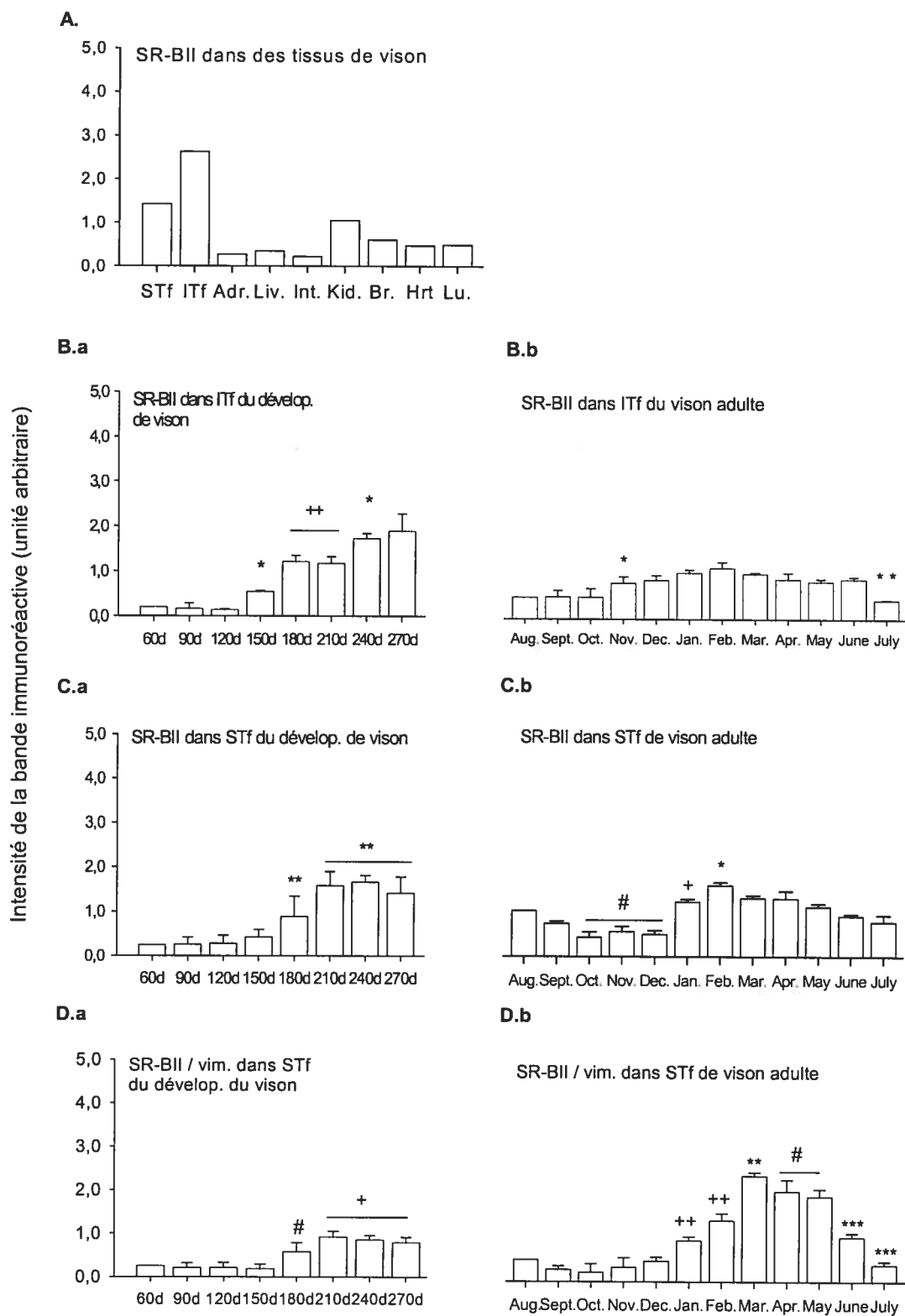
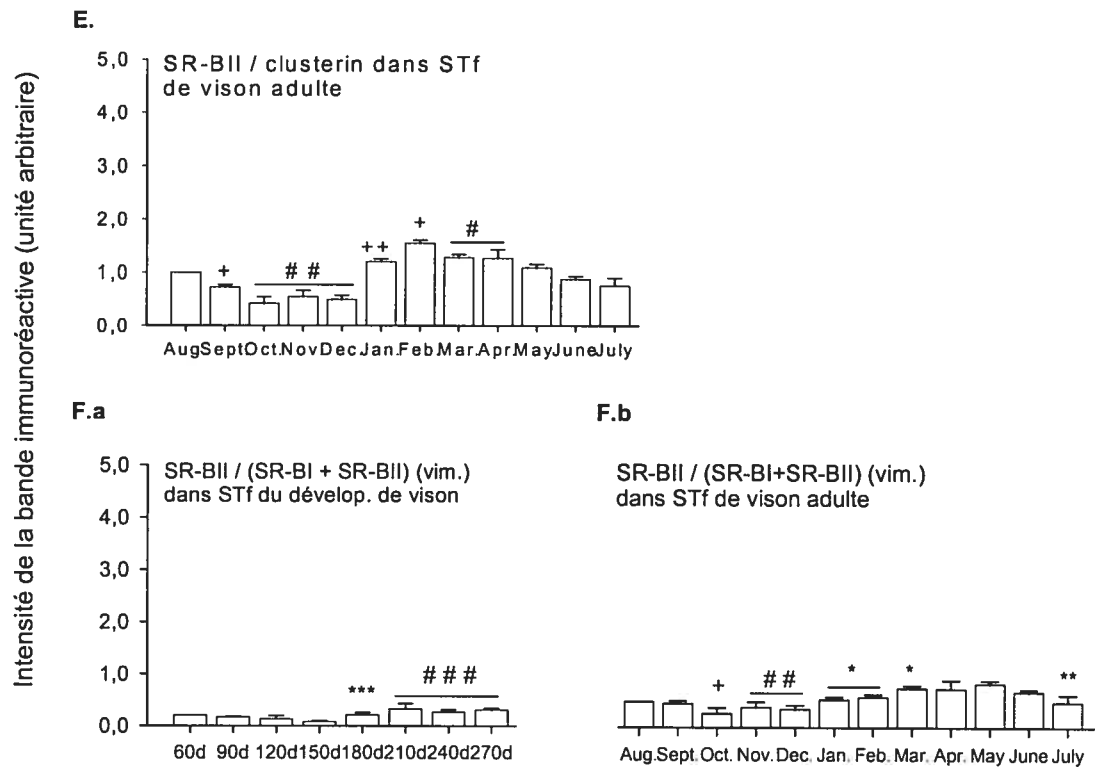


Figure 10 (suite)



#### 4. Discussion

##### 4.1 Méthodologie : Isolation des fractions enrichies en tubules séminifères (STf) et en tissu interstitiel (ITf)

Le rôle physiologique du cholestérol diffère dans les deux compartiments cellulaires du testicule. Dans le tissu interstitiel, le cholestérol est nécessaire aux cellules de Leydig pour la production des hormones stéroïdiennes dont la testostérone. Dans ces cellules, le cholestérol peut être synthétisé *de novo* (Morris et Chaikoff, 1959 ; Gwynne et Strauss, 1982) ou provenir du sang (Morris et Chaikoff, 1959). Les cellules de Sertoli soutiennent et nourrissent les cellules germinales en développement dans les tubules séminifères (Jutte et coll., 1982 ; Bishop et Griswold, 1987). Elles ont la capacité de synthétiser du cholestérol à partir de l'acétate *in vitro* (Wiebe et Tilbe, 1979) ; toutefois, il n'existe pas d'indications que ces cellules en synthétisent des taux significativement importants *in vivo*. En outre, la barrière hémato-testiculaire (Setchell et Waites, 1975) exclurait le libre passage du cholestérol sanguin vers les tubules (Setchell et Waites, 1975). L'expression du SR-BI et du SR-BII, qui sont des récepteurs spécialisés dans le transport sélectif du cholestérol (Krieger, 1999 ; Williams et coll., 1999 ; Silver et Tall, 2001 ; Eckhardt et coll., 2004), a été rapportée dans les deux compartiments cellulaires du testicule de rat ou de souris (Acton et coll. 1996 ; Webb et coll. 1997 ; Azhar et Reaven, 2002 ; Arena, et coll., 2004). C'est pourquoi nous avons fait l'étude de l'expression du SR-BI et du SR-BII dans les compartiments cellulaires individuels du testicule.

## **4.2 Étude de l'expression de SR-BI et SR-BII**

### **4.2.1 Expression de SR-BI**

#### **4.2.1.1 Contrôle**

Par analyses de Western blot, nous avons détecté 5 bandes immunoréactives de SR-BI dans les STf de souris SR-BI<sup>+/+</sup> (140-, 85-, 72-, 64- et 57- kDa). Différentes bandes immunoréactives de SR-BI ont été rapportées dans la littérature: 80- et 50 kDa dans la prostate de l'homme (Cao et coll., 1997); 70 kDa dans la cellule de Sertoli de rat (Shiratsuchi et coll., 1999); 82-, 64- et 54 kDa dans les cellules de chinese hamster ovary (CHO) transfectées au cDNA de SR-BI murin (Babitt et coll., 1997). Des homodimères ou hétérodimère de 164- et 225 kDa de SR-BI ont été également rapportés dans la surrénale de rat (Landschulz et coll., 1996; Williams et coll., 2000). Toutefois, à l'exception de la bande de 85 kDa toutes les autres bandes que nous avons détectées dans les STf de souris SR-BI<sup>+/+</sup> l'étaient aussi dans l'échantillon de souris SR-BI<sup>-/-</sup>. Dans les STf de vison, nous avons détecté 6 bandes immunoréactives (150-, 130-, 97-, 82-, 68- et 57- kDa). Toutefois, compte tenu des résultats que nous avons obtenus chez la souris, nous avons tenu compte seulement de la bande de 82 kDa dans notre étude de l'expression de SR-BI chez cette espèce.

#### **4.2.1.2 Expression de SR-BI chez la souris**

##### **4.2.1.2.1 Expression tissulaire de SR-BI chez la souris**

Nos résultats ont montré que l'expression de SR-BI était plus élevée dans le foie, les ITf et les STf comparée au rein, au cerveau, au cœur et à l'hypophyse antérieure. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Acton et coll. (1996) et Landschulz et coll. (1996) et qui ont montré que l'expression de SR-BI était préférentiellement élevée



dans le foie et les tissus stéroïdogéniques. Les études effectuées jusqu'à présent sur l'expression de SR-BI ont rapporté que ce récepteur est faiblement exprimé dans des extraits de testicule entier (Landschulz et coll., 1996 ; Reaven et coll., 2000). En séparant le testicule de souris en ses compartiments cellulaires individuels, nous avons montré que les taux de SR-BI dans le testicule et dans le foie étaient semblables. Parce que nos analyses de Western blots ont été réalisées sur des fractions enrichies en chacun des compartiments cellulaires du testicule plutôt que sur des homogénats de testicule entier, elles rendent mieux compte des niveaux d'expression de SR-BI dans chaque compartiment du testicule. Nous avons aussi montré que l'expression de SR-BI était faible dans le cœur, le rein, le cerveau et l'hypophyse de souris. Ces résultats soutiennent les données rapportées dans la littérature selon lesquelles cette expression serait faible dans le cœur et le rein (Landschulz et coll., 1996), le cerveau des rongeurs et de l'homme (Landschulz et coll., 1996 ; Srivastava et Jain, 2002).

#### 4.2.1.2.2 Expression de SR-BI dans le testicule durant le développement post-natal chez la souris

##### 4.2.1.2.2.1 Expression de SR-BI dans les ITf de souris

La présente étude est la première qui a examiné la dynamique de l'expression de SR-BI dans le testicule, et plus spécialement dans ces compartiments cellulaires, durant le développement post-natal chez la souris. Différentes études avaient rapporté l'expression de SR-BI dans le testicule chez divers rongeurs (Acton et coll., 1996 ; Landschulz et coll., 1996 ; Reaven et coll., 2000 ; Cao et coll., 1997 ; Murao et coll., 1997; Arena, et coll., 2004), toutefois, aucune de ces études n'avait établi un rapport entre l'expression du SR-BI et l'activité spermatogénétique chez ces animaux. Nos résultats ont montré que le niveau de SR-BI était relativement faible et stable entre 1 et 21 jours après la naissance, il augmentait

ensuite de façon significative à 28 jours puis se stabilisait. Au début du développement murin les cellules du tissu interstitiel, notamment les macrophages et les cellules de Leydig, prolifèrent puis atteignent leur nombre optimal avec la puberté (Hardy et coll., 1989). Le nombre maximal de cellules de Leydig est atteint autour de 28 jours après la naissance (Hardy et coll., 1989 ; Vergouwen et coll., 1991), celui des macrophages autour de 31 jours (Vergouwen et coll., 1993), celui des cellules des endothéliales des vaisseaux lymphatiques et des vaisseaux sanguins autour de 30 jours (Ross, 1967 ; Vergouwen et coll., 1993) et celui des cellules mésenchymateuses autour de 28 jours (Hardy et coll., 1989). La plupart de ces cellules exprimant le SR-BI (Yeh et coll., 2002; Arena, et coll., 2004), il est possible que l'augmentation du niveau de SR-BI que nous avons rapportée à 28 jours après la naissance dans les ITf soit due à la prolifération de ces cellules. Dans les conditions physiologiques, les cellules de Leydig de rat expriment peu de SR-BI (Reaven et coll., 2000). Toutefois, lorsque stimulées avec de l'hCG *in vitro*, elles répondaient par une augmentation du niveau d'expression de SR-BI (Landschulz et coll., 1996 ; Reaven et coll., 2000) suivie d'une synthèse accrue de testostérone (Reaven et coll., 2000). Il se pourrait donc que, dans le but de capter du cholestérol sanguin pour soutenir la synthèse de la testostérone, les cellules de Leydig augmentent leur niveau d'expression de SR-BI.

#### 4.2.1.2.2.2 Expression de SR-BI dans les STf de souris

Le profil de l'expression de SR-BI dans les STf est différent de celui que nous avons rapporté dans les ITf. Ce résultat rend compte de la pureté des fractions de tissu interstitiel et de tubules séminifères que nous avons générées et montre que le taux de SR-BI diffère dans les compartiments cellulaires du testicule. L'expression de SR-BI dans les STf de souris augmentait significativement entre 7 et 14 jours, entre 14 et 21 jours et entre 28 et 35 jours. Les STf contiennent des cellules de Sertoli et des cellules germinales à différents stades de leur développement. Les cellules de Sertoli prolifèrent

dès la naissance et atteignent leur nombre maximal autour de 17 jours (Vergouwen et coll., 1991). La pointe de SR-BI que nous avons observée à 21 jours serait due à la maturation des cellules de Sertoli qui expriment le SR-BI (Shiratsuchi et coll. 1999) ; quant à celle à 14 jours, elle serait liée aux pachytènes (voir schéma 1) dont le nombre est maximal à cet âge (Bellvé et coll., 1977). Les taux de SR-BI ou ceux normalisés par cellule de Sertoli montre que le SR-BI faisait une pointe à 35 jours chez la souris. Ceci suggère que les spermatides rondes et allongées dont l'apparition coïncide avec la complétion de la spermatogenèse, exprimeraient aussi le SR-BI. Cette interprétation est en accord avec les résultats de Arenas et coll. (2004) qui ont montré que le SR-BI était exprimé dans l'acrosome des spermatides rondes et allongées.

Différentes hypothèses sont envisageables pour expliquer le fait que l'expression de SR-BI augmente dans les tubules avec le développement post-natal chez la souris. Shiratsuchi et coll. (1997 et 1999) ont rapporté que le SR-BI est impliqué dans l'apoptose des cellules germinales par les cellules de Sertoli. Le nombre de cellules germinales augmentant avec le développement, les taux croissants de SR-BI pourraient être en rapport avec l'augmentation de l'apoptose. Dans les hépatocytes, le SR-BI effectue la transcytose de cholestérol dérivé des HDL de la région basale de la cellule vers le pôle apical (Silver et Tall, 2001). La cellule de Sertoli est une cellule bipolaire capable de capter du cholestérol sanguin à sa base (Fofana et coll., 1996) et du cholestérol contenu dans les corps résiduels à son apex (Pelletier et Vitale, 1994). Les cellules de Sertoli pourraient utiliser le SR-BI pour acheminer du cholestérol aux cellules germinales en développement. En effet, des études récentes ont montré que le SR-BI pourrait influencer la distribution membranaire du cholestérol, médier la prise sélective, la resécration des particules de HDL et le transport polarisé du cholestérol

(revue par Silver et Tall, 2001). Nous avons montré que la proportion de la masse protéinique de SR-BI par rapport à la masse protéinique totale de SR-BI et de SR-BII se situait autour de 50 % dans les STf et qu'elle ne variait pas durant le développement post-natal chez la souris. Acton et coll. (1996) et Webb et coll. (1997) qui ont rapporté que le SR-BI représenterait plus de 90 % de la masse totale de SR-BI et de SR-BII dans le testicule, cependant nos résultats ont montré que les taux de SR-BII et de SR-BI pourraient être semblables dans les STf.

#### **4.2.1.3 Expression de SR-BI chez le vison**

##### **4.2.1.3.1 Expression tissulaire de SR-BI chez le vison**

Notre étude est la première à avoir mesuré les taux l'expression de SR-BI dans les tissus de vison. Nos résultats ont montré que l'expression de SR-BI était plus élevée dans le foie et les tissus stéroïdogéniques dont le testicule et les glandes surrénales, que dans l'intestin, le rein, le cerveau, le cœur et le poumon. Nos résultats confirment ceux de la littérature rapportés chez le rat (Acton et coll., 1996 ; Landschulz et coll., 1996). Nos résultats concordent également avec les travaux de Kolleck et coll. (1999) et de Voshol et coll. (2001) qui ont rapporté de faibles taux de SR-BI dans le poumon et l'intestin respectivement. Les niveaux de SR-BI dans le rein, le cerveau et le cœur de vison étaient semblables à ce que nous avons rapporté chez la souris.

##### **4.2.1.3.2 Expression de SR-BI dans le testicule de vison durant le développement post-natal et le cycle reproductif annuel et saisonnier chez l'adulte**

#### 4.2.1.3.2.1 Expression de SR-BI dans les ITf

Nos résultats ont montré des niveaux élevés de SR-BI dans les ITf durant le développement du vison. Le tissu interstitiel est constitué de divers types cellulaires dont la plupart expriment le SR-BI (Reaven et coll., 2000; Yeh et coll., 2002; Arena, et coll., 2004). Deux sortes de cellules de Leydig, différentes par leur capacité à accumuler les lipides dans le cytoplasme, ont été rapportées dans le tissu interstitiel du développement du vison (Onstad, 1967 ; Zaleska-Freljan, 1976). Le nombre de macrophages par unité de surface du tissu interstitiel augmente significativement durant la puberté chez le rat (Hutson, 1990 ; Vergouwen et coll., 1991). Langer et coll. (2002) ont rapporté que la testostérone augmente les taux de SR-BI et stimule l'efflux du cholestérol dans les macrophages. Reaven et coll., (2000) ont rapporté que lorsque la concentration en cholestérol était diminuée dans les cellules de Leydig, ces dernières captent du cholestérol sanguin via le SR-BI pour la production de la testostérone. Toutefois, puisque la concentration de la testostérone ne varie pas significativement pendant les 200 premiers jours de naissance chez le vison (Kabbaj et coll., 2003), il est peu probable que l'augmentation de l'expression de SR-BI observée à 180 jours dans les ITf soit reliée à la production de la testostérone.

Chez le vison adulte, les taux de SR-BI étaient élevés entre juillet et février, mais faibles entre mars et juin. Un seul type de cellule de Leydig est rapporté dans le tissu interstitiel du vison adulte (Onstad, 1967 ; Zaleska-Freljan, 1976). Bostrom et coll. (1968) ont rapporté qu'à l'exception de la forte accumulation de lipides, très peu d'activités étaient identifiables dans les cellules de Leydig entre juin et octobre. Aussi, la concentration sérique de la testostérone n'augmente pas significativement avant décembre selon les mêmes auteurs. Les taux de SR-BI augmentaient dès la fin de

régression testiculaire en juillet avant l'augmentation significative de la concentration sérique en testostérone au début de la ré-initiation saisonnière de la spermatogenèse (Sundqvist et coll., 1984). La synthèse de la testostérone est maximale autour de janvier et février (Sundqvist et coll., 1984, Kabbaj et coll, 2003) cependant, nous n'avons détecté aucune augmentation significative des taux de SR-BI dans les ITf. Par conséquent, le SR-BI ne serait pas non plus directement impliqué dans la synthèse de la testostérone durant le cycle reproductif chez le vison adulte. Toutefois, le fait que la chute de SR-BI en mars coïncide avec celle de la testostérone (Sundqvist et coll., 1984, Kabbaj et coll, 2003) pourrait signifier que l'expression de SR-BI dans les ITf soit régulée par la testostérone. Dans ce cas, il se pourrait que le SR-BI soit préférentiellement exprimé dans les macrophages, puisque selon Langer et coll. (2002) ce serait au niveau de ces cellules que la testostérone agirait sur l'expression de SR-BI. Les macrophages constituent une proportion importante des cellules du tissu interstitiel de testicule adulte et sont impliqués dans le recyclage des stérols interstitiels (Hutson 1990). Il serait donc possible que l'expression interstitielle de SR-BI soit reliée à l'activité des macrophages.

#### 4.2.1.3.2.2 Expression de SR-BI dans les STF

Chez l'adulte du vison, la spermatogenèse est soumise à d'importants changements saisonniers (Onstad, 1967 ; Pilbeam et coll., 1979 ; Pelletier, 1986 et 1988). Durant le développement du vison, la spermatogenèse est complète à 240-242 jours après la naissance (Pelletier, 1986, 1988). La spermatogenèse chez le vison est active durant quelques mois (schéma 6). Elle débute en août, augmente ensuite progressivement pour atteindre son pic entre janvier et février (Pelletier, 1986, 1988).

Cette phase active est suivie d'une régression testiculaire qui débute en d'avril et finit en juillet (Pelletier, 1986). Dans les STf du développement du vison, nous avons mesuré les taux maximaux de SR-BI à 150-180 jours. Chez l'adulte, deux pointes successives étaient détectées, une en juillet et l'autre en février. Durant les 90 premiers jours du développement et au mois d'août chez l'adulte (schéma 6) les spermatogonies souches se divisent et les cellules de Sertoli sont présentes dans l'épithélium séminifère cependant, les niveaux de SR-BI étaient relativement élevés dans les STf durant ces périodes. Cette observation suggère que les spermatogonies souches et/ou les cellules de Sertoli expriment le SR-BI. Aux mois de mars et avril, la spermatogenèse est complète cependant, les niveaux de SR-BI étaient faibles dans les STf. En assumant que le nombre de cellules de Sertoli soit stable chez le vison adulte, on pourrait évaluer le niveau d'expression de SR-BI dans la cellule de Sertoli en normalisant cette expression par cellule de Sertoli dans l'épithélium séminifère. Nos résultats montrent que le SR-BI était maximal entre décembre et février. Ces résultats suggèrent que le SR-BI serait fortement exprimé dans les cellules de Sertoli durant la phase d'activité spermatogénétique maximale de janvier et mars (Pelletier, 1986, 1988). La quantité de lipides dans le tubule séminifère de diverses espèces animales (Kerr et De Kretser, 1975 ; Onstad, 1967 ; Paniagua et coll., 1987) et de cholestérol total (Kabbaj et coll., 2003) diminue dans les STf et les ITf pendant la phase active de la spermatogenèse, ce qui suggère que ces lipides puissent être utilisés par les cellules germinales. Silver et coll. (2001) ont rapporté que dans les cellules polarisées comme les hépatocytes, le SR-BI serait endocyté à la base dans les compartiments de recyclage, c'est-à-dire les compartiments contenant la transferrine, puis il serait transporté dans les vésicules sub-apicales. Les mêmes auteurs ont montré que cette voie est celle utilisée par les

hépatocytes pour transporter de lipides dérivés de HDL du pôle basal vers le pôle apical. Ce qui suggère que dans ces cellules polarisées, le SR-BI permettrait la transcytose de lipides dérivés de HDL de la base à l'apex. Les cellules de Sertoli étant aussi des cellules polarisées, il est possible que le SR-BI y joue un rôle similaire. C'est-à-dire qu'il ferait la transcytose de lipides en l'occurrence du cholestérol à la base de la cellule de Sertoli, en contact avec les HDL sanguins, à l'apex où le cholestérol serait transféré aux cellules germinales. Toutefois, le fait que la spermatogenèse ne présente pas d'anomalie chez l'animal dépourvu du gène de SR-BI (Rigotti et coll., 1997) pourrait signifier que le SR-BI ne serait pas le seul récepteur capable d'assurer la prise de cholestérol sanguin par la cellule de Sertoli. Une autre source importante de lipides dans les cellules Sertoli est la phagocytose des corps résiduels à l'issue de la spermiation qui eux contiennent des gouttelettes lipidiques (Lacy, 1967 ; Kerr et De Kretser, 1975). Les esters de cholestérol contenus dans ces corps résiduels sont hydrolysés dans les lysosomes par des hydrolases acides lysosomiales (Posalaki et coll., 1968). Mais puisque la prise d'esters de cholestérol médiée par le SR-BI n'utiliserait pas la voie lysosomiale (Johnson et coll., 1991), nous pensons le SR-BI ne serait pas impliqué dans la prise de cholestérol à l'apex de la cellule de Sertoli.

## **4.2.2 Expression de SR-BII**

### **4.2.2.1 Contrôle**

En utilisant un anticorps dirigé contre le SR-BII, nous avons détecté 4 bandes immunoréactives dans les STf de souris SR-BII +/+ (97-, 85-, 68- et 57 kDa) et de vison (180-, 97-, 85- et 72 kDa). Mulcahy et coll. (2004) ont rapporté une bande immunoréactive de 82 kDa de SR-BII dans les hépatocytes et les macrophages humains.



Par la technique d'immunoprécipitation et en utilisant un anticorps dirigé contre le SR-BII, Duncan et coll. (2002) ont obtenu une bande immunoréactive de 84.5 kDa et quelques bandes de poids moléculaires inférieurs dans les cellules de la rétine humaine. Selon ces auteurs, les bandes de poids moléculaires inférieurs seraient issues d'une dégradation protéolytique de la protéine de SR-BII. Nos résultats ont montré que seule la bande de 85 kDa était absente dans l'échantillon de souris SR-BII<sup>-/-</sup>. C'est pourquoi nos analyses ont tenu compte seulement de la bande de 85 kDa chez la souris et le vison. Les bandes immunoréactives supplémentaires que nous avons décrites seraient des bandes non spécifiques.

#### **4.2.2.2 Expression de SR-BII chez la souris**

##### **4.2.2.2.1 Expression tissulaire de SR-BII chez la souris**

La plupart des études rapportées sur l'expression tissulaire de SR-BII ont ciblé l'ARN messager (ARNm) de SR-BII. Une conclusion se dégagait toutefois de ces études, la plupart des tissus qui expriment l'ARNm de SR-BI expriment aussi l'ARNm de SR-BII (Webb et coll., 1997, 1998 ; Ritsch et coll., 2004). Chez la souris, l'ARNm de SR-BII représente une fraction importante des ARNm totaux de SR-BI et de SR-BII dans différents tissus testés (40 % dans le foie, 35 % dans les surrénales, 60 % dans le tissu adipeux) et constitue la forme prédominante dans le testicule (80 %) (Webb et coll., 1997). Par analyses de Western blot, nous avons détecté une expression significativement plus élevée de SR-BII dans les STf, les ITf et le foie. Bien que l'ARNm de SR-BII représente 80 % de la somme des ARNm de SR-BI et de SR-BII dans le testicule, il a été rapporté très peu de SR-BII dans le testicule entier de souris (Webb et coll., 1998) ou dans les cellules de Leydig de rat (Reaven et coll., 2000). Nos

résultats ont montré que les taux de SR-BII étaient semblables dans le testicule et dans le foie de souris. Nos résultats montrent une baisse significative du taux de SR-BII à 54 jours comparée à 35 jours. Nous ignorons si cette baisse continue avec l'âge. Si c'est le cas, il ne serait pas impossible que le niveau de SR-BII soit bas chez les souris adultes. Ceci pourrait expliquer pourquoi, contrairement à Webb et coll. (1998), nous avons mesuré des taux élevés de SR-BII aussi bien dans les ITf que dans les STf de souris de 42 jours. Les faibles taux de SR-BII que nous avons mesurés dans le rein concordent avec ceux rapportés par Ristch et coll. (2004) chez la souris et l'homme. Nous avons détecté des niveaux faibles de SR-BII dans le cœur, l'hypophyse antérieure et le cerveau de souris.

#### 4.2.2.2.2 Expression de SR-BII dans le testicule durant le développement post-natal chez la souris

##### 4.2.2.2.2.1 Expression de SR-BII dans les ITf de souris

Contrairement au SR-BI, nos résultats ne montrent pas de variation significative de l'expression de SR-BII dans les ITf durant le développement post-natal chez la souris. Ce résultat est en accord avec ceux non publiés de Reaven et coll. (2002) (cités par Azhar et Reaven, 2002) et qui rapportaient que l'expression de SR-BII dans le testicule augmentait avec le développement chez le rat, mais pas chez la souris.

##### 4.2.2.2.2.2 Expression de SR-BII dans les STf de souris

L'expression de SR-BII dans les STf ne variait pas de façon significative durant 35 premiers jours du développement post-natal chez la souris. Ceci pourrait signifier que l'expression de SR-BII, contrairement au SR-BI, serait peu influencée par l'activité

spermatogénétique chez la souris. Toutefois, nous avons noté une baisse significative de SR-BII entre 35 et 54 jours. Cette baisse de SR-BII pourrait être due à la migration vers l'épididyme des spermatozoïdes qui expriment le SR-BII, migration qui coïnciderait avec la complétion de la spermatogenèse (Oakberg, 1956). Le profil de SR-BII normalisé par cellule de Sertoli n'a pas montré de différence significative comparée à celui de SR-BII dans les STf. Nous en déduisons que l'expression de SR-BII ne varie pas significativement dans les cellules de Sertoli durant le développement post-natal chez la souris.

Nous avons aussi montré que la proportion de SR-BII par rapport à la masse totale de SR-BI et SR-BII était voisine de 50 % durant le développement post-natal dans les STf de souris. Ceci indique que les niveaux de SR-BII seraient aussi élevés que ceux de SR-BI, du moins dans l'épithélium séminifère, contrairement aux résultats rapportés par Acton et coll. (1996) et Webb et coll. (1997) dans des extraits de testicule entier. Le fait que nos analyses ont été effectuées dans les compartiments individuels plutôt que dans des extraits de testicule entier pourrait expliquer cet écart entre nos résultats et ceux rapportés dans la littérature.

### **4.2.2.3 Expression de SR-BII chez le vison**

#### **4.2.2.3.1 Expression tissulaire de SR-BII chez le vison**

Chez le vison, nous avons détecté la présence de SR-BII essentiellement dans le testicule. Toutefois, nous avons été surpris de constater la presque absence de SR-BII dans le foie. Chez la souris, nous avons détecté presque autant de SR-BII dans le foie que dans le testicule. Webb et coll. (1998) ont rapporté que l'anticorps anti-SR-BII, fait contre les tissus de souris, ne réagissait pas avec les tissus humains. Cependant, ceci ne

paraît pas être le cas chez le vison, puisque nous avons détecté une forte bande immunoréactive de SR-BII dans les STf et les ITf de vison en utilisant le même anticorps anti-SR-BII que nous avons utilisé chez la souris. Il serait intéressant d'examiner le niveau d'expression de l'ARNm de SR-BII dans le foie afin de déterminer à quel niveau (transcription ou transduction) cette baisse de l'expression de SR-BII se situerait. Si les niveaux d'ARNm de SR-BII s'avéraient aussi faibles que ceux de la protéine dans le foie du vison, ceci constituerait une différence majeure avec la souris chez qui l'ARNm de SR-BII dans le foie a été estimé à 40 % de la somme des ARNm de SR-BI et SR-BII et la protéine entre 10-15 % (Webb et coll., 1997, 1998).

4.2.2.3.2 Expression de SR-BII dans le testicule de vison durant le développement post-natal et le cycle reproductif saisonnier chez l'adulte

4.2.2.3.2.1 Expression de SR-BII dans les ITf

Nous n'avons pas détecté de SR-BII dans les ITf avant 150 jours chez le vison et nous avons mesuré un niveau maximal à 270 jours. Ce résultat concorde avec l'observation que l'expression de SR-BII dans le testicule de rat augmentait avec le développement (Azhar et Reaven, 2002). Le nombre de macrophages par unité de surface du tissu interstitiel augmente significativement durant la puberté chez le rat (Hutson, 1990 ; Vergouwen et coll., 1991). Il est donc possible que l'augmentation du niveau de SR-BII durant le développement soit reliée à la prolifération des macrophages qui expriment cette protéine (Mulcahy et coll., 2004).

Chez l'adulte, l'expression de SR-BII était maximale en janvier et février, mais contrairement au SR-BI, cette expression demeurait élevée durant la régression testiculaire. Webb et coll. (1998) ont rapporté que le SR-BII est moins efficace que le

SR-BI dans la captation sélective d'esters de cholestérol dérivés de HDL. Cependant, il est deux fois plus efficace dans l'efflux du cholestérol libre au niveau des macrophages selon Mulcahy et coll. (2004). Eckhardt et coll. (2004) ont de plus rapporté que le SR-BII médie la rétro-endocytose rapide des HDL et joue un rôle dans l'efflux du cholestérol des macrophages. Le SR-BII serait donc capable de promouvoir aussi bien l'endocytose d'esters de cholestérol dérivés des HDL dans les macrophages, que l'efflux du cholestérol des macrophages. Nos résultats concordent avec ces observations et permettent de supposer que durant la phase de sécrétion maximale de testostérone (janvier et février chez l'adulte), le SR-BII médie l'endocytose du cholestérol via les HDL sanguins par les macrophages et durant la régression testiculaire il assure l'efflux du cholestérol des macrophages vers le sang pour son transport inverse vers le foie (Ji et coll., 1999).

#### 4.2.2.3.2.2 Expression de SR-BII dans les STf

Nous avons mesuré des taux de SR-BII semblables à ceux que nous avons mesurés dans les ITf au cours du développement chez le vison. Chez l'adulte cependant, la pointe de SR-BII était plus tardive dans les STf que dans les ITf. Contrairement aux ITf, nous avons détecté peu de SR-BII en novembre et décembre. Les taux maximaux de SR-BII coïncidaient avec l'activité spermatogénétique maximale au cours du développement et chez l'adulte. Étant donné la capacité de SR-BII à promouvoir l'efflux du cholestérol (Mulcahy et coll., 2004 ; Eckhardt et coll., 2004), nous suggérons que durant l'activité spermatogénétique maximale le SR-BII servirait à contre-balancer le rôle de SR-BI en promouvant l'efflux du cholestérol des cellules germinales en cours de différenciation. Ceci permettrait de maintenir le niveau de cholestérol adéquat dans la

membrane plasmique des spermatozoïdes. Il se pourrait aussi que l'efflux de cholestérol que promouvrait le SR-BII soit un préalable nécessaire à l'apoptose qui se déroule durant la régression testiculaire (Sundqvist et coll., 1984). Ceci pourrait expliquer pourquoi le taux de SR-BII est élevé durant la régression.

Les corps résiduels sont relâchés des spermatozoïdes et en partie réabsorbés par les cellules de Sertoli qui les phagocytent. Ces corps résiduels sont identifiés grâce à des déterminants antigéniques qui seraient absents sur la membrane plasmique des spermatozoïdes (Millette, 1979). Puisque la pointe de SR-BII coïncidait avec l'apparition des spermatozoïdes, nous avons cherché à savoir si le SR-BII serait impliqué dans l'identification des corps résiduels par les cellules de Sertoli. Mais, parce que nous avons détecté le SR-BII dans la fraction membranaire des spermatozoïde, il est probable que ce récepteur soit exprimé dans la membrane plasmique de ces cellules. Cependant, il est prématuré à ce stade de nos travaux d'élaborer sur l'implication ou non de SR-BII dans l'identification des corps résiduels. Il est toutefois possible qu'il soit impliqué dans l'efflux du cholestérol préalable à la capacitation.

### **4.3 Conclusion**

Dans cette étude, nous avons mesuré dans un premier temps les taux de SR-BI et de SR-BII dans différents tissus de souris et de vison. Nous avons montré que cette expression était élevée dans le foie et les tissus stéroïdogéniques que nous avons testés. Nous avons mesuré les taux de ces deux récepteurs dans les compartiments individuels du testicule au cours du développement post-natal chez les deux animaux et du cycle reproductif annuel saisonnier chez le vison adulte. Nos résultats ont montré que seuls les taux de SR-BI étaient différents dans les deux compartiments cellulaires du testicule

chez les deux espèces animales. Chez la souris, seul le SR-BI augmentait avec l'achèvement de la puberté dans le compartiment interstitiel et avec l'activité spermatogénétique dans les tubules. Chez le vison, les taux de ces deux récepteurs étaient maximaux lorsque l'activité spermatogénétique était à son maximum. Ces résultats supportent l'hypothèse que le SR-BI et le SR-BII seraient impliqués dans le transport intratesticulaire et intratubulaire du cholestérol et que ces deux récepteurs joueraient des rôles différents dans ce processus.

#### **4.4 Perspectives futures**

Dans cette étude, nous avons montré que le SR-BI et le SR-BII sont impliqués dans le transport intratesticulaire et intratubulaire du cholestérol en accord avec l'hypothèse que nous avons formulée au début de notre étude. L'expression des deux récepteurs variait avec l'activité spermatogénétique. Ceci suggère que l'expression de SR-BI et de SR-BII dans l'épithélium séminifère est stade-spécifique. C'est pourquoi nous prévoyons mesurer l'expression des deux récepteurs dans des cellules germinales à différents stades du cycle spermatogénétique. Pour cela, nous voudrions procéder à l'isolation des cellules germinales à différents stades de leur développement. A l'exception de la phase d'activité spermatogénétique maximale (janvier et février) du cycle reproductif saisonnier annuel du vison adulte, l'expression de SR-BI et celle de SR-BII sont complémentaire. Il serait intéressant de savoir si ce «switch» entre l'expression des deux protéines est reflété au niveau transcriptionnel. C'est pourquoi nous envisageons de mesurer l'ARNm des deux récepteurs durant la spermatogenèse en utilisant la technique de "reverse transcription-polymerase chain reaction" (RT-PCR). Chez les patients hypercholestérolémiques, le métabolisme du cholestérol est

probablement altéré dans le testicule. C'est pourquoi nous voudrions examiner si cette affection est accompagnée d'une perturbation de l'expression de SR-BI ou de SR-BII.



## 5 Bibliographies

- Acton, S.L., Scherer, P.F., Lodish, H.F., and M. Eger. 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 21003-9.
- Acton, S., A. Rigotti, K.T. Landschulz, S. Xu, H.H. Hobbs, and M. Krieger. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-520.
- Allan, D. J., B. V. Harmon, and J. F. R. Kerr. 1987. Cell death in spermatogenesis. Perspectives on mammalian cell death. Oxford Univ. Press, London, pp. 229-258.
- Andersen, J.M., and J.M. Dietschy. 1978. Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in adrenal gland, ovary, and testis of the rat. *J. Biol. Chem.* 253: 9024-9032.
- Arenas, M.A., M.V.T. Lobo, E. Caso, L. Huerta, R. Paniaga, and M.A. Martín-Hidalgo. 2004. Normal and pathological human testes express hormone-sensitive lipase and the lipid receptors CLA-1 / SR-BI and CD36. *Hum. Patol.* 35: 34-42.
- Azhar, S., M. Medicherla, and E. Reaven. 1999. Up regulation of selective cholesteryl ester uptake pathway in mice with deletion of low-density lipoprotein receptor function. *J. Cell. Physiol.* 180: 190-202
- Azhar, S., and M.K. Menon. 1982. Receptor mediated gonadotropin action in gonadal tissues: relationship between blood cholesterol levels and gonadotropin stimulated steroidogenesis in isolated rat Leydig and luteal cells. *J. Steroid. Biochem.* 6: 175-84.
- Azhar, S., and E. Reaven. 2002. Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 195:1-26.
- Babitt, J., B. Trigatti, A. Rigotti, E.J. Smart, R.G. Anderson, S. Xu, and M. Krieger. 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem.* 272:13242-9.

- Bajpai, M., G. Gupta, S.K. Jain, and B.S. Setty. 1998. Lipid metabolizing enzymes in isolated rat testicular germ cells and changes associated with meiosis. *Andrologia*. 30:311-315.
- Baker, P.J., and P.J. O'Shaughnessy. 2001. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reprod*. 122: 227-234.
- Baranova, I., T. Vishnyakova, A. Bocharov, Z. Chen, A.T. Remaley, J. Stonik, T.L. Eggerman, and A.P. Patterson. 2002. Lipopolysaccharide down regulates both scavenger z receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells. *Infect. Immun*. 70: 2995–3003.
- Bartke, A. 1971. Concentration of free and esterified cholesterol in the testes of immature and adult mice. *J. Reprod. Fertil*. 25: 153-6.
- Barth, J.L., and W.S. Argraves. 2001. Cubilin and megalin: partners in lipoprotein and vitamin metabolism. *Trends Cardiovasc. Med*. 11: 26-31.
- Beckman, J.K., and J.G. Coniglio. 1980. The metabolism of polyunsaturated fatty acids in rat Sertoli and germinal cells. *Lipids*. 15: 389-394.
- Beckman, J. K., and J. G. Coniglio. 1979. A comparative study of the lipid composition of isolated rat Sertoli and germinal cells. *Lipids*. 14: 262-267.
- Beckman, J.K., M.E. Gray, and J.G. Coniglio. 1978. The lipid composition of isolated rat spermatids and spermatocytes. *Biochimica and Biophysica Acta*. 530: 367-374.
- Bellvé, A.R., J.C. Cavicchia, C.F. Millette, D.A. O'Brien, Y.M. Bhatnagar, M. Dym. 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J. Cell Biol*. 74: 68-85.
- Bishop, P.D., and M.D. Griswold. 1987. Uptake and metabolism of retinol in cultured Sertoli cells: evidence for a kinetic model. *Biochemistry*. 26: 7511-8.

- Bostrom, R.E., R.J. Aulerich, R.K. Ringer, and P.J. Schaible. 1968. Seasonal changes in the testis and epididymides of the ranch mink (*Mustela vison*). *Q. Bull. Much. Agric. Exp. Stn.*, 50: 538-558.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brisette, L., and S.P. Noel. 1986. The effects of human low and high density lipoproteins on the binding of rat intermediate density lipoproteins to rat liver membranes. *J. Biol. Chem.* 261: 6847-6852.
- Brown, M.S., J.L. Goldstein. 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 454-459.
- Buechler, C., M. Ritter, C.D. Quoc, A. Agildere, and G. Schmitz. 1999. Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor CLA-1 in human monocytes and macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262: 251-254.
- Butler, W.R., A.D. Johnson, and W.R. Gomes. 1968. Effect of short-term vitamin A deficiency on testicular lipids in the rat. *J. Reprod. Fert.* 15: 157-159.
- Calvo, D., and M.A. Vega. 1993. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J. Biol. Chem.* 268: 18929-35.
- Cao, G., C.K. Garcia, K.L. Wyne, R.A. Schultz, K.L. Parker, and H.H. Hobbs. 1997. Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1: evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J. Biol. Chem.* 272: 33068-76.
- Cao, G., L. Zhao, H. Stangl, T. Hasegawa, J.A. Richardson, K.L. Parker, and H.H. Hobbs. 1999. Developmental and hormonal regulation of murine scavenger receptor, class B, type 1. *Mol. Endocrinol.* 13:1460-73.
- Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature.* 168: 697-698.

- Chen, Y.I., K.B. Kraemer, and G.M. Reaven. 1980. Identification of specific high density lipoprotein-binding sites in rat testis and regulation of binding by human chorionic gonadotropin. *J. Biol. Chem.* 255: 9162-67.
- Chung, K.W., J.B. Hamilton. 1975. Testicular lipids in mice with testicular fertilization. *Cell Tiss. Res.* 160: 69-80.
- Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52: 198-236.
- Cohen, P.E., O. Chisholm, R.J. Arceci, E.R. Stanley, and J.W. Pollard. 1996. Absence of colony-stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmop/csfmop) mice results in male fertility defects. *Biol. Reprod.* 55: 310-7.
- Davis, B.K. 1980. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Arch. Androl.* 5: 249-54.
- de Villiers, W.J.S., and E.J. Smart. 1999. Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J. Leukoc. Biol.* 66: 740-746.
- Duncan, K. G., K. R. Bailey, J. P. Kane, and D.M. Schwartz. 2002. Human retinal pigment epithelial cells express scavenger receptors BI and BII. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292: 1017-22.
- Eckhardt, E.R., L.C. Bing Sun, N.R. Webb, and D.R. van der Westhuyzen. 2004. High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *J. Biol. Chem.* 279: 14372-81.
- Evans, H.M., S. Lepovsky, and S. Murphy. 1934. Vital need of the body for certain unsaturated fatty acids VI. Male sterility on fat-free diets. *J. Biol. Chem.* 106: 445-449.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, S. C. Frasch, M. L. Warner, and P. M. Henson. 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 5: 551-562.

- Febbraio, M., Hajjar, D.P., and R.L. Silverstein. 2001. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism.. *Clin. Invest.* 108: 785-91.
- Fidge, N.H. 1999. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J. Lipids Res.* 40: 187-201.
- Fielding, C.J., and P.E. Fielding. 2001. Cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta.* 1533: 175-189.
- Fielding, P.E., and C.J. Fielding, 1995. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry.* 34: 14288-92.
- Fleeger, J.L., J.P. Bishop, W.R. Gomes, and N.L. van Demark. 1968. Testicular lipids: II. Effect of unilateral cryptorchidism on fatty acids of testicular phospholipids and triglycerides. *J. Reprod. Fert.* 15: 9-14.
- Fluiter, K., D.R. van der Westhuyzen, and T.J.C. van Berkel. 1998. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J. Biol. Chem.* 273: 8434-8.
- Fofana, M., J.C. Maboundou, J. Bocquet, and D. Le Goff. 1996. Transfer of cholesterol between high density lipoproteins and cultured rat Sertoli cells. *Biochem. Cell Biol.* 74: 681-6.
- Fofana, M., C. Travert, S. Carreau, and D. Le Goff. 2000. Evaluation of cholesteryl ester transfer in the seminiferous tubule cells of immature rats *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 118: 79-83.
- Fukasawa, M., H. Adachi, K. Hirota, M. Tsujimoto, H. Arai, and K. Inoue. 1996. SR-BI, a class B scavenger receptor, recognizes both negatively charged liposomes and apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* 222: 246-250.

- Glass, C., R.C. Pittman, M. Civen, and D. Steinberg. 1985. Uptake of high density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat *in vivo* and by adrenal cells and hepatocytes *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 260: 744-750.
- Go, K.J., and D.P. Wolf. 1983. The role of sterols in sperm capacitation. *Adv. Lipids Res.* 20: 317-30.
- Goldstein, J.L., M.S. Brown, R.G. Anderson, D.W. Russell, and W.J. Schneider. 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 1-39.
- Gravis, C.J., and F.J. Weaker. 1977. Testicular involution following optic enucleation. An ultrastructural and cytochemical study. *Cell Tissue Res.* 184: 67-77.
- Gu, X., B. Trigatti, S. Xu, S. Acton, J. Babitt, and M. Krieger. 1998. The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via the scavenger receptor class B type I require not only receptormediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 273: 26338-48.
- Gu, X., K. Kozarsky, and M. Krieger. 2000. Scavenger receptor, class B, type I-mediated [3H]cholesterol efflux to high density and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 29993-30001.
- Gwynne, J.T., and J.F. Strauss. 1982. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.* 3: 299-329.
- Hall, P.F. 1984. Cellular organization for steroidogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 86: 53-95.
- Han, J., A.C. Nicholson, X. Zhou, J. Feng, A.M.J. Gotto, and D.P. Hajjar. 2001. Oxidized low density lipoprotein decreases macrophage expression of scavenger receptor B-I. *J. Biol. Chem.* 276: 16567-72.
- Hanukoglu, I. 1992. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 43: 779-804.

- Hardy, M.P., B.R. Zirkin, and L.L. Ewing. 1989. Kinetic studies on the development of the adult population of the Leydig cells in the testis of the pubertal rat. *Endocrinol.* 124: 762-770.
- Hemmingsen, B. 1967. Postnatal development and cyclic changes in the testes of mink. *Nord. Vet. Med.* 19: 71-80.
- Herrada, G., and D.J. Wolgemuth. 1997. The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. *J. Cell Sci.* 110: 1543-53.
- Hirano, K., S. Yamashita, Y. Nakagawa, T. Ohya, F. Matsuura, K. Tsukamoto, Y. Okamoto, A. Matsuyama, K. Matsumoto, J. Miyagawa, and Y. Matsuzawa. 1999. Expression of human scavenger receptor class B type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* 85: 108-116.
- Holm, C., T. Osterlund, H. Laurell, and J.A. Contreras. 2000. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 365-93.
- Hullinger, T.G., R.L. Panek, X. Xu, and S.K. Karathanasis. 2001. p21-activated kinase-1 (PAK1) inhibition of the human scavenger receptor class B, type I promoter in macrophages is independent of PAK1 kinase activity, but requires the GTPase-binding domain. *J. Biol. Chem.* 276: 46807-14.
- Hutson, J.C. 1992. Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell Tissue Res.* 267: 385-9.
- Hutson, J.C. 1990. Change in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biol. Reprod.* 43: 885-890.
- Ikemoto, M., H. Arai, D. Feng, K. Tanaka, J. Aoki, N. Dohmae, K. Takio, H. Adachi, M. Tsujimoto, and K. Inoue. 2000. Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6538-43.

- Jégou, B., C. Pineau, and A. Dupaix. 1995. La cellule de Sertoli: actualisation du concept de cellule nourricière. *M/S*. 4: 519-527.
- Jefcoate, C.R., B.C. McNamara, I. Artemenko, and T. Yamazaki. 1992. Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450<sub>scc</sub> in steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 43: 751-767.
- Ji, Y., B. Jian, N. Wang, Y. Sun, M.L. Moya, M.C. Phillips, G.H. Rothblat, J.B. Swaney, and A.R. Tall. 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272: 20982-5.
- Johnson, A.D., W.R. Gomes, M.J. Free, and N.L. van Demark. 1968. Testicular lipids. III. Effect of surgery and unilateral or bilateral cryptorchidism. *J. Reprod. Fert.* 16: 409-411.
- Johnson, M.S.C., P.-A. Svensson, K. Helou, H. Billig, G. Levan, L.M.S. Carlsson, and B. Carlsson. 1998. Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a high density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence. *Endocrinol.* 139: 72-80.
- Johnson, W.J., F.H. Mahlberg, G.H. Rothblat and M.C. Phillips. 1991. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1085: 273-298.
- Jutte, N.P.H.M., R. Jansen, J.A. Grootegoed, F.F.G. Rommers, O.P.F. Clausen, and H.J. van der Molen. 1981. Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. *J. Reprod. Fert.* 65: 431-438.
- Kabbaj, O., S.R. Yoon, C. Holm, J. Rose, M.L. Vitale, and R.-M. Pelletier. 2003. Relationship of the hormone-sensitive lipase-mediated modulation of cholesterol metabolism in individual compartments of the testis to serum pituitary hormone and testosterone concentrations in a seasonal breeder, the mink (*Mustela vison*). *Biol. Reprod.* 68: 722-34.
- Kerr, J.B., and D.M. De Kretser. 1975. Cyclic variations in Sertoli cell lipid content throughout the spermatogenic cycle in the rat. *J. Reprod. Fertil.* 43: 1-8.



- Knecht, T., and R.C. Pittman. 1989. A plasma membrane pool of cholesteryl esters that may mediate the selective uptake of cholesteryl esters from high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1002: 365–375.
- Kocher, O., A. Yesilaltay, C. Corivic, R. Pal, A. Rogotti, and M. Krieger. 2003. Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* 278: 52820-5.
- Kolleck, I., M. Schlame, H. Fechner, A.C. Looman, H. Wissel, and B. Rustow. 1999. HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes. *Free Radic Biol Med.* 27: 882-90.
- Krieger, M. 1998. The “best” of cholesterol, the “worst” of cholesterol: a tale of two receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 4077-80.
- Krieger, M. 1999. Charting the fate of the “good cholesterol”: identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 523-528.
- Lacy, D. 1967. The seminiferous tubule in mammals. *Endeavour.* 26: 101-109.
- Landschulz, K.T., R.K. Pathak, A. Rigotti, M. Krieger, and H.H. Hobbs. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* 98: 984-995.
- Lange, Y., V.M. Schmit, and J.M. Schreiber. 1988. Localization and movement of newly synthesized cholesterol in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinol.* 123: 81-86.
- Langer, C., B. Gansz, C. Geopfert, T. Engel, Y. Uehara, G. von Dehn, H. Jansen, G. Assmann, and A. von Eckardstein. 2002. Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 296: 1051-7.

- Lavallée, B., P.R. Provost, R. Roy, M.C. Gauthier, and A. Bélanger. 1996. Dehydroepiandrosterone-fatty acid esters in human plasma: formation, transport and delivery to steroid target tissues. *J. Endocrinol.* 150 : 119-124.
- Leblond, C.P., and Y. Clermont. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 55: 548-73.
- Le Goff, D. 1994. Follicular fluid lipoproteins in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1210: 226-232.
- Lekstrom-Himes, J., and K.G. Xanthopoulos. 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer binding protein family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273: 28545-8.
- Liscum, L., and N.J. Munn. 1999. Intracellular cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1438: 19-37.
- Lofts, B., and C. Boswell. 1960. Cyclical changes in the distribution of the testis lipids in the common frog, *Rana temporasia*. *Nature.* 187: 708-709.
- Loisel, G. 1903. Les graisses du testicule chez quelques mammifères. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 55: 1009.
- Lopez, D., and M.P. McLean. 1999. Sterol regulatory element-binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. *Endocrinol.* 140: 5669-81.
- Lu, Z., Y. Mu, B. Wang, X. Li, J. Lu, J. Li, C. Pan, T. Yanase, and H. Nawata. 2003. Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 1002-7.
- Lynch, K.M.J. and W.W. Scott. 1951. Lipid distribution in the Sertoli cell and Leydig cell of the rat testis as related to experimental alterations of the pituitary-gonad system. *Endocrinol.* 49: 8-14.

- Maboundou, J.C., M. Fofana, J. Fresnel, J. Bocquet, and D. Le Goff. 1995. Effect of lipoproteins on cholesterol synthesis in rat Sertoli cells. *Biochem. Cell Biol.* 73: 67-72.
- Malerod, L., L.K. Juvet, A. Hanssen-Bauer, W. Eskild, and T. Berg. 2002. Oxysterol-activated LXR/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299: 916-923.
- Margery, A.C., and D.L. Williams. 2003. SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. *Trends Endocrinol. Metab.* 14: 467-472.
- Marshall, A.J. 1955. Reproduction in birds: the male. *Mem. Soc. Endocrinol.* 4: 75-89.
- Matveev, S., A. Uittenbogaard, D. van Der Westhuyzen, and E.J. Smart. 2001. Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester. *Eur. J. Biochem.* 268: 5609-16.
- Mayerhofer, A., A.P.S. Hikim, A. Bartke, and L.D. Russell. 1989. Changes in the testicular microvasculature during photoperiod-related seasonal transition from reproductive quiescence to reproductive activity in the adult golden hamster. *Anat. Rec.* 224: 495-507.
- Millette, C.F. 1979. Cell surface antigens during mammalian spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 13 Pt 1:1-29.
- Mizutani, T., Y. Sonoda, T. Minegishi, K. Wakabayashi, and K. Miyamoto. 1997. Cloning, characterization, and cellular distribution of rat scavenger receptor class B type I (SRBI) in the ovary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 499-505.
- Morris, M.D., and I.L. Chaikoff. 1959. The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland and testis of the rat: dietary vs. endogenous contributions. *J. Biol. Chem.* 234: 1095-7.
- Mulcahy, J.V., R. D. Riddell, and J.S. Owen. 2004. Human scavenger receptor class B, type II (SR-BII) and cellular cholesterol efflux. *Biochem. J.* 377: 741-747.

- Murao, K., V. Terpstra, S.R. Green, N. Kondratenka, D. Steinberg, and O. Quehenberger. 1997. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 17551-7.
- Nes, W.D., Y.O. Lukyanenko, Z.H. Jia, S. Quideau, W.N. Howald, T.K. Pratum, R.R. West, and J.C. Hutson. 2000. Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology.* 141: 953-8.
- Ness, G.C. 1994. Developmental regulation of the expression of genes encoding proteins involved in cholesterol homeostasis. *Am. J. Med. Genet.* 50: 355-357.
- Ness, G.C., and S.J. Nazian. 1992. Developmental expression of multiple forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA in rat testes. *J. Androl.* 13: 318-322.
- Oakberg, E. 1956. A description of spermatogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* 99: 391-413.
- Ohgami, N., R. Nagai, A. Miyazaki, M. Ikemoto, H. Arai, S. Horiuchi, and H. Nakayama. 2001. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 276: 13348-55.
- Oka, K., K. Ishimura-Oka, M.J. Chu, M. Sullivan, J. Krushkal, W.H. Li, and L. Chan. 1994. Mouse very low density lipoprotein receptor (VLDLR) cDNA cloning, tissue specific expression and evolutionary relationship with the low density lipoprotein receptor. *European Journal Biochem.* 224: 975-982.
- Onstad, O. 1967. Studies on post-natal testicular changes, semen quality, and anomalies of reproductive organs in the mink. A clinical, histological, and histochemical study. *Acta Endocrinol.* 117: 1-117.
- Paniagua, R., M.C. Rodriguez, M. Nistal, B. Fraile and P. Amat. 1987. Changes in the lipid inclusion/Sertoli cell cytoplasm area ratio during the cycle of the human seminiferous epithelium. *Reprod Fertil.* 80: 335-341.

- Parkes, J.G., and A. Angel. 1990. Selective uptake of cholesteryl ester from high density lipoproteins by plasma membranes of adipose tissue. *Biochem. Cell Biol.* 68: 870-879.
- Parker, K.L. 1998. The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol. Cell Endocrinol.* 140: 59-63.
- Pedersen, R.C. 1988. Cholesterol biosynthesis, storage, and mobilization in steroidogenic organs. In: Yeagle, P.L. (Ed.), *Biology of Cholesterol*. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, pp. 39-69.
- Pelletier, R.-M. 1986. Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*) a seasonal breeder. *Am. J. Anat.* 175: 91-117.
- Pelletier, R.-M. 1988. Cyclic modulation of Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *Am. J. Anat.* 183: 68-102.
- Pelletier, R.-M., 2001. 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, pp. 183-197.
- Pelletier, R.-M., and S.W. Byers. 1992. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc. Res. Tech.* 20: 3-33.
- Pelletier, R.-M., and M.L. Vitale. 1994. Filipin vs enzymatic localization of cholesterol in guinea pig, mink, and mallard duck testicular cells. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 1539-54.
- Polyakov, L.M., M.L. Chasovskikh, and L.E. Panin. 1996. Binding and transport of benzo[a]pyrene by blood plasma lipoproteins: the possible role of apolipoprotein B in this process. *Bioconjugate Chem.* 7: 396-400.
- Posalaki, Z., D. Szabó, E. Bácsí, and I. Okrös. 1968. Hydrolytic enzymes during spermatogenesis study. *J. Histochem. Cytochem.* 16: 249-262.

- Reaven, E., L. Tsai, and S. Azhar. 1996. Intracellular events in the "selective" transport of lipoprotein-derived cholesterol esters. *J. Biol. Chem.* 271: 16208-17.
- Reaven, E., L. Tsai, and S. Azhar. 1995. Cholesterol uptake by the 'selective' pathway of ovarian granulosa cells: early intracellular events. *J. Lipid Res.* 36: 1602-1617.
- Reaven, E., L. Zhan, A. Nomoto, S. Leers-Sucheta, and S. Azhar. 2000. Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from testis. *J. Lipids Res.* 41: 343-356.
- Retterstøl, K., T.B. Haugen, and B.O. Christophersen. 2000. The pathway from arachidonic to docosapentaenoic acid (20:4n-6 to 22:5n-6) and from eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid (20:5n-3 to 22:6n-3) studied in testicular cells from immature rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1483: 119-131.
- Rhoads D., and L. Brissette. 2004. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking defining the rules for lipid traders. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 39-77.
- Rifai, N., F.F. Chao, Q. Pham, J. Thiessen, and S.J. Soldin. 1996. The role of lipoproteins in the transport and uptake of cyclosporine and dihydrotacrolimus into HepG2 and Jurkat cell lines. *Clinical Biochem.* 29: 149-155.
- Rigotti, A., B.L. Trigatti, M. Penman, H. Rayburn, J. Herz, and M. Krieger. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 12610-15.
- Rigotti, A., S.L. Acton, and M. Krieger. 1995. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J. Biol. Chem.* 270: 16221-24.
- Rigotti, A., H. E. Miettinen, and M. Krieger. 2003. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr. Rev.* 24: 357-387.

- Rinninger, F., M. Brundert, S. Jackle, P.R. Galle, C. Busch, J.R. Izbicki, X. Rogiers, D. Henne-Bruns, B. Kremer, C.E. Broelsch, et al. 1994. Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*. 19: 1100-14.
- Risbridger, G.P., and M.P. Hedger. 1992. Adult rat Leydig cell culture: minimum requirements for maintenance of luteinizing hormone responsiveness and testosterone production. *Mol. Cell. Endocrinol.* 83: 125-132.
- Ritsch, A., I. Tancevski, W. Schgoer, C. Pfeifhofer, R. Gander, P. Eller, B. Foeger, U. Stanzl, and J.R. Patsch. 2004. Molecular characterization of rabbit scavenger receptor class B types I and II: portal to central vein gradient of expression in the liver. *J. Lipid Res.* 45: 214-222.
- Rodrigueza, W.V., S.T. Thuahnai, R.E. Temel, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, and D.L Williams. 1999. Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *J. Biol. Chem.* 274: 20344-50.
- Ross, M.H. 1967. The fine structure and development of the peritubular contractile cell component in the seminiferous tubules of the mouse. *Am. J. Anat.* 121: 523-557.
- Rothblat, G.H., M. de la Llera-Moya, V. Atger, G. Kellner-Weibel, D.L. Williams, and M.C. Phillips. 1999. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J. Lipid Res.* 40: 781-796.
- Rozman, D., M. Fink, G. M. Fimia, P. Sassone-Corsi, and M. R. Waterman. 1999. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate(cAMP)/cAMP-responsive elementmodulator (CREM)-dependent regulation of cholesterologenic lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51) in spermatids. *Mol. Endocrinol.* 13: 1951-62.
- Russell, L. D., and Y. Clermont. 1977. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat. Rec.* 187: 347-66.

- Santamarina-Fojo, S., A.T. Remaley, E.B. Neufeld, and H.B. Brewer Jr. 2001. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J. Lipid Res.* 42: 1339-45.
- Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, and A. Vitelli. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21: 5017-5025.
- Schoonjans, K., J.S. Annicotte, T. Huby, O.A. Botrugno, E. Fayard, Y. Ueda, J. Chapman, and J. Auwerx. 2002. Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *EMBO J.* 3: 1181-7.
- Schreiber, J.R., D.B. Weinstein, and A.J.W. Hsueh. 1982. Lipoproteins stimulate androgen production by cultured rat testis cells. *J. Steroid Biochem.* 16: 39-43.
- Setchell, B.P., and G.M.H. Waites. 1975. The blood-testis barrier. In: Handbook of physiology. Vol. 5. K.W. Hamilton and R.O. Greep, eds. Williams and Wilkins, Baltimore. Pp. 143-172.
- Sheriff, D.S. and P. Govindarajulu. 1977. Lipids in human testis. *Hom. Res.* 8: 58-63.
- Shiratsuchi, A., Y. Kawasaki, M. Ikemoto, H. Arai, and Y. Nakanishi. 1999. Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* 274: 5901-8.
- Shiratsuchi, A., M. Umeda, Y. Ohba, and Y. Nakanishi. 1997. Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by Sertoli cells of the rat. *J. Biol. Chem.* 272: 2354-8.
- Silver, D.L., and A.R. Tall. 2001. The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Curr. Opin. Lipidol.* 12: 497-504.
- Silver, D.L., N. Wang, X. Xiao, and A.R. Tall. 2001. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type I results in selective sorting of HDL



- cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J. Biol. Chem.* 276: 25287-93.
- Spady, D.K., and J.M. Dietschy. 1983. Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel, monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. *J. Lipid Res.* 24: 303-315.
- Spady, D.K., D.M. Kearney, and H.H. Hobbs. 1999. Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-B1) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J. Lipid Res.* 40: 1384-94.
- Sparrow, C.P., and R.C. Pittman. 1990. Cholesterol esters selectively taken up from high-density lipoproteins are hydrolyzed extralysosomally. *Biochim. Biophys. Acta.* 1043: 203-210.
- Srivastava, R.A., J.C. Jain. 2002. Scavenger receptor class B type I expression and elemental analysis in cerebellum and parietal cortex regions of the Alzheimer's disease brain. *J. Neurol. Sci.* 196: 45-52.
- Stangl, H., M. Hyatt, and H.H. Hobbs. 1999. Transport of lipids from high and low density lipoproteins via scavenger receptor-BI. *J. Biol. Chem.* 274: 32692-8.
- Steinberger, E., A. Root, M. Ficher, *et al.* 1973. The role of androgens in the initiation of spermatogenesis in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37: 746-749.
- Stocco, D.M. 2000. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1486: 184-197.
- Stocco, D.M., and B.J. Clark. 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.* 17: 221-224.
- Sun, Y., N. Wang, and A.R. Tall. 1999. Regulation of adrenal scavenger receptor-BI expression by ACTH and cellular cholesterol pools. *J. Lipid Res.* 40: 1799-05.
- Svensson, P.A., M.S. Johnson, C. Ling, L.M. Carlsson, H. Billig, and B. Carlsson. 1999. 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: 2494-500.

Swarnakar, S., R.E. Temel, M.A. Connelly, S. Azhar, and D.L. Williams. 1999. Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J. Biol. Chem.* 274: 29733-9.

Tacer, K.F., T.B. Haugen, M. Baltzen, N. Debeljak, and D. Rozman. 2002. Tissue-specific transcriptional regulation of the cholesterol biosynthetic pathway leads to accumulation of testis meiosis-activating sterol (T-MAS). *J. Lipid Res.* 43: 82-89.

Teruya, J.H., S.Y. Kutsunai, D.H. Spear, P. Edwards, and C.F. Clarke. 1990. Testis-specific transcription initiation sites of rat farnesyl pyrophosphate synthetase mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 10: 2315-26.

Tung, K.S.K., L.E. Ellis, G.V. Childs, and M. Dufau. 1984. The dark mink: a model of male infertility. *Endocrinol.* 114: 922-929.

Vega, M.A., B. Segui-Real, J. Alcalde-Garcia, C. Cales, F. Rodriguez, J. Vanderkerckhove, and I.V. Sandoval. 1991. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* 266: 16818-24.

Vergouwen, R.P., R. Huiskamp, R.J. Bas, H.L. Roepers-Gajadien, J.A. Davids, and D.G. de Rooij. 1993. Postnatal development of testicular cell populations in mice. *J. Reprod. Fertil.* 99: 479-485.

Vergouwen, R.P., S.G. Jacobs, R. Huiskamp, J.A. Davids, and D.G. de Rooij. 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fert.* 93: 233-243.

Vinals, M., S. Xu, E. Vasile, and M. Krieger. 2003. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *J. Biol. Chem.* 278: 5325-32.

- Voshol, P.J., M. Schwarz, A. Rigotti, M. Krieger, A.K. Groen, and F. Kuipers. 2001. Down-regulation of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) expression in rodents under conditions of deficient bile delivery to the intestine. *J. Biochem.* 356: 317-325.
- Wang, N., W. Weng, J.L. Breslow, and A.R. Tall. 1996. Scavenger receptor BI (SR-BI) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knockout mice as a response to depletion of cholesterol stores. *J. Biol. Chem.* 271: 21001-4.
- Wang, S.P., N. Laurin, J. Himms-Hagen, M.A. Rudnicki, E. Levy, M.F. Robert, L. Pan, L. Oligny, and G.A. Mitchell. 2001. The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes. Res.* 9: 119-128.
- Webb, N.R., W.J. de Villiers, P.M. Connell, F.C. de Beer, and D.R. van der Westhuyzen. 1997. Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J. Lipids Res.* 38: 1490-5.
- Webb, N.R., P.M. Connell, G.A. Graf, E.J. Smart, W.J.S. de Villiers, F.C. de Beer, and D.R. van der Westhuyzen. 1998. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J. Biol. Chem.* 273: 15241-8.
- Wechsler, A., A. Brafman, et al. 2003. Generation of viable cholesterol-free mice. *Science.* 302: 2087.
- Wiebe, J.P., and K.S. Tilbe. 1979. De novo synthesis of steroids (from acetate) by isolated rat Sertoli cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 1107-13.
- Williams, D.L., M.A. Connelly, R.E. Temel, S. Swarnakar, M.C. Phillips, M. de la Llera-Moya, and G.H. Rothblat. 1999. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr. Opin. Lipidol.* 10: 329-339.
- Williams, D.L., M. de la Llera-Moya, S. Thuahnai, S. Lund-Katz, M.A. Connelly, S. Azhar, G. M. Anantharamaiah, and M.C. Phillips. 2000. Binding and cross-linking studies show that

- scavenger receptor BI interacts with multiple sites in apolipoprotein A-I and identify the class A amphipathic alpha-helix as a recognition motif. *J. Biol. Chem.* 275: 18897-904.
- Wing, T.Y., and H.S. Lin. 1977. The fine structure of testicular interstitial cells in the adult golden hamster with special reference to seasonal changes. *Cell Tissue Res.* 183: 385-393.
- Xu, S., M. Laccotripe, X. Huang, A. Rigotti, V. Zannis, and M. Krieger. 1997. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *J. Lipid Res.* 38: 1289-98.
- Yamamoto, Y., K. Shimamoto, N. Sofikitis, and I. Miyagawa. 1999. Effects of hypercholesterolaemia on Leydig and Sertoli cell secretory function and the overall sperm fertilizing capacity in the rabbit. *Human Reprod.* 14: 1516-21.
- Yamazaki, H., H. Bujo, J. Kusunoki, K. Seimiya, T. Kanaki, N. Morisaki, W.J. Schneider, and Y. Saito. 1996. Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J. Biol. Chem.* 271: 24761-8.
- Yeagle, P.L. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 822: 267-87.
- Yeh, Y.C., G.Y. Hwang, I.P. Liu, and V.C. Yang. 2002. Identification and expression of scavenger receptor SR-BI in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta *in vitro* and *in vivo*. *Atherosclerosis.* 161: 95-103.
- Yurchenko, P., and J.C. Schittny. 1990. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4: 1577-90.
- Zachowski, A. 1993. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *J. Biochem.* 294: 1-14.
- Zaleska-Freljan, K. 1976. Histological changes in the gonads of the American mink during postnatal development. *Acta. Theriol.* 21: 287-298.

Zuckerman, S.H., C. Panousis, J. Mizrahi, and G. Evans. 2000. The effect of  $\gamma$ -interferon to inhibit macrophage-high density lipoprotein interactions is reversed by 15-deoxy- $\delta$ 12,14-prostaglandin J2. *Lipids*. 35: 1239-47.

Zuckerman, S.H., C. Panousis, and G. Evans. 2001. TGF- $\beta$  reduced binding of high-density lipoproteins in murine macrophages and macrophage-derived foam cells. *Atherosclerosis*. 155: 79-85.

