

Les " Liver X receptors " (LXRs) et le métabolisme lipidique dans l'épididyme murin

Fabrice SAEZ¹, Aurélia OUVRIER¹, Brigitte LAILLET², Rémi CADET¹, Patrick VERNET¹,
Benoît SION³, Jean-Marc A. LOBACCARO^{2,4}, Joël R. DREVET¹

¹ Laboratoire Epididyme et Maturation des Gamètes, Université Blaise Pascal, CNRS UMR 6547 GEEM, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France.

² UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand France.

³ Laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction, EA 975, Faculté de Médecine, Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France.

⁴ Laboratoire de Physiologie Comparée et d'Endocrinologie Moléculaire, Université Blaise Pascal, CNRS UMR 6547, 63177 Aubière cedex, France.

RÉSUMÉ

Cette étude a pour objectif de rechercher les rôles des « Liver X Receptors » (LXRs) dans la régulation de la composition lipidique et de l'expression génique dans la tête de l'épididyme murin. Les LXRs sont des récepteurs nucléaires aux oxystérols, des dérivés métaboliques du cholestérol. Ils existent sous deux isoformes : LXR α est plus spécifiquement exprimée dans les tissus ayant un fort métabolisme lipidique tels que : le foie, le tissu adipeux ou les tissus stéroïdogènes, alors que LXR β est ubiquiste. Leur importance dans la physiologie de la reproduction est apparue suite à l'observation de troubles de la fertilité dès l'âge de 5 mois, menant à une stérilité complète à 9 mois chez des souris mâles invalidées pour les deux isoformes des LXRs. Ces troubles sont associés à une dégénérescence de l'épithélium de la tête épididymaire, plus précisément localisée dans les segments 1 et 2. Cela est associé à une fragilité de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes, indiquée par la présence de têtes et de flagelles isolés lorsque l'on prélève les gamètes dans la queue de l'épididyme.

De manière à continuer l'exploration phénotypique des souris invalidées pour les LXRs, nous avons déterminé la composition lipidique respective des têtes épididymaires des souris sauvages et invalidées pour une ou les deux isoformes (*lxr α /-*, *lxr β /-* et *lxr α ; β /-*) par une coloration à l'huile rouge, et des chromatographies haute performance sur couche mince ou en phase gazeuse. Les niveaux d'expression de gènes impliqués dans les métabolismes des acides gras et du cholestérol ont été vérifiés par PCR quantitative en temps réel. Nous

montrons ainsi une accumulation d'esters de cholestérol dans la tête de l'épididyme des souris *lxr β /-* et *lxr α ; β /-*. Cette accumulation n'est pas associée à des modifications de la composition en acides gras, qui est comparable dans les quatre génotypes. La dérégulation de l'expression de certains gènes est discutée dans ce contexte physiologique, mais il semble que les voies d'efflux du cholestérol cellulaire soient perturbées de façon dépendante de LXR β .

Ces résultats montrent que les LXRs sont des régulateurs importants de l'homéostasie lipidique au sein de l'épididyme, et pourraient ainsi jouer un rôle critique dans les processus de maturation ayant lieu au cours du transit épididymaire des gamètes mâles.

Mots clés : *épididyme, LXR, récepteurs nucléaires, lipides, cholestérol, expression génique*

Correspondance :

Dr Fabrice SAEZ - Université Blaise-Pascal – UMR CNRS 6547 - Equipe Epididyme et maturation des gamètes, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France - Tel +33 4 73 40 76 20 - Fax +33 4 73 40 70 42 - Email fabrice.saez@univ-bpclermont.fr

I. INTRODUCTION

Les *Liver X receptors* (LXRs) sont des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, et sont activés par une classe spécifique d'oxystérols dérivés du métabolisme endogène du cholestérol [7]. Ces récepteurs possèdent des propriétés de facteurs de transcription, avec comme hétérodimère obligatoire le récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis* (RXR) [20]. L'isoforme LXR α est principalement exprimée dans les tissus présentant un métabolisme lipidique actif, alors que l'isoforme LXR β est ubiquiste. Les fonctions physiologiques des LXRs ont été étudiées depuis une dizaine d'années grâce à la disponibilité de modèles murins invalidés pour l'une ou l'autre des isoformes, ou les deux. Ils sont principalement impliqués dans le métabolisme lipidique par le contrôle de l'homéostasie des acides gras et du cholestérol (pour une revue, lire [18]).

Parmi les diverses fonctions physiologiques identifiées jusqu'ici, les LXRs ont été montrés comme jouant un rôle important dans la fonction reproductrice à différents niveaux, puisque des souris invalidées pour les deux isoformes (*Lxr α ; β -/-*) ont des difficultés à procréer après l'âge de 7 mois. De manière intéressante, cela est spécifique de la double invalidation, en effet des souris KO pour une seule isoforme sont fertiles au moins jusqu'à 14 mois. Les souris *Lxr α -/-* présentent également un plus faible niveau de testostérone testiculaire corrélé avec un taux supérieur d'apoptose des cellules germinales. Les souris *Lxr β -/-* ont une accumulation lipidique accrue dans les cellules de Sertoli et un taux de prolifération cellulaire des cellules germinales diminué. Pour les souris *Lxr α ; β -/-*, le métabolisme des acides gras est affecté, ainsi que la voie de signalisation de l'acide rétinoïque. La combinaison de ces deux altérations pourrait expliquer le phénotype délétère de stérilité constaté uniquement chez les souris *Lxr α ; β -/-* [19].

En parallèle de ce phénotype testiculaire, nous avons précédemment mis en évidence une fragilité de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes issus de la queue de l'épididyme, conduisant à des cassures révélées à l'observation microscopique par de nombreux flagelles ou têtes isolées [4]. Le phénotype épидидymaire a été caractérisé par un épithélium altéré, localisé spécifiquement dans les segments 1 et 2 de la tête, dont les cellules ont une hauteur réduite (dédifférenciation épithéliale partielle). Ceci est associé à la présence d'une substance amorphe dans la lumière du tubule. Il est apparu que ce phénotype n'était pas consécutif à la baisse du niveau de testostérone intratesticulaire, puisqu'il n'était pas restauré par des injections quotidiennes de testostérone pendant 4 mois.

Les causes moléculaires de la déstructuration épидидymaire n'étant pas connues, nous avons recherché les conséquences de l'invalidation des LXRs sur la composition lipidique ainsi que sur l'expression de gènes reliés au métabolisme lipidique dans la tête de l'épididyme, de manière à déterminer quelle isoforme pouvait être responsable de la régulation de l'homéostasie lipidique dans cet organe. Pour cette étude nous avons utilisé des souris *Lxr α -/-*, *Lxr β -/-* et *Lxr α ; β -/-*.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Animaux

La production des souris déficientes en LXRs a été décrite auparavant [11-13]. Des souris mâles d'une souche hybride BL6x129 Svj ont été élevées dans une atmosphère contrôlée en température (22°C) avec des alternances lumière/obscurité de 12h. Les souris ont été manipulées selon un protocole approuvé par le Comité Régional d'Ethique en Expérimentation Animale (CREEA, autorisation CE2-04). Les tissus ont été disséqués comme décrit précédemment [4], congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Pour les cryocoupes, les tissus ont été inclus dans de l'OCT (Optimal Cutting Temperature, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) et congelés dans les vapeurs d'azote liquide.

2. Coloration à l'huile rouge (*Oil red O*)

La coloration des lipides neutres sur les épидидymes prélevés a été effectuée sur des cryocoupes de 8 μ m d'épaisseur avec un traitement au 1,2 propanediol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 1 min. puis une immersion dans l'huile rouge (Sigma-Aldrich) pendant 4 min comme décrit [4].

3. Chromatographie haute performance sur couche mince (*High Performance Thin Layer Chromatography - HPTLC*)

Les lipides épидидymaires ont été extraits par la méthode de Folch avec quelques modifications [3]. Trois échantillons (tête épидидymaire) provenant de trois animaux différents ont été analysés pour chaque génotype. Le cholestérol, les esters de cholestérol et les phospholipides ont été séparés par HPTLC (10X20 cm; Merck, Lyon, France). Les plaques ont été lavées avec un mélange méthanol, chloroforme (1:1, v/v) et activées à 125 °C pendant 5 minutes.

Elles ont été soumises à deux développements successifs : un premier sur la moitié de la plaque avec un mélange méthyle acétate, propan-2-ol, chloroforme, méthanol, KCl aqueux 0,25% (w/v) (25:25:25:10:9, v/v) et un second avec un solvant hexane, diéthyléther,

acide acétique (80:20:2, v/v). Une solution de CuSO_4 10% (M/v) dans du H_3PO_4 8% (v/v) a été pulvérisée sur les plaques et elles ont été chauffées à 180°C pendant 15 minutes. Les chromatogrammes obtenus ont été scannés et les intensités des différents spots quantifiées par densitométrie par rapport à des dilutions de standards de concentration connue (Sigma Scan Pro, Sigma-Aldrich). Les valeurs des standards ont donné des courbes avec des coefficients de régression linéaire (R^2) supérieurs ou égaux à 0,90.

4. Chromatographie en phase gazeuse

Les lipides totaux ont été extraits par une méthode classique au chloroforme/méthanol basée sur la méthode de Folch, et l'extrait lipidique final a été dilué dans 100 μl de chloroforme. Les lipides totaux ont alors été fractionnés en lipides non phosphorylés (lipides neutres ou LN) et en phospholipides (PL) par l'utilisation d'une colonne Sep-pak (Waters, Guyancourt, France).

Brièvement, après un lavage de la colonne par 4ml de chloroforme, les lipides totaux ont été adsorbés sur la colonne, les LN ont été élués par 4ml de chloroforme, et les PL par une étape d'éluion utilisant 8ml de méthanol. Les lipides ont été évaporés sous un flux d'azote et dilués dans 200 μl de toluène. Les lipides ont été méthylés pendant 20min à température ambiante, avec 100 μl de méthanolate de sodium 2 N (Sigma-Aldrich), suivi d'une méthylation acide de 20 min avec 500 μl de BF_3 /méthanol 14% (Sigma-Aldrich). La réaction est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogénéocarbonate de sodium (NaHCO_3) puis les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont extraits deux fois par 2ml d'hexane. Les phases organiques supérieures (hexane) sont récupérées et concentrées à sec sous un courant d'azote puis repris dans 200 μl d'hexane et stockés à -80°C dans des tubes appropriés jusqu'à leur utilisation.

Avant l'analyse, les échantillons ont été purifiés sur une colonne « florasil », élués avec un mélange hexane:éther éthylique (95:5, v:v), évaporés et dilués dans un volume connu d'hexane. L'analyse a été effectuée sur un chromatographe « GC trace » (Thermo Electron, Courtaboeuf, France) équipé d'une colonne capillaire DBWAX (30m ; 0,25mm ; 0,25 μm d'épaisseur, JW Scientific, Folsom, USA). L'injecteur était de type Split-Splitless (SSL) et le détecteur à ionisation de flamme (FID). Le profil en acides gras a été réalisé en utilisant des substances de références. Chaque pic de chromatogramme est identifié par comparaison des temps de rétention avec ceux obtenus avec des standards connus (esters méthyliques MIX37, Sigma-Aldrich).

5. RT-PCR quantitative

Les ARNs totaux ont été isolés par la méthode au Trizol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) selon les instructions du fournisseur. L'ADNc a été produit avec la reverse transcriptase Improm II (Promega, Charbonnières, France) et une amorce de type « *random hexamer primers* » (Promega). La PCR en temps réel a été effectuée sur un appareil iCycler (Biorad). Quatre μl d'ADNc dilué au 1/50ème ont été amplifiés en utilisant le kit d'amplification selon les recommandations du fournisseur (Biorad), avec le « SYBR Green » pour mesurer la formation d'ADN double-brin. Les séquences des amorces utilisées dans cette étude sont présentées dans le **Tableau 1**.

6. Analyse statistique

Un test de Student a été effectué pour déterminer les différences significatives entre les groupes. Une valeur de *P* inférieure ou égale à 0,05 a été considérée comme significativement différente.

III. RÉSULTATS

1. La perte de LXR β provoque des perturbations du contenu lipidique de la tête de l'épididyme

L'analyse histologique après coloration à l'huile rouge effectuée sur des cryosections a montré une accumulation anormale de lipides neutres dans des vacuoles localisées dans l'épithélium et les tissus péri tubulaires des souris *Lxr β /-* et *Lxr α ; β /-* (**Figure 1C et 1D**) alors qu'une faible accumulation a été observée chez les souris sauvages et *Lxr α /-* (**Figure 1A et 1B**, respectivement).

Puisqu'une accumulation d'esters de cholestérol dans les cellules musculaires lisses a déjà été décrite chez les souris *Lxr β /-* [10], nous avons formulé l'hypothèse que la coloration péri tubulaire était spécifique des muscles lisses. Chez les souris sauvages et *Lxr α /-*, nous avons observé une très faible accumulation de lipides neutres spécifiquement localisée dans l'épithélium, avec l'apparence de cellules infiltrées qui pourraient être des macrophages (Figure 1A et 1B, fort grossissement, flèches), une hypothèse actuellement en cours de validation.

De manière à déterminer la nature des lipides accumulés dans les épididymes, des chromatographies haute performance en couche mince (HPTLC) ont été effectuées sur des extraits lipidiques totaux de têtes épididymaires des quatre génotypes. Bien qu'une accumulation de triacylglycérol dépendante des LXRs ait été décrite dans les cellules musculaires lisses vasculaires [2], les résultats de l'HPTLC ont révélé que seule la fraction contenant les esters de cholestérol était augmentée (**Figure 2A**).

Tableau 1: Séquences des amorces utilisées dans cette étude.

Gène (n° accession)		séquences 5'→3'	Taille de l'amplicon (pb)
srebp1c (NM_011480)	s as	GGA GCC ATG GAT TGC ACT TT GCT TCC AGA GAG GAG GCC AG	189
srebp2 (NM_033218)	s as	GTT GAC GCA GAC AGC CAA TG CCC TTA CTG GCA CTT GAA GG	241
scd1 (NM_009127.2)	s as	CCG GAG ACC CCT TAG ATC GA TAG CCT GTA AAA GAT TTC TGC AAA CC	89
scd2 (NM_009128.1)	s as	CAC CTA TCA GGA TGA TGA GG TGC CTT GTA TGT TCT GTG G	219
abca1 (NM_013454)	s as	CGT AGC TAC CCA CCC TAC G GTC GGG AGA TGA GAT GTG G	622
HMG-CoA Réductase (NM_008255)	s as	CTT GTG GAA TGC CTT GTG ATT AGC CGA AGC AGC ACA TGA T	75
Gapdh (BC 023632)	s as	GAA GAC TGT GGA TGG CCC CTC GTT GAG GGC AAT GCC AGC CCC	358

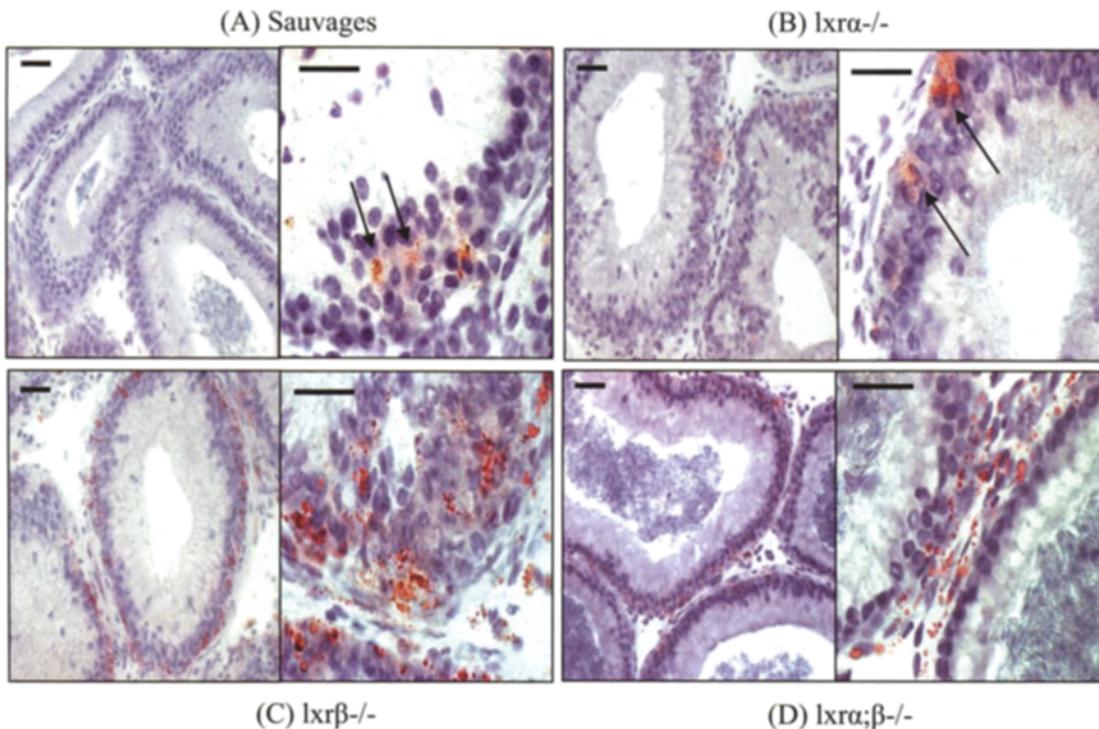


Figure 1 : Les souris déficientes pour LXRβ ont une accumulation anormale de lipides neutres dans la tête de l'épididyme. Coloration à l'huile rouge de cryosections de têtes épидидymaires de souris (A) sauvages, (B) *lxrα*^{-/-}, (C) *lxrβ*^{-/-} et (D) *lxrα;β*^{-/-}. Ces cryosections ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline, colorant les noyaux en bleu. Les lipides sont accumulés significativement dans l'épithélium et les tissus pérítubulaires, plus particulièrement chez les souris *lxrβ*^{-/-} et *lxrα;β*^{-/-}. Les barres représentent 20μm dans les deux grossissements présentés. Les résultats sont représentatifs de trois analyses indépendantes pour chaque génotype.

La bande révélée entre le cholestérol et les esters est de nature indéterminée et ne correspond à aucun des standards déposés. L'analyse densitométrique des chromatogrammes a confirmé cette observation : les contenus moyens en esters de cholestérol étaient significativement augmentés de 12 fois et de 25 fois chez les souris *lxrβ*^{-/-} et *lxrα;β*^{-/-}, respectivement (**Figure 2B**, $p < 0,05$ comparé aux sauvages), alors que chez les souris *lxrα*^{-/-}, le niveau d'esters de cholestérol était similaire à celui des souris sauvages. De manière surprenante, il semble que l'invalidation des deux isoformes des LXRs induise une plus forte accumulation d'esters de cholestérol, mais la différence observée n'est pas significative ($P < 0,2$).

Ces résultats nous ont amené à conclure que le phénotype observé était dû à l'absence de LXR β . D'autre part, LXR α ne semble pas avoir de fonction redondante dans cette région de l'épididyme, malgré la confirmation de son expression (résultats non montrés).

2. La perte des LXRs ne modifie pas les contenus en acides gras de la tête de l'épididyme

Puisque les LXRs sont connus pour réguler l'expression de *srebp1c* et de *fas*, codant respectivement pour la « *sterol response element binding protein* » et la « *fatty acid synthase* », deux éléments clés de la production des acides gras, les profils des acides gras entrant dans la composition des phospholipides d'une part, et dans celle des lipides neutres d'autre part, ont été établis après extraction des lipides totaux et séparation des deux classes concernées, dans les têtes épидидymaires des souris des quatre génotypes.

Les échantillons ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse et les pics obtenus comparés et intégrés par rapport à des mélanges d'acides gras connus de référence. Les résultats ne montrent aucune variation significative de la composition en acides gras entre les quatre génotypes, dans tous les échantillons étudiés (**Tableau 2**).

3. La perte de LXR β dans la tête de l'épididyme modifie les niveaux de base de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique

Les résultats de l'analyse des profils en acides gras soulèvent la question de l'influence réelle de l'invalidation des *lxr* sur le métabolisme du cholestérol et des acides gras dans la tête épидидymaire. Les LXRs exercent principalement leurs effets sur ces deux métabolismes suite à l'activation de deux gènes cibles, *srebp-1c* et *srebp-2*, codant chacun pour un facteur de transcription régulateur de l'expression de gènes respectivement impliqués dans le métabolisme des acides gras et du cholestérol.

Les LXRs régulent également l'expression des « *ATP-binding Cassette* » (ABC) qui codent pour des protéines membranaires impliquées dans le retour hépatique du cholestérol. Les stéaroyl Co-A désaturases 1 et 2 (*scd1* et *scd2*) sont des cibles indirectes des LXRs dans d'autres tissus, *via* l'activation de SREBP-1c [16-12]. Elles sont aussi connues comme étant exprimées à des niveaux élevés dans la tête de l'épididyme murin et de rat [14].

Ces gènes codent pour des enzymes responsables de la désaturation d'acides gras, principalement l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0), pour produire de l'acide palmitoléique (C16:1 n-7) et de l'acide oléique (C18:1 n-9), impliqués dans la production des triglycérides et des esters du cholestérol. Cet aspect semblait intéressant puisque nous avons précédemment démontré une augmentation du contenu en esters du cholestérol chez les souris *lxrβ*^{-/-} et *lxrα;β*^{-/-}. ABCA1 est, quant à lui, un transporteur membranaire du cholestérol, de la famille des « ATP binding cassette » et régulant les efflux de cholestérol vers des accepteurs extracellulaires tels que les apolipoprotéines-A1. Enfin, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) est une enzyme clé de la synthèse endogène du cholestérol, sous la régulation de SREBP-2.

La **Figure 3** montre clairement que les niveaux d'expression de *srebp1c* et *scd1* sont significativement diminués chez les souris *lxrβ*^{-/-} et *lxrα;β*^{-/-} par rapport aux souris sauvages ($P < 0,05$). De plus les niveaux des transcrits des gènes *srebp-2*, *scd2* et *abca1* sont significativement inférieurs chez les souris *lxrα;β*^{-/-} par rapport aux souris sauvages ($P < 0,05$). Ces résultats sont en accord avec le fait que ces quatre gènes sont régulés par les LXRs, mais la régulation négative de *scd1* et *scd2* ne corrèle pas avec une augmentation des niveaux des esters de cholestérol observés dans les mêmes génotypes.

De plus, la diminution du niveau d'*abca1* suggère un déséquilibre des flux de cholestérol, favorisant un stockage intracellulaire, ce qui conforte les résultats de dosages des esters de cholestérol. Le fait que les niveaux d'expression de l'*HMG-CoA réductase* ne soient pas perturbés dans les quatre génotypes conforte également cette dernière hypothèse, et corrèle avec les résultats de chromatographie sur couche mince.

Il apparaît donc que LXR β est la forme prédominante impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique dans la tête de l'épididyme murin. Par ailleurs, les observations concernant les niveaux des esters de cholestérol montrent que la présence de LXR α ne compense pas la perte de LXR β .

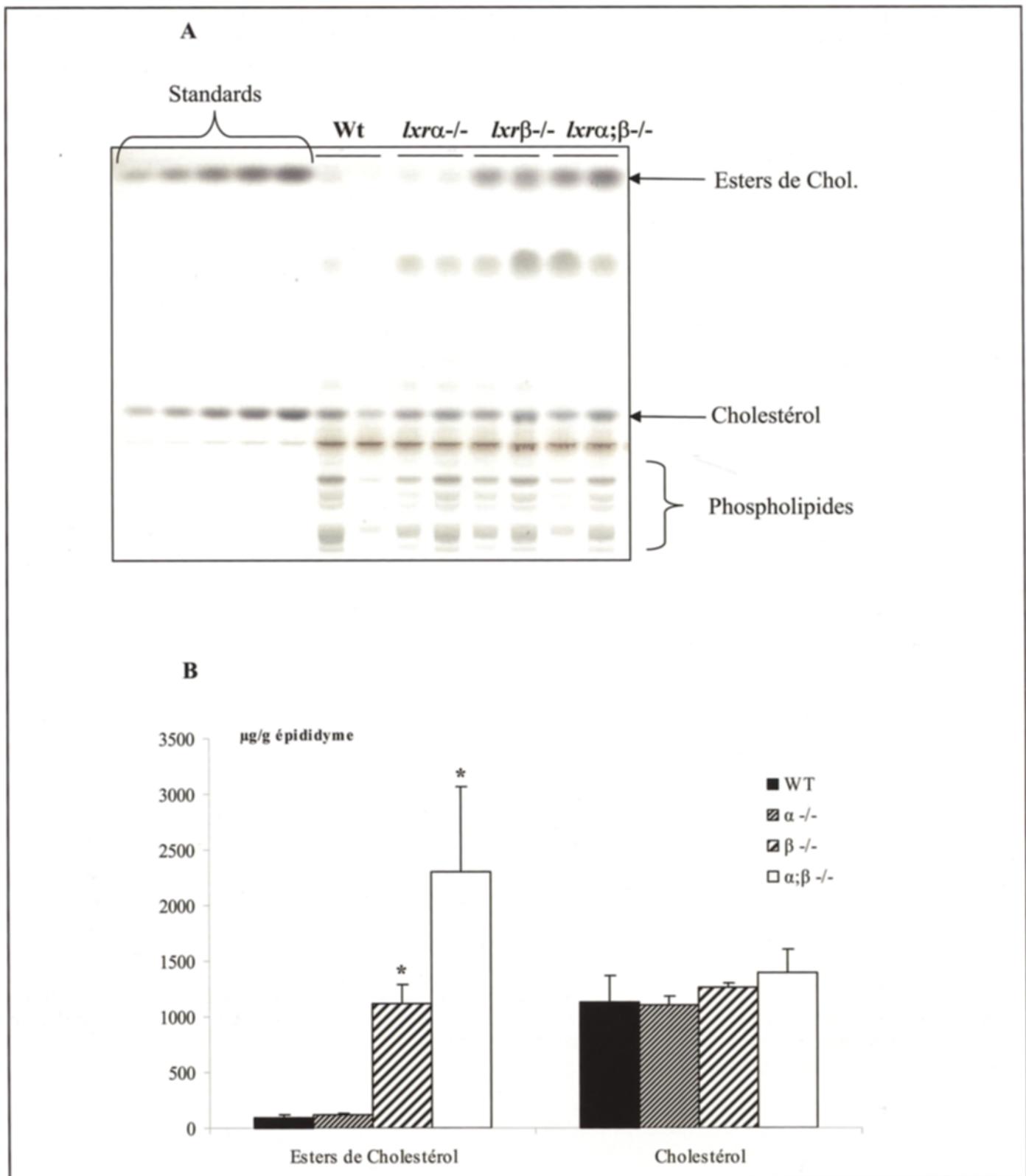


Figure 2 : Les souris déficientes pour LXR β ont des niveaux élevés d'esters de cholestérol. **A)** Chromatogramme d'une analyse en chromatographie haute performance sur couche mince (HPTLC) des lipides extraits des têtes épидидymaires des souris des quatre génotypes (WT = souris sauvages). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes faites en triplicata pour chaque génotype. **B)** Analyse densitométrique des chromatogrammes obtenus en HPTLC. Les chromatogrammes ont été scannés, et les spots quantifiés comme décrit dans la section " Matériels et Méthodes ". Le dosage des valeurs standards a donné des courbes dont les coefficients de régression linéaires (R²) sont de 0,90 ou plus. *, P < 0,05 comparé aux souris sauvages.

Tableau 2 : Détermination par chromatographie en phase gazeuse des profils d'acides gras constitutifs des phospholipides et des lipides neutres extraits des têtes épидидymaires des souris des quatre génotypes.

	Phospholipides				Lipides neutres			
	WT	l α r α -/-	l α r β -/-	l α r α ; β -/-	WT	l α r α -/-	l α r β -/-	l α r α ; β -/-
C14:0	1,060	1,063	1,293	1,390	0,320	0,505	0,395	1,648
C14:1	0,700	0,660	0,773	0,880	ND	ND	0,085	0,407
C15:0	0,100	0,100	0,060	0,160	ND	0,225	0,200	0,225
C15:1	0,110	0,160	0,080	0,100	ND	ND	0,130	0,230
inconnu 1	0,595	0,543	1,077	0,490	ND	0,410	0,020	0,110
inconnu 2	3,647	3,963	3,923	2,190	0,440	3,840	0,070	1,428
C16:0	7,300	5,647	6,650	10,750	13,700	11,255	6,538	9,807
C16:1 n-7	0,530	0,897	0,797	0,815	2,593	5,650	6,948	5,633
C16:1 n-9	0,610	0,660	0,675	0,505	1,010	1,670	0,670	0,963
C18:0	31,233	30,953	32,977	29,705	3,297	9,193	3,513	3,587
C18:1 n-9	10,733	12,267	12,893	10,090	39,533	24,700	40,523	32,648
C18:1 n-7	1,420	1,523	1,583	1,345	2,917	3,910	4,458	3,603
C18:2 n-6	4,023	4,310	4,700	3,285	34,737	18,320	29,103	28,750
C18:3 n-6	0,150	0,140	0,220	ND	ND	ND	0,090	ND
C18:3 n-3	0,030	ND	ND	ND	1,125	0,370	0,540	0,720
C20:0	0,207	0,143	0,115	0,290	0,525	1,610	0,290	0,310
C20:1 n-9	0,193	0,137	0,160	0,200	0,523	1,700	0,770	1,345
C20:2	0,120	0,110	0,045	0,185	0,205	0,185	0,165	0,313
C20:3 n-6	0,833	0,703	0,513	0,470	0,815	0,740	0,220	0,267
C20:4 n-6	28,927	26,843	23,720	26,505	0,687	6,430	0,750	2,520
C20:5 n-3	0,733	0,357	0,290	0,265	ND	2,760	0,130	0,430
C22:0	ND	0,320	0,030	ND	ND	ND	0,113	0,100
C22:2	ND	ND	ND	0,750	ND	0,700	0,170	ND
C22:1 n-9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,087	0,110
C22:4 n-6	0,670	0,490	0,435	0,900	ND	1,835	0,667	1,033
C22:5 n-6	1,763	1,243	1,133	3,245	1,140	2,330	0,297	0,443
C22:5 n-3	0,165	0,190	0,140	0,145	ND	ND	0,160	0,095
C22:6 n-3	8,790	7,650	4,440	9,010	0,360	8,057	0,990	1,250
C24:1	ND	ND	5,330	ND	0,577	9,995	0,403	0,810

Le tableau présente la quantité relative de chaque acide gras en pourcentage des acides gras totaux (moyenne de trois dosages effectués à partir de trois épидидymes d'individus distincts). Aucune différence significative n'est apparue en comparant pour chaque acide gras les souris mutées aux souris sauvages.

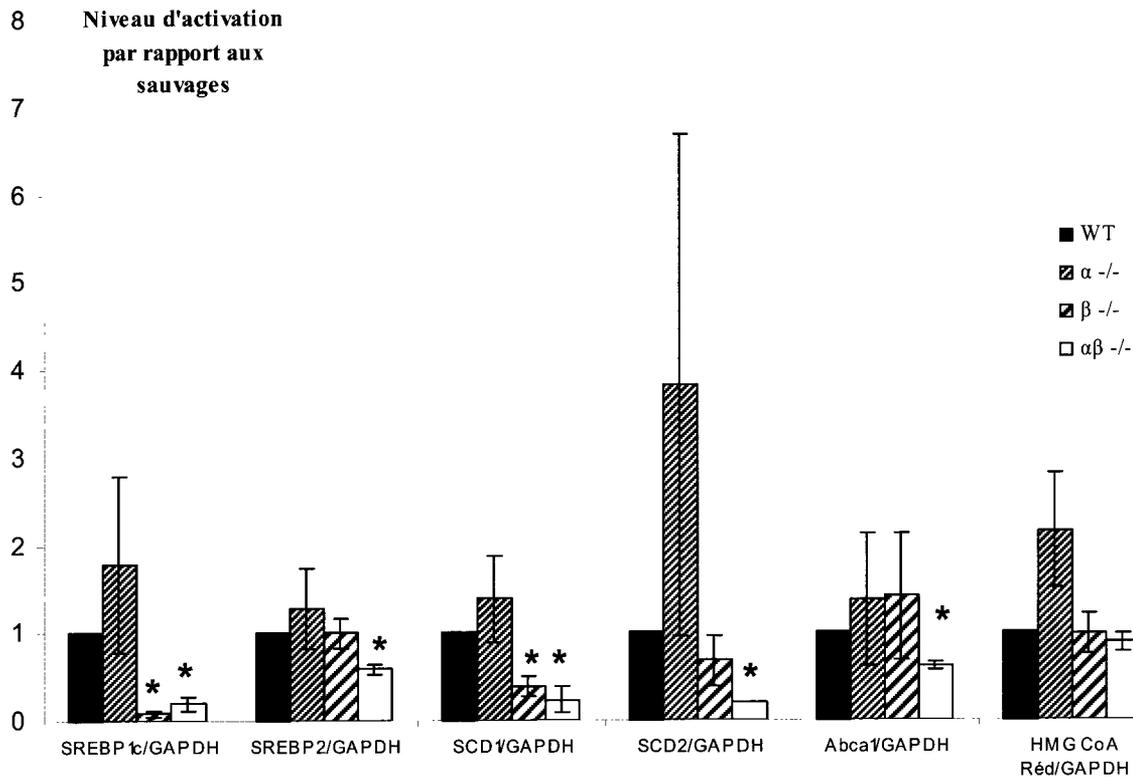


Figure 3 : Les gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras ont un niveau d'expression basale plus faible chez les souris déficientes pour LXR β .

Les histogrammes représentent les résultats des PCR quantitatives effectuées sur les échantillons obtenus des têtes épидидymaires des souris des quatre génotypes (WT = souris sauvages). Les résultats sont présentés en tant que niveaux d'activation (du taux du transcrit par rapport à celui de la GAPDH) comparé aux souris sauvages, pour chaque gène étudié, et sont exprimés sous la forme de la moyenne \pm SEM de triplicata de trois individus différents pour chaque génotype. *, $P < 0,05$.

IV. DISCUSSION

L'homéostasie lipidique dans l'épididyme est un processus biologique important puisque les modifications ayant lieu au cours du transit des spermatozoïdes dans cet organe sont fondamentales pour l'acquisition du pouvoir fécondant des gamètes mâles. Cette maturation lipidique est accompagnée d'autres événements de maturation protéiques et biochimiques. Cependant les mécanismes moléculaires régulant la maturation lipidique épидидymaire sont peu connus.

Les souris mâles invalidées pour les deux isoformes des LXRs présentent un phénotype épидидymaire et deviennent progressivement infertiles entre 5 et 9 mois. Ce phénotype n'est pas observé chez les animaux invalidés pour une seule des isoformes de ces récepteurs nucléaires. Comme les LXRs sont, de par leur gènes cibles, des régulateurs connus du métabolisme du cholestérol et des acides gras, le but de ce travail est d'étudier la composition en cholestérol

et en acides gras des têtes épидидymaires de souris sauvages, $l\alpha^{-/-}$, $l\beta^{-/-}$ et $l\alpha;\beta^{-/-}$, ainsi que les niveaux d'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras et du cholestérol tels que *srebp-1c*, *srebp-2*, *scd1*, *scd2*, *abca1* et HMG-CoA réductase.

L'invalidation de LXR β provoque une accumulation anormale des esters de cholestérol dans l'épithélium et le tissu péri tubulaire épидидymaire. La coloration péri tubulaire pourrait être liée à une accumulation lipidique dans les cellules musculaires lisses entourant le tubule épидидymaire. Il a été récemment démontré que le muscle lisse utérin présentait de même de telles accumulations chez les souris femelles des génotypes $l\beta^{-/-}$ et $l\alpha;\beta^{-/-}$.

Cette accumulation était associée à une altération significative des fonctions des cellules musculaires lisses, mise en évidence par une réduction de l'activité contractile de l'utérus chez ces femelles qui apparaissent

moins sensibles à de fortes concentrations d'ocytocine ou d'un analogue de la $PGF2\alpha$, deux stimulateurs efficaces des contractions utérines [10]. Il semble donc que le surplus en cholestérol des cellules musculaires lisses provoque une diminution de l'activité contractile de ces cellules. Dans la tête de l'épididyme, il a été montré que d'un point de vue histologique, certaines sections du tubule ne présentaient aucun contenu intraluminal, alors que d'autres étaient remplis d'une substance amorphe, avec très peu de spermatozoïdes visibles chez les souris $Lxr\alpha;\beta^{-/-}$ [4].

Ceci se rapproche de la formation d'un granulome qui peut avoir lieu soit à la suite d'une vasectomie, soit dans certaines conditions pathologiques telles que le granulome de cholestérol chez l'homme, soit enfin après la pose d'implants délivrant de fortes doses de testostérone chez la souris [15-6]. L'accumulation de lipides dans les cellules musculaires lisses péritubulaires pourrait donc altérer la fonction contractile de ces cellules, favorisant ainsi la stagnation du liquide intraluminal et conduisant de ce fait à la formation de la substance amorphe révélée par l'examen histologique.

De plus, les lipides accumulés ont été caractérisés comme étant des esters de cholestérol, dont la quantité est significativement supérieure dans les têtes épидидymaires des souris $Lxr\beta^{-/-}$ et $Lxr\alpha;\beta^{-/-}$. Là encore, la situation est comparable à celle observée dans l'utérus : chez des souris de 3 mois et 12 mois dans les génotypes $Lxr\beta^{-/-}$ et $Lxr\alpha;\beta^{-/-}$, comparés aux souris sauvages, après une normalisation selon le poids des organes, seule la fraction contenant les esters de cholestérol est augmentée. Il est donc intéressant de noter que dans la tête de l'épididyme comme dans l'utérus, l'augmentation de coloration à l'huile rouge provient d'une accumulation d'esters de cholestérol. Ce résultat renforce le fait que la régulation du métabolisme lipidique dépendant des LXR est un processus biologique important dans les tractus génitaux mâle et femelle.

Au cours du transit épидидymaire, la composition en phospholipides et en acides gras de la membrane plasmique des spermatozoïdes est modifiée. Ces changements incluent une perte de 25 à 48% des phospholipides totaux, avec des modifications variables selon les acides gras considérés. Une hausse du pourcentage relatif des acides gras polyinsaturés a lieu : par exemple, l'acide palmitique (C16:0) est l'acide gras majoritaire entrant dans la composition des phospholipides des spermatozoïdes immatures, alors que c'est l'acide docosahexaénoïque (C22:6) qui prédomine pour les gamètes matures [8].

Cela indique un métabolisme actif des acides gras dans

l'épididyme, et si l'on considère l'influence des LXR sur ce métabolisme et la modification de la composition lipidique observée chez les souris invalidées, il semblait intéressant d'analyser la composition en acides gras des têtes épидидymaires des souris des quatre génotypes. De manière surprenante, aucune différence significative n'a été mise en évidence dans la composition en acides gras des phospholipides extraits de tissus épидидymaires totaux. Nous n'avons pas non plus noté de différence en ce qui concerne les acides gras entrant dans la composition des lipides neutres, alors que nous avons vu que les esters de cholestérol sont plus élevés chez les souris $Lxr\beta^{-/-}$ et $Lxr\alpha;\beta^{-/-}$.

Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour expliquer ce résultat. D'une part, les lipides ont été extraits de tissus épидидymaires totaux, ce qui signifie que des modifications ayant lieu au niveau de la composition des spermatozoïdes suite à des dysfonctionnements épithéliaux pouvaient ne pas être détectées dans cet extrait total. Il sera donc fondamental de répéter ces analyses sur les lipides isolés des spermatozoïdes purifiés pour les quatre génotypes. L'obstacle majeur chez la souris, comparé à l'homme par exemple chez lequel on peut travailler sur des spermatozoïdes éjaculés, est d'avoir assez de matériel biologique pour effectuer ce dosage, puisque nous devons prélever les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme. Il sera donc nécessaire d'améliorer la technique de purification des spermatozoïdes de manière à pouvoir travailler sur suffisamment de cellules à partir d'un nombre limité d'animaux.

D'autre part, nous pouvions nous attendre à des modifications de la composition en acides gras des lipides neutres, puisque la hausse des esters de cholestérol devrait être associée avec une augmentation des acides gras estérifiant les molécules de cholestérol, à savoir principalement l'acide palmitoléique (C16:1n-7) et l'acide oléique (C18:1n-9) [12]. Comme indiqué dans le **Tableau 2**, ces acides gras ne sont pas significativement modifiés chez les souris invalidées par rapport aux souris sauvages. Cela pourrait provenir des faibles quantités de lipides neutres analysés dans chaque expérience, puisque les lipides ont été extraits à chaque fois à partir d'une tête épидидymaire unique. Il sera donc nécessaire de répéter ces analyses sur des pools de tissus de souris des quatre génotypes.

Le métabolisme des acides gras étant un processus biologique régulé par les LXR [17], une analyse du niveau d'expression de certains gènes a donc été entreprise par PCR quantitative sur des gènes cibles connus des LXR : *srebp-1c*, *srebp-2*, *scd1*, *scd2*, *abca1* et *HMG-CoA réductase*. Les SREBPs sont une

REFERENCES

famille de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et la biosynthèse des acides gras. SREBP-1c contrôle plus particulièrement la transcription de gènes de la biosynthèse des acides gras (lire [5] pour une revue). *Scd1* est un gène cible de SREBP-1c dans différents tissus [16-21] et les souris invalidées pour *scd1* ont une capacité réduite à estérifier le cholestérol pour le stockage hépatique [9]. Dans l'épididyme de rat, *scd1* et *scd2* sont exprimés à des niveaux élevés, supérieurs à ceux trouvés dans le foie [14]. Etant donné l'accumulation des esters de cholestérol dans la tête de l'épididyme des souris *lxrβ*^{-/-} et *lxrα*;*β*^{-/-}, nous pouvons nous attendre à une modification des niveaux d'expression de ces gènes.

De manière surprenante, l'expression de ces trois gènes a été trouvée diminuée dans les têtes épидидymaires des souris *lxrβ*^{-/-} et *lxrα*;*β*^{-/-} (*scd2* étant seulement diminué pour le génotype *lxrα*;*β*^{-/-}). Ces données indiquent que l'accumulation d'esters de cholestérol observée ne peut être corrélée à une plus forte synthèse d'acides gras estérifiant, ce qui est en accord avec nos résultats d'analyse des acides gras. Ces résultats sont en accord avec la régulation par les LXR de *srebp-1c* et de ses propres gènes cibles, et confortent l'hypothèse que l'isoforme LXRβ est fonctionnellement prédominante dans la tête de l'épididyme murin. L'accumulation des esters de cholestérol chez les souris *lxrβ*^{-/-} et *lxrα*;*β*^{-/-} pourrait donc provenir de perturbations de l'homéostasie lipidique dans cet organe. Un élément important de l'efflux cellulaire du cholestérol, pour son transport réverse vers le foie, est le transporteur transmembranaire ABCA1. Son niveau d'expression étant diminué chez les souris *lxrα*;*β*^{-/-}, il semble donc qu'un excès de stockage des esters de cholestérol du à un défaut d'efflux puisse être évoqué.

Ce résultat, associé au fait que le niveau d'expression d'un gène impliqué dans la biosynthèse du cholestérol, l'*HMG-CoA réductase*, reste inchangé, ainsi que les résultats des dosages en chromatographie sur couche mince, renforcent notre hypothèse d'un excès de stockage. Il sera nécessaire par la suite de déterminer la composition en acides gras et en stérols des spermatozoïdes dans le contexte des différents génotypes LXR pour établir des relations entre les régulations LXR-dépendantes et des problèmes de fertilité masculine, puisqu'une composition lipidique altérée des gamètes humains peut être associée à une infertilité [1].

Ce travail démontre que les LXR sont des régulateurs importants des métabolismes du cholestérol et des acides gras dans l'épididyme, et que cette fonction est étroitement associée à une isoforme particulière des LXR : LXRβ.

- 1 AKSOY Y., AKSOY H., ALTINKAYNAKB K., RIZA AYDIN H., ÖZKAN A. : Sperm fatty acid composition in subfertile men. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 2006, 75 : 75-79.
- 2 DAVIES J.D., CARPENTER K.L., CHALLIS I.R. et al. Adipocytic differentiation and liver x receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem., 2005, 280 : 3911-3919.
- 3 FORCE A., GRIZARD G., GIRAUD M.N., MOTTA C., SION B., BOUCHER D. : Membrane fluidity and lipid content of human spermatozoa selected by swim-up method. Int. J. Androl., 2001, 24 :327-334.
- 4 FRENOUX J.M., 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.
- 5 HEEMERS H.V., VERHOEVEN G., SWINNEN J.V. : Androgen activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway : current insights. Mol. Endocrinol., 2006, 20 : 2265-2277.
- 6 ITOH M., MIYAMOTO K., SATRIOTOMO I., TAKEUCHI Y. : Spermatic granulomata are experimentally induced in epididymides of mice receiving high-dose testosterone implants. A light-microscopical study. J. Androl., 1999, 20 : 551-558.
- 7 JANOWSKI B.A., GROGAN M.J., JONES S.A. et al. : Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1999, 96 : 266-271.
- 8 JONES R. : Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. In : Jones R.C., Holland M.K., Doberska C. editors. The epididymis : cellular and molecular aspects. J. Reprod. Fertil. Suppl., 1998, 53 : 73-84.
- 9 MIYAZAKI M., KIM Y.C., GRAY-KELLER M.P., ATTIE A.D., NTAMBI J.M. : The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. J. Biol. Chem., 2000, 275: 30132-301388.
- 10 MOUZAT K., PROD'HOMME M., VOLLE D.H. et al. : Oxysterol nuclear receptor LXRβ regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. J. Biol. Chem., 2007, 282 : 4693-4701.
- 11 PEET D.J., TURLEY S.D., MA W. et al. : Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear receptor LXRalpha. Cell, 1998, 93 : 693-704.
- 12 REPA J.J., LIANG G., OU J. et al. : Regulation of sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev., 2000, 14 : 2819-2830.
- 13 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.
- 14 SAETHER T., TRAN T.N., ROOTWELL H., CHRISTOPHERSEN B.O., HAUGEN T.B. : Expression and regulation of Δ⁵-desaturase, Δ⁶-desaturase, stearoyl-coenzyme A (CoA) desaturase 1 and stearoyl-CoA desaturase 2 in rat testis. Biol. Reprod., 2003, 69 : 117-124.

- 15 SPAJIC B., CUPIC H., STIMAC G., BRIGIC I., KRUSLIN B., KRAUS O. : Cholesterol granuloma of the right epididymis mimicking an acute scrotum. *Asian J. Androl.*, 2006, 8 : 749-750.
- 16 TABOR D.E., KIM J.B., SPIEGELMAN B.M., EDWARDS P.A.: Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274 : 20603-20610.
- 17 ULVEN S.M., DALEN K.T., GUSTAFSSON J.A., NEBB H.I.: LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2005, 73 : 59-63.
- 18 VOLLE D.H., LOBACCARO J.M. : Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues : Beyond the "foie gras", the steroids and sex ? *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2007, 265-266 : 183-189.
- 19 VOLLE D.H., MOUZAT K., DUGGAVATHI R. et al. : Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols LXR to maintain male fertility. *Mol. Endocrinol.*, 2007, 21 :1014-1027. Epub 2007 Mar 6.
- 20 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.
- 21 ZHANG Y., ZHANG X., CHEN L. et al. : Liver X receptor (LXR) agonist TO901317 upregulates SCD1 expression in renal proximal straight tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2006, 290 : F1065-1073.

to the presence of isolated heads and flagellae when spermatozoa are recovered from the *cauda epididymidis*.

To further the phenotypic characterization of LXR knockout mice, the lipid composition of *caput epididymides* from wild-type and LXR knockout mice was assessed using oil red O staining on tissue cryosections, lipid extraction followed by high performance liquid chromatography or gas chromatography. Gene expression was determined by quantitative real-time PCR.

We showed an accumulation of cholesteryl esters in *caput epididymides* from *lxrβ*^{-/-} and *lxrα;β*^{-/-} mice. This accumulation was not associated with modifications in the fatty acid profiles, which are similar in all four genotypes. Changes in the expression levels of several genes are discussed in this physiological context, but cellular cholesterol efflux pathways appear to be altered in an LXRβ-dependent fashion.

Altogether, these results show that LXRs are important regulators of epididymal functions, and could therefore play a key role in lipid maturation processes occurring during sperm epididymal maturation.

Key words: *epididymis, LXR, nuclear receptors, lipids, cholesterol, gene expression*

Manuscrit reçu : juin 2007 ; accepté juin 2007.

ABSTRACT

Liver X receptors (LXRs) regulate lipid metabolism in the mouse epididymis

Fabrice SAEZ, Aurélie OUVRIER, Brigitte LAILLET, Rémi CADET, Patrick VERNET, Benoît SION, Jean-Marc A. LOBACCARO et Joël R. DREVET

This study investigated the role of Liver X Receptors (LXRs) in the lipid composition and gene expression regulation in mouse *caput epididymidis*. LXRs are nuclear receptors for oxysterols, molecules derived from cholesterol metabolism, which are present in mammals in two isoforms: LXRα, which is more specifically expressed in lipid metabolising tissues such as liver, adipose and steroidogenic tissues, while LXRβ is ubiquitous. Their importance in reproductive physiology has been sustained by the fact that male knockout mice for both LXRs have impaired fertility from the age of 5 months, leading to complete sterility by the age of 9 months. These disorders are associated with epididymal epithelium degeneration in *caput epididymidis* segments one and two, and with sperm midpiece fragility, leading

Remerciements :

Les auteurs remercient le Dr Jean-Michel CHARDIGNY (Unité INRA de Nutrition humaine, CRNH-Auvergne, Clermont-Ferrand) pour son aide dans la caractérisation des lipides. Merci à tous les membres des équipes "Epididyme" et "Chester-LXR" pour les discussions scientifiques et les interactions techniques autour de ce projet. Des remerciements particuliers à Christelle DAMON qui a réalisé tous les traitements et les manipulations histologiques des tissus qui sont présentés dans cet article.

Cette étude a été co-financée par le CNRS, le Ministère des Sciences et Technologies et par une bourse de la Société d'Andrologie de Langue Française (SALF) à FS. JMAL est financé par la Fondation pour la Recherche Médicale (INE2000-407301/1) et la Fondation BNP-Paribas.

Bourse SALF 2005.