

# Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'appareil reproducteur mâle\*

David H. VOLLE<sup>1</sup>, Jean-Marie FRENOUX<sup>2</sup>, Kevin MOUZAT<sup>1</sup>, Patrick VERNET<sup>2</sup>,  
Magali PROD'HOMME<sup>1</sup>, Aurore BRITAN<sup>2</sup>, Fabrice SAEZ<sup>2</sup>, Joëlle HENRY-BERGER<sup>1</sup>,  
Ayhan KOCER<sup>2</sup>, Françoise CAIRA<sup>1</sup>, Georges VEYSSIERE<sup>1</sup>, Joël R. DREVET<sup>2a</sup>,  
Jean-Marc A. LOBACCARO<sup>1a</sup>

1 Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, 2 Epididyme et Maturation des Gamètes Mâles, UMR CNRS-Université Blaise Pascal 6547- GEEM, Aubière, France

## RESUME

Les récepteurs nucléaires des oxystérols LXR (*Liver X receptor*)  $\alpha$  et LXR $\beta$  sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils sont activés par une série particulière d'oxystérols. Des antagonistes naturels ont été également identifiés comme les acides gras poly-insaturés ou certains sulfates de cholestérol plasmiques. L'étude des souris déficientes en LXRs a permis de les associer à la régulation de nombreux métabolismes (cholestérol, acides gras, glucose, stéroïdes).

Les LXRs et leur partenaire RXR (récepteur de l'acide rétinolique 9-*cis*) sont exprimés dans le tractus génital mâle et les testicules, et leurs ligands y sont à des concentrations physiologiquement actives. Dans ces organes, l'homéostasie du cholestérol doit être strictement régulée car 1) le cholestérol est un précurseur indispensable pour la synthèse des stéroïdes testiculaires ; 2) pendant la maturation épидидymaire, la membrane plasmique des spermatozoïdes subit des changements de composition notamment la diminution de cholestérol et de lécithines.

L'analyse des souris déficientes en récepteurs LXR  $\alpha$  et LXR $\beta$  a mis en évidence une déstructuration de la couche épithéliale du segment 2 de la tête de l'épididyme, ainsi qu'une fragilité des spermatozoïdes recueillis. Au total, les analyses de physiologie intégrative et moléculaire mettent en évidence le rôle des récepteurs nucléaires LXRs dans la physiologie de la reproduction chez le mâle.

**Mots-clés** : récepteurs nucléaires, LXR, homéostasie du cholestérol, cholestérol, épидидyme, reproduction

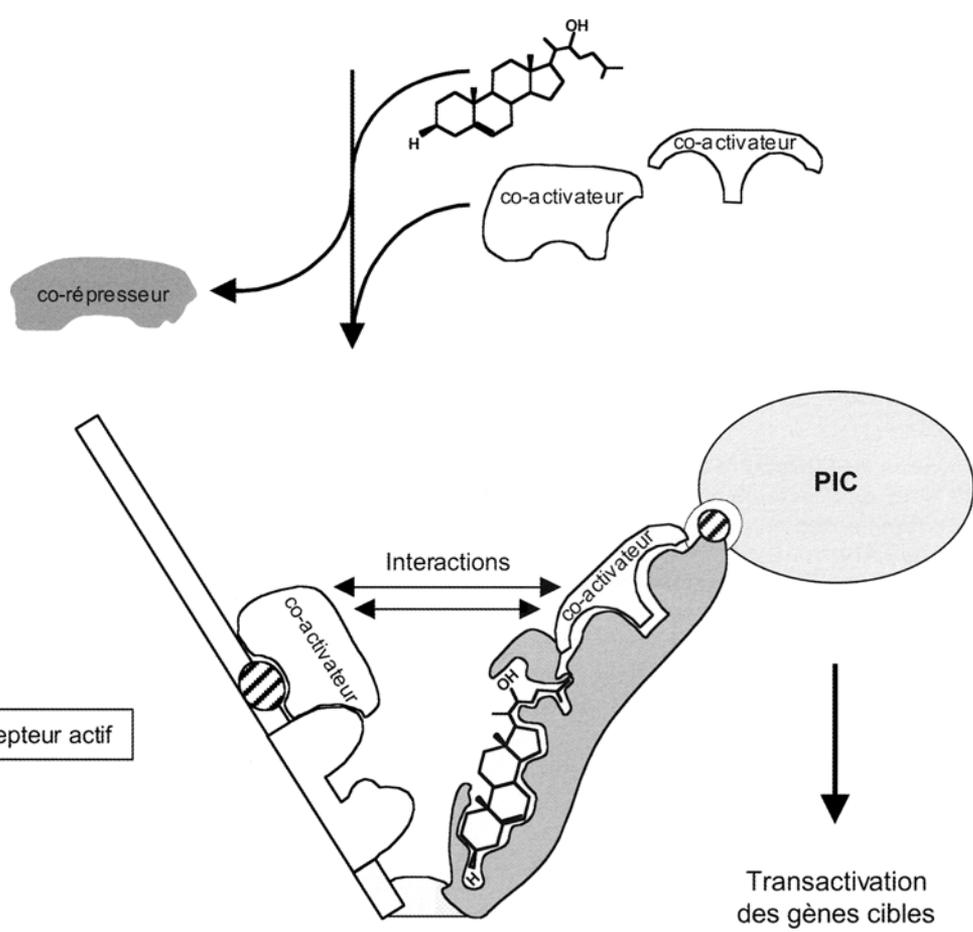
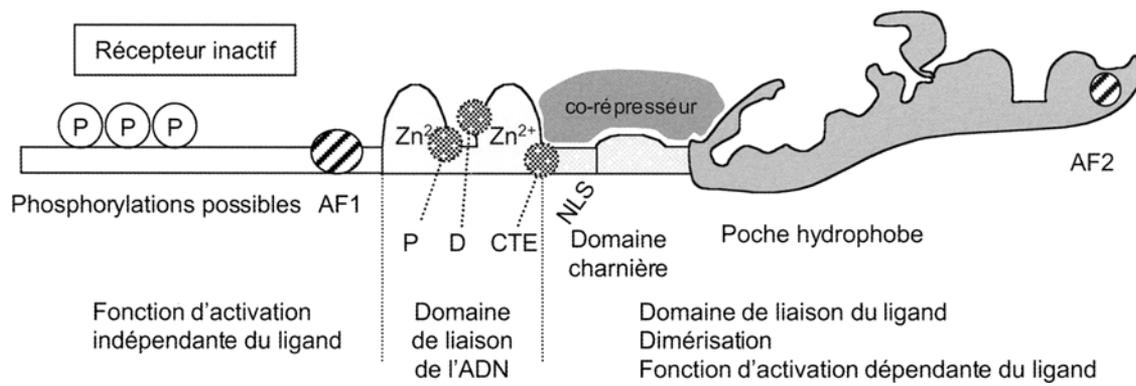
## I. LES RECEPTEURS NUCLEAIRES DES OXYSTEROLS LXRS (*Liver X Receptor*)

### 1. Structure des LXRS

Les LXRS sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. D'un point de vue structural (Figure 1), cette famille d'activateurs transcriptionnels est caractérisée par trois domaines fonctionnellement indépendants [19]. (1) Du côté amino-terminal, le domaine modulateur possède une fonction d'activation nommée AF1, indépendante du ligand, potentiellement modulable par des phosphorylations même si ce dernier point n'a pas encore été démontré pour les récepteurs LXRS. (2) Le domaine central de liaison de l'ADN est constitué d'une structure en doigts de zinc comportant : la boîte P (trois résidus acides aminés définissant la spécificité de fixation à l'élément de réponse hormonale), la boîte D (responsable de l'hétérodimérisation avec RXR, le récepteur de l'acide rétinolique 9-*cis*), la région CTE (*carboxy-terminal extension*). La présence de ce domaine central signe véritablement l'appartenance à la super-famille. (3) Le domaine carboxy-terminal se décompose en plusieurs

Correspondance :

Pr. Jean-Marc A. LOBACCARO - Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, UMR CNRS-Université Blaise Pascal 6547, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière, France  
- Tel (33) 473 40 74 16 - Fax (33) 473 40 70 42 -  
Email j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr



**Figure 1. Représentation schématique du récepteur LXR et principales fonctions des différents domaines.**

**Le ligand utilisé dans ce schéma est le 22(R)-hydroxycholestérol, présent à forte concentration dans les tissus stéroïdogènes. AF1, domaine d'activation indépendant du ligand ; AF2, domaine d'activation dépendant du ligand ; P, séquence peptidique de reconnaissance de l'élément de réponse hormonal ; D, séquence peptidique impliquée dans la dimérisation avec RXR ; CTE, extension peptidique carboxy-terminale ; NLS, signal de localisation nucléaire ; P, phosphorylations. D'après [32].**

sous-régions : un domaine charnière qui permet la fixation des co-répresseurs et contient une partie de la séquence de localisation nucléaire (NLS) ; la poche hydrophobe de liaison du ligand ; une région transactivatrice (AF2) qui est démasquée après fixation du ligand et qui peut recruter les co-activateurs. Enfin, certains déterminants peptidiques sont également impliqués dans la dimérisation du récepteur avec RXR.

## 2. Mode d'action des LXRs

Il existe deux isoformes (LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ ) ayant jusqu'à 80% d'identité dans les domaines de liaison de l'ADN et de l'hormone [21]. L'analyse des profils d'expression montre que LXR $\beta$  est ubiquiste, alors que LXR $\alpha$  a une expression restreinte à des tissus présentant un fort métabolisme lipidique tels que le foie, les tissus adipeux brun et blanc, les tissus stéroïdogènes [24]. Dans leur configuration canonique, les LXRs forment des hétérodimères avec le récepteur nucléaire RXR (*retinoid X receptor*). En l'absence de ligand, l'hétérodimère est fixé constitutivement sur les éléments de réponse à l'ADN, séquences de type DR4 (*Direct Repeat 4*), situées dans la région promotrice des gènes cibles, constituées de la répétition d'hexamères (AGGTCA) espacés de quatre nucléotides. En absence de ligand, RXR/LXR est associé avec des co-répresseurs qui recrutent des histones dé-acétylases et gardent la chromatine dans un état condensé, entraînant la répression des gènes cibles. La présence d'un des deux ligands induit le départ des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs spécifiques

permettant l'acétylation de la chromatine par des histones acétyl-transférases, créant ainsi un environnement permissif pour l'initiation de transcription (Figure 2). L'hétérodimère RXR/LXR est dit permissif : les ligands de chaque récepteur peuvent activer la transcription des gènes cibles, et la liaison des deux ligands a un effet additif voire synergique sur la transcription des gènes cibles [36].

## 3. Les ligands des LXRs

Les LXRs sont activés par une série d'oxystéroïdes spécifiques du lieu de synthèse [12] : le 24(S),25-époxycholestérol dans le foie, le 24(S)-hydroxycholestérol dans le cerveau; le 27-hydroxycholestérol dans les macrophages et le 22(R)-hydroxycholestérol, intermédiaire de la biosynthèse des stéroïdes, dans les tissus stéroïdogènes (Figure 3 et [32]). Le FF-MAS (*follicular fluid meiosis activating sterol* ; Figure 3), intermédiaire de la synthèse du cholestérol à partir du lanostérol retrouvé en quantité importante dans les follicules pré-ovulatoires, est un activateur efficace de LXR $\alpha$ [11]. Cependant, l'aptitude à la reprise de la méiose sur les ovocytes ne semble pas passer par les LXRs [8]. L'effet hypocholestérolémiant des LXRs a conduit de nombreux groupes pharmaceutiques à développer des agonistes non stéroïdiens spécifiques, tels que le T0901317 ([25] ; Figure 3).

Des antagonistes naturels des LXRs ont également été décrits : les hydroxy-cholestérol sulfatés (dont l'accumulation a des conséquences dramatiques au niveau de la plaque d'athérome), et certains acides gras poly-insaturés

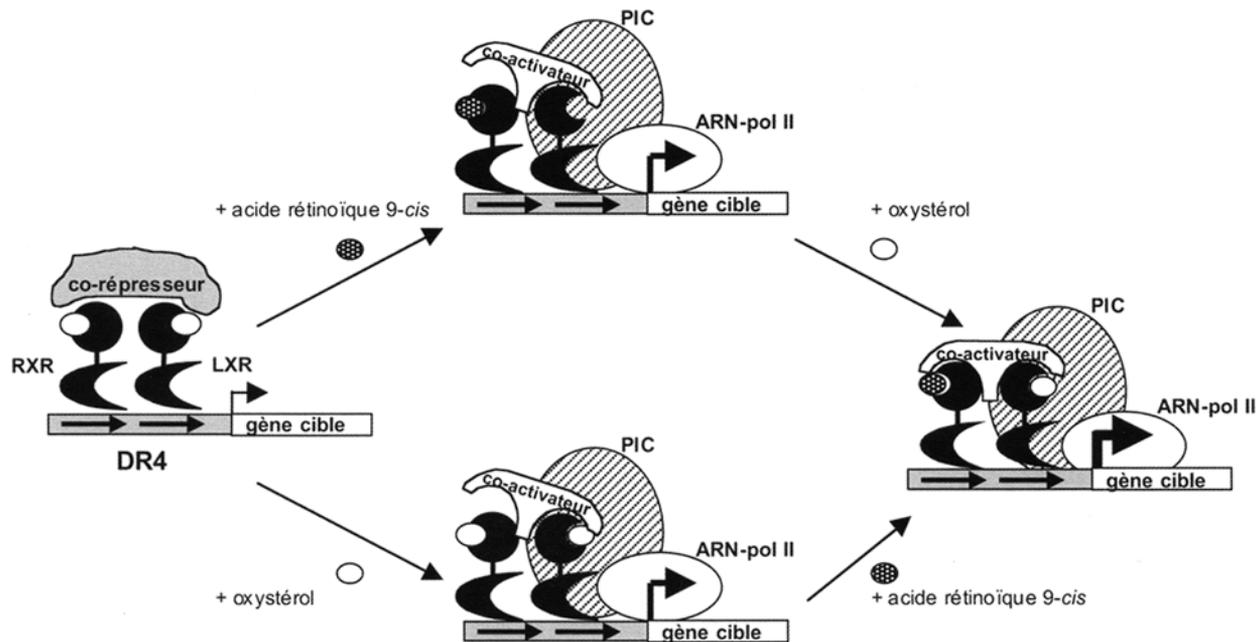
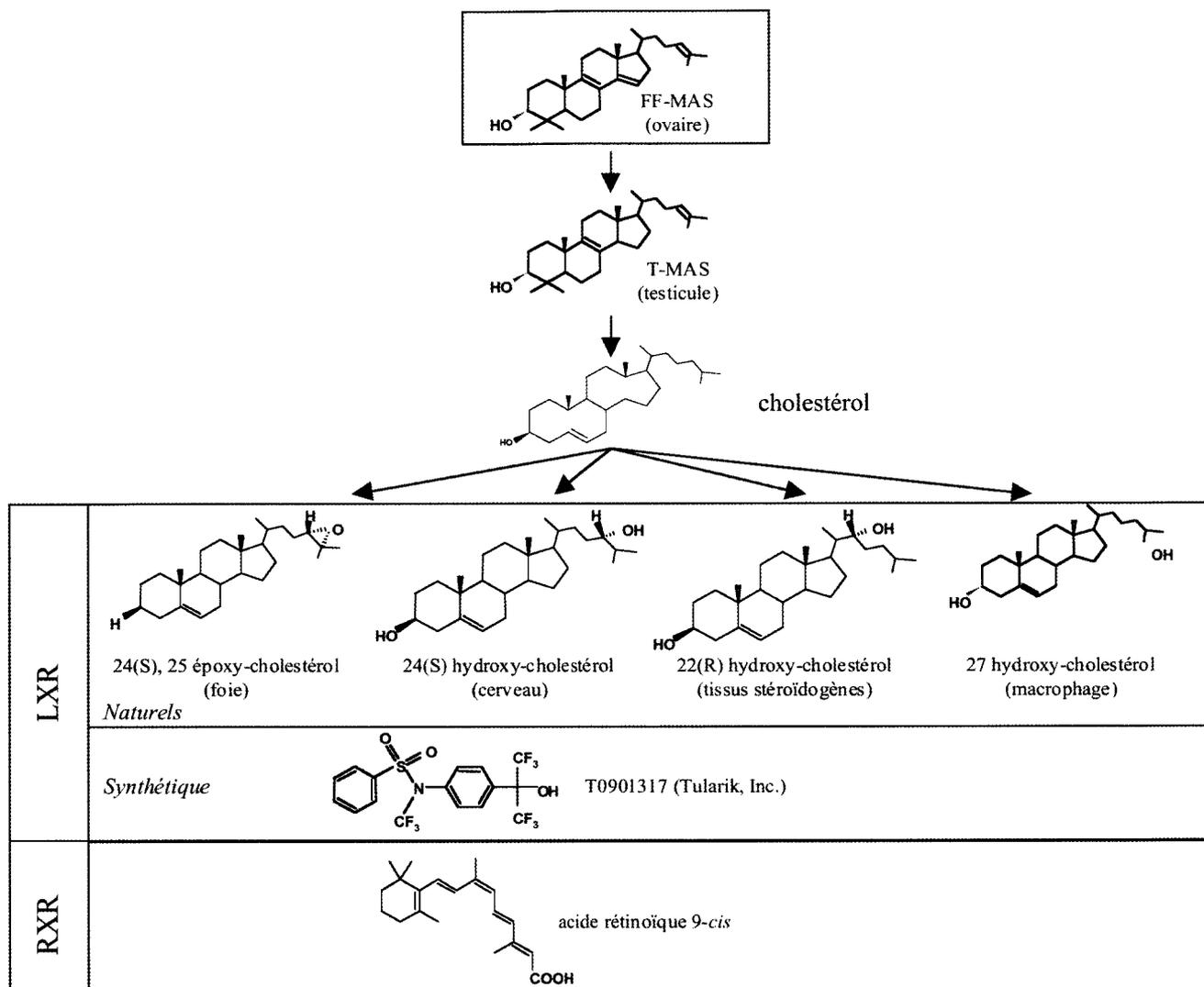


Figure 2. Mécanisme d'action de l'hétérodimère RXR/LXR sur la transcription d'un gène cible.

L'hétérodimère RXR/LXR peut être activé à la fois par l'acide rétinolique 9-cis et l'oxystérol. La double induction induit une activité additive voire synergique sans doute par un recrutement plus efficace des co-activateurs. DR4, élément de réponse/de fixation des récepteurs LXR/RXR ; ARN-pol II, ARN polymérase II ; PIC, complexe de pré-initiation de la transcription. D'après [22].



**Figure 3. Agonistes naturels et synthétiques des LXRs.**

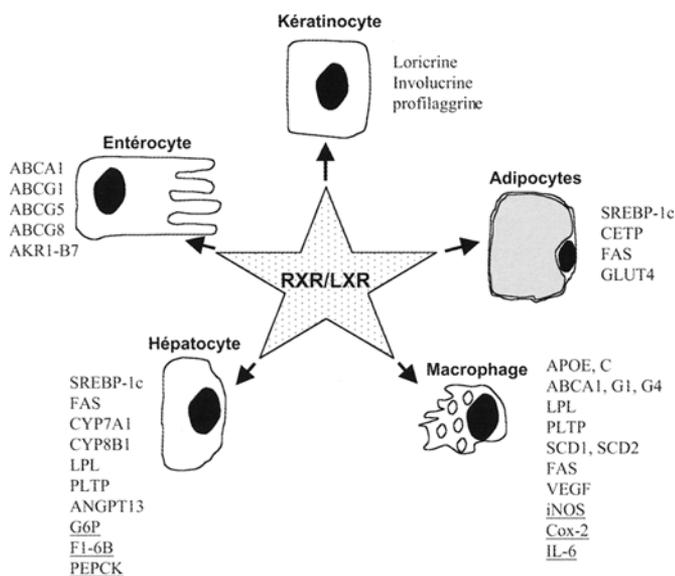
Les ligands, spécifiques de certains tissus, ont des affinités et des capacités d'activation différentes pour les LXRs. Les ligands synthétiques ont une affinité de l'ordre de  $10^{-7}M$  (vs  $10^{-5}M$  pour les ligands naturels). Le T0901317 utilisé dans nos travaux est indiqué. Les FF-MAS et T-MAS se trouvent en amont de la synthèse du cholestérol. Le cholestérol (non ligand) et l'acide rétinolique 9-*cis* (ligand naturel de RXR) sont indiqués. D'après [32].

(pour une revue lire, [32]). La transformation de macrophages en cellules spumeuses « surchargées » en cholestérol, est considérée comme une part essentielle de l'initiation du développement de la plaque d'athérome. Cette accumulation de cholestérol dans les macrophages associe une entrée accrue de cholestérol, une diminution de sa sortie et de son transport inverse hépatique, et une synthèse *de novo* augmentée. Le 7-céto-cholestérol ainsi que le 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -époxy-cholestérol, composants des LDLs oxydés, sont retrouvés à de fortes concentrations dans les lésions d'athérosclérose. Sous leur forme 3-sulfatée, ces oxystérols sont des inhibiteurs des LXRs [31]. Cet effet inhibiteur est dépendant de l'interaction avec le domaine de liaison du

ligand des LXRs, et se traduit par un non-recrutement des co-activateurs. Ainsi, une concentration élevée de ces molécules semble avoir un effet inhibiteur de la capacité hypocholestérolémiant des récepteurs LXRs en diminuant la sortie du cholestérol et favorisant ainsi la transformation des macrophages en cellules spumeuses (*cf.* paragraphe 4).

#### 4. Fonctions physiologiques régulées par les LXRs

L'étude phénotypique de souris, dont les gènes codant LXR $\alpha$  [22] et/ou LXR $\beta$  [34] ont été invalidés par recombinaison homologe (*lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>*) et l'analyse des protéines cibles identifiées (Figure 4) ont permis d'établir le rôle des



**Figure 4. Quelques protéines cibles directes des récepteurs RXR/LXR dans les différents types cellulaires.**

**ABCA1, ABCG1, ABCG4, ABCG5 et ABCG8, transporteurs membranaires de la famille des ATP-binding cassettes ; AKR1B7, aldo-céto réductase 1-B7 ; CYP7A1, CYP8B1, 7 $\alpha$  et 12 $\beta$ -hydroxylases ; LPL, lipoprotein lipase ; PLTP, protéine de transfert des phospholipides ; ANGPT13, angiopoietin-like protein 3 ; CETP, protéine de transfert des esters de cholestérol ; FAS, synthase des acides gras ; GLUT4, transporteur 4 du glucose ; SREBP-1c, protéine 1c de liaison des éléments de réponse aux stéroïls ; APOE et C, apolipoprotéines E et C ; SCD1 et 2, stearoyl co-A decarboxylase ; VEGF, vascular endothelial growth factor ; iNOS, NO synthase inducible ; IL-6, interleukine 6 ; COX-2, cyclo-oxygénase 2 ; G6P, glucose-6-phosphatase ; F1,6B, fructose-1,6-biphosphatase ; PEPCK, phospho-énol-pyruvate carboxy kinase. Les protéines dont l'accumulation est diminuée sont soulignées. Les noyaux sont indiqués en noirs, les lipides en gris. Adapté d'après [32].**

LXR $\alpha$  *in vivo* [27]. Schématiquement, ils contrôlent l'homéostasie de trois métabolismes cholestérol, acides gras et glycémie, et ils interviennent dans les processus inflammatoires.

Au niveau de l'homéostasie lipidique (cholestérol et acides gras), les LXRs sont considérés comme des facteurs **hypocholestérolémiant**s. Lorsque les souris *lxra*<sup>-/-</sup> sont nourries avec un régime riche en cholestérol, elles développent une hépatomégalie de type « foie gras », caractérisée par une accumulation d'esters de cholestérol dans les hépatocytes, non compensée par la présence de LXR $\beta$  [22]. Chez les souris sauvages, le même régime induit *CYP7A1* via LXR $\alpha$ . Cette enzyme catalyse l'étape initiale et limitante de la biosynthèse des acides biliaires à partir du cholestérol, et permet la transformation de l'excès de cholestérol en acides biliaires. La stéatose hépatique observée chez les sou-

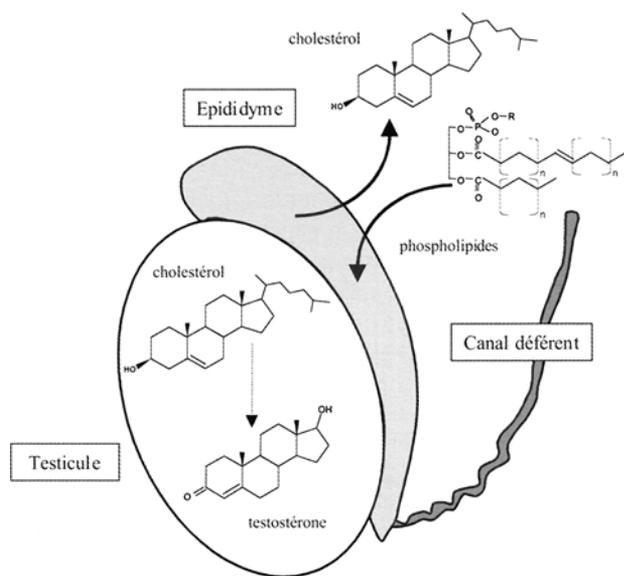
ris *lxra*<sup>-/-</sup> est due à l'absence de régulation de *CYP7A1*. De plus, les LXRs stimulent l'expression de certains transporteurs de la famille ABC (*ATP-Binding Cassette*) comme ABCA1 [5, 25], ABCG1/ABCG8 [34], ABCG5 et ABCG8 [26]. Ces transporteurs membranaires sont responsables de la sortie de cholestérol des macrophages et des entérocytes. Les LXRs stimulent également le retour hépatique des lipides *via* la régulation des apolipoprotéines *ApoE/CII/CIV* [17]. On comprend donc que le blocage des ABC puisse induire l'accumulation cellulaire d'esters de cholestérol. En parallèle, l'activation de *srebp-1c* (*sterol regulatory element binding protein 1c*) [23], de *fas* (*fatty acid synthase*) [13] et d'*acc* (*acetyl-CoA carboxylase*) [29] confère aux LXRs un effet **hypertriglycéridémiant**, rendant à ce jour difficile l'utilisation en thérapie humaine de molécules agonistes [14] pour traiter l'athérosclérose. Des nouveaux ligands non hypertriglycéridémiants sont actuellement développés (pour une revue lire [32]).

Les LXRs exercent un effet négatif sur l'expression des gènes codant la glucose-6-phosphatase, la fructose-1-6-biphosphatase et la phospho-énol-pyruvate carboxy-kinase (PEPCK) [4], inhibant ainsi la synthèse de glucose. A l'inverse, ils régulent positivement l'expression du gène codant le transporteur de glucose *glut4* [18], stimulant ainsi l'entrée de glucose dans l'adipocyte. Au total, les LXRs sont **hypoglycémiant**s.

Par ailleurs, les LXRs régulent négativement le **processus inflammatoire** en inhibant l'expression de médiateurs de l'inflammation dans le macrophage, comme *iNOS* (*inducible nitric oxide synthase*), *Cox-2* (*cyclooxygenase 2*) et *IL-6* (*interleukine-6*) [15]. De plus, LXR $\alpha$  permet la différenciation de l'épiderme chez la souris [16]. Cet effet impliquerait la synthèse de protéines de structure telles que la loricrine, l'involucrine et la profilaggrine. En outre, des travaux récents [35] ont identifié le gène *vegf* (*vascular endothelial growth factor*) comme cible des LXRs, suggérant leur rôle dans la régulation de l'**angiogenèse**.

## II. CONTRÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DU CHOLESTÉROL DANS LE TRACTUS GÉNITAL MÂLE

Le cholestérol est un acteur important dans la maturation des spermatozoïdes tant au niveau testiculaire que post-testiculaire. Au niveau gonadique, c'est le précurseur indispensable à la synthèse des androgènes, facteurs clés de la différenciation mâle et de la spermiogenèse. De même, au niveau de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme, les taux de cholestérol doivent être maintenus dans un intervalle étroit de concentration (Figure 5). En effet, il est clair maintenant que l'efflux de cholestérol entraînant des changements de fluidité membranaire constitue une partie du signal conduisant à la capacitation des spermatozoïdes (voir pour revue [1]). Une forte concentration en cholestérol membranaire peut inhiber indirectement la capacitation en rigidifiant la membrane, en diminuant les possibilités de liberté de conformation, et ainsi l'activité biologique des protéines qui se trouvent à la surface des sper-



**Figure 5. Représentation schématique du rôle des lipides dans l'appareil reproducteur masculin.**

**Le cholestérol est le précurseur de la voie de synthèse des androgènes. Au niveau épидидymaire, on note une modification du ratio cholestérol/phospholipides de la membrane des spermatozoïdes pendant leur trajet.**

matozoïdes. Un autre effet du cholestérol résulterait dans la modification de l'activité de transporteurs membranaires d'ions ou d'enzymes. Au niveau de la membrane enveloppant l'acrosome, il apparaît que le cholestérol membranaire n'est pas disposé au hasard mais organisé en « radeaux », c'est à dire, regroupé en sous-domaines [6]. Par analogie avec les cellules somatiques, il semble que cette organisation membranaire particulière soit impliquée dans la modulation des signaux de transduction membranaire ou le métabolisme cellulaire (pour une revue lire [33]).

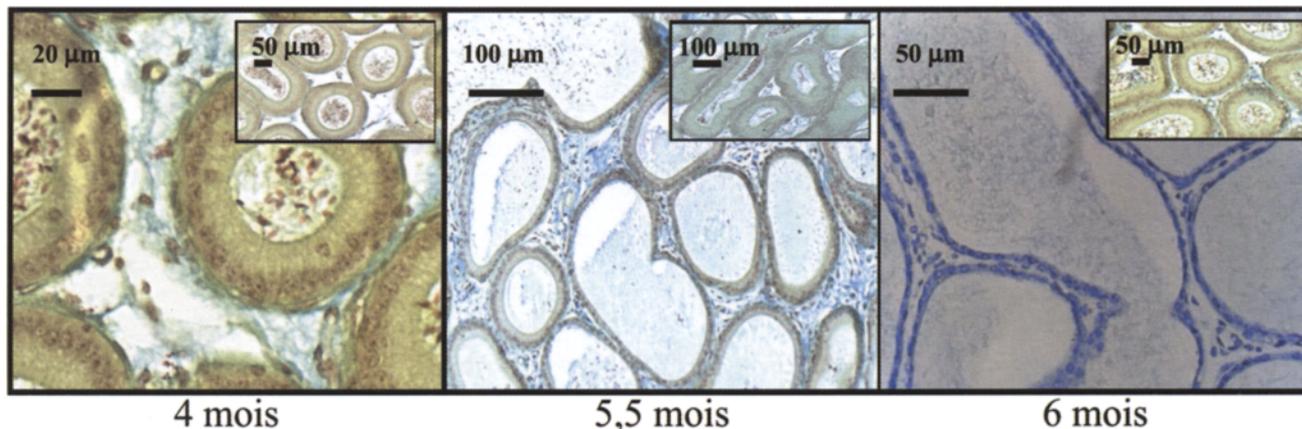
Chez les mammifères, tout au long du trajet dans l'épididyme, la membrane des spermatozoïdes subit une modification du ratio stérols/phospholipides. Il est très difficile de généraliser car selon les espèces les mouvements de stérols au cours de la maturation épидидymaire sont très variables. Plusieurs auteurs ont rapportés que la quantité de stérols dans la membrane des spermatozoïdes de mammifères a tendance à diminuer au cours de la maturation épидидymaire [1, 9, 20]. Pour d'autres espèces, on assiste à des remplacements du cholestérol par une forme dérivée du cholestérol (cholestérol sulfates ou esters de cholestérol) ou par un autre stérol (desmostérol) permettant de garder invariante la quantité de stérols au cours de la maturation épидидymaire [1]. De façon intéressante, les stérols sulfatés sont des inhibiteurs de l'acrosine, permettant ainsi de prévenir d'une libération prématurée des enzymes protéolytiques responsables de la réaction acrosomique. Cette inhibition est levée dans le tractus génital femelle sous l'action de sulfatases [2, 28]. Parallèlement, les cholestérols sulfa-

tes sont aussi des inhibiteurs des LXR [31]. Ces mouvements de stérols lors de la maturation épидидymaire impliquent qu'il doit exister dans le compartiment luminal et au niveau de l'épithélium épидидymaire des phénomènes de transports actifs des stérols. En effet, la simple diffusion du cholestérol est impossible dans le milieu aqueux environnant les spermatozoïdes, il n'est donc pas surprenant de trouver des accepteurs de cholestérol dans le fluide luminal. De même, des apolipoprotéines et des transporteurs membranaires de type ABC ont été trouvés exprimés dans l'épididyme [10]. Les récepteurs nucléaires LXRs participent probablement à cette homéostasie locale du cholestérol et de ses dérivés dans l'épididyme. Il n'est pas illusoire de supposer que les différents stérols perdus par les spermatozoïdes lors de leur maturation épидидymaire soient importés dans les cellules épithéliales dans lesquelles, en partie *via* les LXRs, ils coordonnent un ensemble de gènes du métabolisme lipidique.

### III. RÔLE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES LXRS DANS L'ÉPIDIDYME

L'importance du contrôle de l'homéostasie lipidique dans la maturation des spermatozoïdes nous a amené à analyser le rôle des LXRs dans l'épididyme. De plus, nous avons montré que les souris mâles dont les deux gènes  $LXR\alpha$  et  $LXR\beta$  avaient été invalidés par recombinaison homologue présentaient une stérilité secondaire à l'âge de 6-7 mois, alors qu'une souris sauvage mâle est fertile jusqu'à 24 mois (DH Volle, manuscrit soumis). Puisque la fertilité n'était pas altérée chez les souris transgéniques jeunes et ainsi leur spermatogenèse semblait suffisante à cet âge, nous avons recherché l'impact de l'absence des LXR au niveau de l'épididyme [7].

L'étude des transcrits de  $LXR\alpha$  et  $LXR\beta$  par RT-PCR (ou de la protéine dans le cas de  $LXR\alpha$ ) montre une expression de ces gènes dans la tête et la queue de l'épididyme, avec un niveau plus intense pour l'isoforme bêta que alpha, et un gradient tête-corps-queue pour  $LXR\alpha$ . L'analyse histologique des épидидymes fait apparaître une forte désorganisation de l'épithélium de la région proximale de la tête (segments 1 et 2) associant une disparition totale des microvillosités caractéristiques et un élargissement de la lumière, lié à la présence de matière amorphe non lipidique (Figure 6). L'apparition de ce phénotype commence vers 6 mois et la désorganisation est totale vers 10 mois. Il est intéressant de noter que l'absence d'une seule des deux isoformes (alpha ou bêta) n'est pas suffisante pour altérer la structure de l'épithélium au même âge. La présence de nombreuses vésicules réfringentes est également visible au niveau de l'épithélium des segments 1 et 2, ainsi que dans le tissu conjonctif environnant, et ce uniquement dans les coupes d'épididymes provenant de souris déficientes en LXRs. Le nombre et la taille de ces vacuoles augmentent avec l'âge des souris. La coloration à l'huile rouge de coupes d'épididyme a clairement montré une accumulation de lipides neutres. La composition exacte de ces lipides est en cours d'analyse. De façon intéressante, les souris transgéniques présentent une diminution des concentrations plasmatiques



**Figure 6.** Analyse histologique du segment 2 de la tête de l'épididyme de souris  $l\alpha;\beta^{-/-}$  ou sauvage (inserts).

On peut observer l'élargissement de la lumière au niveau du segment 2 de la tête de l'épididyme et l'amincissement de l'épithélium. Cette déstructuration localisée de l'épithélium épидидymaire apparaît dans une fourchette de temps étroite entre 5 mois et 6 mois d'âge.

et testiculaires en androgènes (DH Volle, manuscrit soumis) pouvant, *a priori*, expliquer le développement du phénotype épидидymaire au cours du temps. Le traitement pendant 15 jours de souris  $l\alpha;\beta^{-/-}$  de 7,5 à 10 mois par les androgènes n'a pas permis de restaurer une structure normale suggérant ainsi que la diminution des androgènes testiculaires ne peut à elle seule expliquer la survenue du phénotype épидидymaire.

Les LXR étant des facteurs de transcription, il était intéressant de tester la présence d'une dérégulation transcriptionnelle de gènes cibles potentiels chez les animaux transgéniques. Nous avons focalisé notre étude sur les gènes *gpx5* et *pea3*, spécifiques de la tête de l'épididyme, et *gpx3*, marqueur de la queue de l'organe. Les analyses par *northern blot* montrent une diminution significative de l'accumulation des transcrits *gpx5* et *pea3* au niveau de la tête. Ces gènes étant exprimés préférentiellement dans les cellules épithéliales, la diminution de leur expression semble *a priori* secondaire à la déstructuration du tissu.

L'accumulation des lipides neutres observée en histologie est à mettre en rapport avec l'absence d'expression du gène *abcg1/abc8*, codant un transporteur membranaire du cholestérol : les souris sauvages nourries avec l'agoniste synthétique T0901317 présentent une augmentation de l'accumulation du transcrit par rapport aux témoins. La régulation d'*abcg1/abc8* par les LXRs a également été observée dans les cellules TCC de la tête de l'épididyme, démontrant ainsi l'utilité de cette nouvelle lignée [3] pour le criblage de nouveaux gènes cibles des LXRs dans l'épididyme. Ce travail de recherche est en cours de réalisation.

Certains segments de l'épididyme étant fortement affectés par la perte des LXRs, nous avons analysé la morphologie des spermatozoïdes recueillis dans la queue de l'épididyme de souris sauvages et  $l\alpha;\beta^{-/-}$  de 12 mois. Les souris trans-

géniques présentaient une oligo-tératospermie, associant une fragilité de la structure puisque la tête était systématiquement séparée du corps et un flagelle anormal avec des degrés d'angularité variables pouvant aller jusqu'à une structure en épingle à cheveux, identique à celle observée chez la souris sur-exprimant *gpx5* [30]. Les causes de la fragilité et de l'anomalie structurale n'ont pas encore été identifiées.

#### IV. CONCLUSIONS

Les données présentées démontrent le rôle des récepteurs nucléaires des oxystéroïdes LXRs dans la physiologie de la reproduction chez le mâle, en particulier dans le maintien des structures cellulaires épидидymaires. L'efflux du cholestérol membranaire des spermatozoïdes contribue au contrôle de la capacitation ; les mécanismes moléculaires de cet effet ne sont qu'imparfaitement compris. La connaissance des processus permettant les échanges du cholestérol au niveau des spermatozoïdes contribuera sans doute à appréhender les signaux qui régulent leur maturation.

L'utilisation conjointe de souris dont les gènes codant les LXRs ont été invalidés et d'agonistes spécifiques des deux isoformes ouvrent de plus des perspectives de recherche pour la caractérisation de nouveaux gènes cibles des oxystéroïdes et de l'acide rétinoïque 9-*cis* au niveau des territoires sexuellement différenciés chez le mâle.

Ces résultats posent aussi la question d'une utilisation à long terme d'agonistes spécifiques utilisés en thérapeutique en vue de faire baisser le cholestérol sanguin et soulignent l'intérêt fondamental de connaître le rôle physiologique des LXRs dans ces organes.

## REFERENCES

1. AWANO M., KAWAGUCHI A., MOHRI H. : Lipid composition of Hamster epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 1993, 99: 375-383.
2. BOUTHILLIER M., BLEAU G., CHAPDELAINE A., ROBERTS K.D. : Distribution of steroid sulfotransferase in the male hamster reproductive tract. *Biol. Reprod.*, 1984, 31 : 936-941.
3. BRITAN A., LAREYRE J.J., LEFRANCOIS-MARTINEZ A.M. et al. : Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2004, 224 : 41-53.
4. CAO G., LIANG Y., BRODERICK C.L. et al. : Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278 : 1131-1136.
5. COSTET P., LUO Y., WANG N., TALL A.R. : Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 : 28240-28245.
6. CROSS N.L. : Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, 1998, 59 : 7-11.
7. FRENOUX J., VERNET P., VOLLE D.H. et al. : Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J. Mol. Endocrinol.*, 2004, 33 : 361-375.
8. GRONDAHL C., OTTESEN J.L., LESSL M. et al. : Meiosis-activating sterol promotes resumption of meiosis in mouse oocytes cultured in vitro in contrast to related oxysterols. *Biol. Reprod.*, 1998, 58 : 1297-1302.
9. HALL J.C., HADLEY J., DOMAN T. : Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *J. Androl.*, 1991, 12 : 76-87.
10. HSIA N., CORNWALL G.A. : DNA microarray analysis of region-specific gene expression in the mouse epididymis. *Biol. Reprod.*, 2004, 70 : 448-457.
11. JANOWSKI B.A., WILLY P.J., DEVI T.R., FALCK J.R., MANGELSDORF D.J. : An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, 1996, 383 : 728-731.
12. JANOWSKI B.A., GROGAN M.J., JONES S.A. et al. : Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRA and LXRbeta. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 1999, 96 : 266-271.
13. JOSEPH S.B., LAFFITTE B.A., PATEL P.H. et al. : Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277 : 11019-11025.
14. JOSEPH S.B., MCKILLIGIN E., PEI L. et al. : Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 2002, 99 : 7604-7609.
15. JOSEPH S.B., CASTRILLO A., LAFFITTE B.A., MANGELSDORF D.J., TONONZOZ P. : Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.*, 2003, 9 : 213-219.
16. KOMUVES L.G., SCHMUTH M., FOWLER A.J. et al. : Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 2002, 118 : 25-34.
17. LAFFITTE B.A., REPA J.J., JOSEPH S.B. et al. : LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 2001, 98 : 507-512.
18. LAFFITTE B.A., CHAO L.C., LI J. et al. : Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 2003, 100 : 5419-5424.
19. LOBACCARO J.M., REPA J.J., LU T.T. et al. : Régulation du métabolisme lipidique par les récepteurs nucléaires orphelins. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 2001, 62 : 239-347.
20. PARKS J.E., HAMMERSTEDT R.H. : Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol. Reprod.*, 1985, 32 : 653-668.
21. PEET D.J., JANOWSKI B.A., MANGELSDORF D.J. : The LXRs : a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1998, 8 : 571-575.
22. PEET D.J., TURLEY S.D., MA W. et al. : Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, 1998, 93 : 693-704.
23. REPA J.J., LIANG G., OU J. et al. : Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta. *Genes Dev.*, 2000, 14 : 2819-2830.
24. REPA J.J., MANGELSDORF D.J. : The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2000, 16 : 459-481.
25. REPA J.J., TURLEY S.D., LOBACCARO J.M.A. et al. : Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*, 2000, 289 : 1524-1529.
26. REPA J.J., BERGE K.E., POMAJZL C. et al. : Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277 : 18793-18800.
27. REPA J.J., MANGELSDORF D.J. : The liver X receptor gene team : potential new players in atherosclerosis. *Nat. Med.*, 2002, 8 : 1243-1248.
28. ROBERTS K.D. : Sterol sulfates in the epididymis : synthesis and possible function in the reproductive process. *J. Steroid Biochem.*, 1987, 27 : 337-341.
29. SCHULTZ J.R., TU H., LUK A. et al. : Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.*, 2000, 14 : 2831-2838.
30. SIPILA P., COOPER T.G., YEUNG C.H. et al. : Epididymal dysfunction initiated by the expression of simian virus 40 T-antigen leads to angulated sperm flagella and infertility in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.*, 2002, 16 : 2603-2617.
31. SONG C., HIIPAKKA R.A., LIAO S. : Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors : implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids*, 2001, 66 : 473-479.
32. SOUIDI M., DUBRAC S., PARQUET M. et al. : Oxystérols : métabolisme, rôle biologique et pathologies associées. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 2004, 28 : 279-293.
33. TRAVIS A.J., KOPF G.S. : The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J. Clin. Invest.*, 2002, 110 : 731-736.
34. VENKATESWARAN A., REPA J.J., LOBACCARO J.M. et al. : Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 : 14700-14707.
35. WALCZAK R., JOSEPH S.B., LAFFITTE B.A. et al. : Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279 : 9905-9911.
36. WILLY P.J., UMESONO K., ONG E.S. et al. : LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.*, 1995, 9 : 1033-1045.

\* Une partie du travail a bénéficié du soutien de l'Université Blaise Pascal, du CNRS, de la Fondation pour la Recherche Médicale (#INE2000-407031/1), de la Fondation BNP-Paribas.

<sup>a</sup> contribution équivalente.

## ABSTRACT

### Role of LXR nuclear oxysterol receptors in male reproduction

David H. VOLLE , Jean-Marie FRENOUX, Kevin MOUZAT, Patrick VERNET, Magali PROD'HOMME, Aurore BRITAN, Fabrice SAEZ, Joëlle HENRY-BERGER, Ayhan KOCER, Françoise CAIRA, Georges VEYSSIERE, Joël R. DREVET and Jean-Marc A. LOBACCARO

Nuclear oxysterol receptors, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ , are transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily. They bind and are activated by a specific class of oxysterols. Natural antagonists have also been described, such as polyunsaturated fatty acids or plasma sulfated oxysterols.

Phenotypic analysis of mice lacking LXR $\alpha$  and/or LXR $\beta$  demonstrated their roles in various physiologic processes and metabolisms (lipid or glucose homeostasis). LXR, as well as their heterodimeric partner RXR, the nuclear receptor for 9-*cis* retinoic acid, were shown to be expressed in male genital tracts and testes, and their respective ligands were found at physiologically active concentrations. In these organs, cholesterol homeostasis must be strictly regulated, as: 1) cholesterol is involved in androgen synthesis, and 2) during epididymal maturation of spermatozoa, the plasma membrane undergoes various modifications, mainly exchanges between cholesterol and phospholipids.

We recently described that knock-out mice for both LXR encoding genes presented structural abnormalities of the epithelium of the head of the epididymis. These mice also presented fragile spermatozoa. Integrative and molecular physiology studies demonstrate a new role of these nuclear receptors in male reproductive physiology.

**Key-words :** nuclear receptors, LXR, cholesterol homeostasis, male reproduction