HAL
open science

# Modèle murin invalidé pour les LXRs : dyslipidémie et impact sur la maturation post-testiculaire des gamètes

Marjorie Whitfield

## To cite this version:

Marjorie Whitfield. Modèle murin invalidé pour les LXRs : dyslipidémie et impact sur la maturation post-testiculaire des gamètes. Reproduction sexuée. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC010 . tel-01793278

**HAL Id: tel-01793278**

**https://theses.hal.science/tel-01793278v1**

Submitted on 16 May 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE**

N° D.U. 2801 Année : 2017

**ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

N°d'ordre : ED SVSAE 714

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

**Marjorie Whitfield**

Le 16 Mars 2017

# Modèle murin invalidé pour les LXRs : dyslipidémie et impact sur la maturation post-testiculaire des gamètes

| | | |
|---|---|---|
| Présidente : | **Pr Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ** | Pr UMR 6293, Clermont Ferrand |
| Rapporteurs : | **Dr Aminata TOURÉ** | DR2 CNRS UMR 8104, Paris Descartes |
| | **Dr Christophe ARNOULT** | DR2 CNRS UMR 5309, Grenoble |
| Examinateurs : | **Pr Corinne MALPUECH-BRUGERE** | Pr UMR 1019, Clermont Ferrand |
| | **Pr Clément JIMENEZ** | PUPH CHU, Bordeaux |
| Directeur de thèse : | **Pr Joël DREVET** | Pr UMR 6293, Clermont Ferrand |
| Co-directeur de thèse : | **Dr Fabrice SAEZ** | MCU UMR 6293, Clermont Ferrand |

Laboratoire GReD – UMR-CNRS 6293 INSERM U1103 – Université Clermont Auvergne – Equipe « Mécanismes de l'infertilité mâle post-testiculaire »

***A Paul et Carmen,***

***Jules, Léopold et Marius,***

***Deux générations vous séparent,***

***mais les mêmes valeurs vous unissent...***

## *Remerciements*

Tout d'abord je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse : le professeur Anne-Marie Lefrançois Martinez, le docteur Aminata Touré, le docteur Christophe Arnoult, le professeur Corinne Malpuech-Brugère et le professeur Clément Jimenez d'avoir accepté de juger mes travaux.

Je tiens à remercier Joël Drevet pour m'avoir accueillie dans l'équipe et pour m'avoir fait confiance durant ces années. Merci pour le temps passé à l'amélioration des différents écrits et pour les bonnes rigolades au cours des repas d'équipe. Une spéciale dédicace à vos chemises !

Mes sincères remerciements à Fabrice. Notre duo de choc arrive à sa fin… J'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour ta disponibilité et ton aide notamment en ce qui concerne l'anglais (ahem…). J'apprécie particulièrement la confiance qui s'est installée au cours de ces années et qui a été, je pense, à l'origine d'un travail efficace. Partager ton bureau a été un vrai plaisir et j'espère retrouver une ambiance aussi agréable dans la suite de ma carrière.

Je remercie Rachel pour m'avoir initiée à la cytométrie en flux mais pas seulement ! Merci pour ta joie de vivre, ton aide quotidienne et pour nos bonnes parties de rigolade dans ton « bureau/salle café » (d'ailleurs au passage merci pour les cannelés). Merci pour ton impitoyable talent de correctrice dont ont bénéficié toutes mes planches mais également ce manuscrit. Je te souhaite le meilleur à toi L. et C.

Merci à Ayhan pour m'avoir accompagnée lors de mes premiers pas au laboratoire. Te « suivre » n'est pas toujours aisé au sens propre comme au figuré ! Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour tous tes conseils scientifiques ou non.

Je remercie Joëlle pour m'avoir fait découvrir les joies de la bioinformatique ainsi que pour son aide dans notre projet. Les repas d'équipe chez toi, autour du barbecue sont de chouettes souvenirs.

Merci à Alexandre et Allison, mes collègues étudiants MePTI ! L'entraide entre étudiants est toujours bénéfique et nous en sommes un bon exemple. Alexandre, bientôt la fin pour toi aussi, je te souhaite beaucoup de courage pour les mois difficiles qui arrivent. La rédaction n'est pas toujours une partie de plaisir mais tu verras c'est enrichissant ! Allison,

j'espère que tu arriveras enfin à trier ces foutues cellules et que les nouvelles orientations de ton projet seront prometteuses ;). Garde la foi et vive l'immuno ! Je vous souhaite à tous les deux toute la réussite que vous méritez pour votre fin de thèse et pour votre carrière.

Un grand merci à Christelle notre superwoman de l'histo ! Ton aide a été précieuse au cours de ma thèse et ton organisation en fait pâlir d'envie plus d'un. Merci pour ta gentillesse et pour ton écoute, travailler avec toi est un vrai plaisir.

Merci à mon petit Bobby (Jérémie) pour m'avoir fait découvrir les joies de l'encadrement d'un master 2 ! Partager ces 6 mois avec toi a redonné un coup de fouet à ma fin de thèse ! Je te souhaite le meilleur pour la suite dans ta nouvelle équipe.

Je remercie également Chantal et Stéphanie, les deux dernières recrues de l'équipe ! Je n'ai pas beaucoup eu l'occasion de travailler avec vous, étant déjà en rédaction à votre arrivée et j'espère que vous vous épanouirez dans cette nouvelle équipe.

Merci à Sandrine, Khirredine et Philippe pour avoir pris soin de mes petites soussous.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du laboratoire, PCE et Biomove, pour leur aide précieuse.

Mon ptit Pierrot, merci pour ta bonne humeur et ton sens de l'humour inégalable ! Les repas du midi sans toi, ce ne serait vraiment pas pareil ! Merci de m'avoir permis d'admirer durant ces années tes talents pour le bricolage, rafistolage et disquage en tout genre. J'espère que d'autres groupies prendront ma place et seront émerveillées devant ton voltmètre, on travaille mieux avec un public. En plus de ces talents tu es quelqu'un de disponible, toujours prêt à aider et excellent scientifiquement, ton seul défaut… ton optimisme… ! Mon seul regret : que tu ne m'aies pas appris à maîtriser la langue de Shakespeare…

Je remercie également Silvère. Tu fais partie de ce groupe de « bons » blagueurs du midi. Merci de nous avoir permis de rigoler si souvent à tes dépens ! Ton implication dans la recherche malgré l'enseignement force l'admiration, tu es un CR dans l'âme ;). J'espère qu'il n'arrivera rien à ta chère assiette dans le nouveau bâtiment et que les chaises seront à ton goût…

Merci à Claude pour ta disponibilité, avec toi les gens ont intérêt à être à jour sur leurs saisines !

Un grand merci à Laurent sans qui un grand nombre de grilles de mots fléchés seraient restées inachevées…

Je remercie également Cyrille, ton imagination débordante m'étonne toujours bien que je ne comprenne pas tout !

Je remercie Jean-Marc, toujours disponible pour nous expliquer des choses même si les explications ne sont pas toujours claires ! Si tu savais comme tu manques à l'ED…

Merci à Marie et Antoine avec qui j'ai fait de grandes découvertes culinaires au cours de ma thèse.

Je tiens à remercier Isa, la référence en commandes et magouilles en tout genre !

Je remercie JC qui a toujours veillé à ce que mon verre soit plein !

Un grand merci aux « petits » Nenette (Cyril) et Choupie (Laura) qui ont apporté un vent de fraîcheur au labo et à nos fins de thèse ! Des étudiants comme on n'en fait plus, je vous souhaite toute la réussite que vous méritez, gardez courage même dans les moments difficiles ! On vous laisse les clés du labo, je sais qu'elles seront entre de bonnes mains ;).

Je n'oublie pas les potos de Biomove, Maxou et Bourkiki (Pierre). Je vous souhaite réussite et courage pour votre fin de thèse !

Merci à mes collègues de M2 Rosyne et Aurélien avec qui on a partagé tant de fous rires. Je vous souhaite succès et bonheur dans votre vie personnelle et professionnelle.

Je remercie Margaux pour le soutien que l'on s'est mutuellement apporté durant ces années et pour tous les mégas fous rires aux pauses clopes ! Tu mènes de front ta carrière de maman et de thésarde ce qui force le respect. Dernière ligne droite, vivement septembre, je te souhaite le meilleur à toi et ta petite famille.

Ma Typh, ces années de thèses auraient été bien mornes sans toi. Que de crises de rires, de pleurs, de discussions interminables, de questions existentielles (y a-t-il un versant psychologique à l'odeur du capuccino de la machine à café du 1er cycle ?)… On est capables de disserter des heures sur des sujets intéressants, ou non, de faire les 400 coups (et oui ethicanimalslabscomittee c'est nous^^), on est passées maîtres dans la décoration de

bureau et dans le photomontage, on est tellement différentes et à la fois complémentaires. Les Simones, Tic et Tac, un vrai phénomène ambulant et ma plus belle rencontre en thèse, puisque c'est là qu'on a vraiment appris à se connaître. Maintenant il va falloir découvrir ce qu'est un labo sans Typh. Tu es brillante ma Typh et je souhaite tout le bonheur et la réussite du monde parce que tu le mérites !

Pétuc, quand je rédige ces lignes tu es maintenant loin au pays des tulipes. On a tellement partagé et traversé de choses ensemble, licence, master, doctorat. Tu as toujours été là dans les moments difficiles que ce soit personnel ou professionnel. Toujours là pour me mettre un coup de pied au cul quand je baisse les bras, pour me faire rire quand je suis triste. Et jamais le dernier pour me causer du souci ! Bosseur dans l'âme, taquin, de nous deux le plus sociable (ahem)… Pas la peine d'écrire ici tout le bien que je pense de toi, tu le sais… Voilà maintenant une nouvelle épreuve qui nous attend, le post-doc, la pire épreuve puisqu'on risque de la vivre séparés… On l'affrontera comme le reste et comme tu l'as dit « longue vie à nous ».

Je n'oublie pas de remercier mes beaux-parents, Florence et Pascal, pour leur soutien et leur gentillesse.

Et merci à H., j'espère que la vie à la campagne te plaît !

Enfin un immense merci à la team « Les misères », Maman, Laury, Maureen, Alison et Chloé. Merci de votre soutien inconditionnel, merci de me supporter même quand je suis chiante, merci de me faire tellement rire ! Une famille soudée voilà ce qu'il y a de plus important, je suis fière de vous toutes !

**Une partie de ces travaux a été présentée aux congrès suivants :**

Communications orales à des congrès ou conférences

**9th Congress of the European Academy of Andrology** : The LXR-null mice : a model for dyslipidemia-induced male infertility and capacitation impairment. Rotterdam, Pays-Bas, 21-23 Septembre 2016.

**Journée de l'Ecole Doctorale 2016 (JED)** : Modèle murin invalidé pour les LXR : dyslipidémie et altération de la capacitation. Clermont Ferrand, 2 juin 2016.

**5th Nuclear Receptor Meeting** : Dyslipidemia-induced impairement of capacitation in male mice invalidated for Liver X Receptor. Clermont Ferrand, 5 Juin 2015.

Communications affichées

**1ères Journées du GDR Repro 3606 "ReproSciences"** : Murine model invalidated for LXR: dyslipidemia and capacitation impairment. Rennes, 13-15 Avril 2015.

**6th International conference on the epididymis** : Murine model invalidated for LXR: dyslipidemia and capacitation impairment. Shanghai, China, Oct 31- Nov 3, 2014.

**XXXème congrès de la Société d'Andrologie de la Langue Française (SALF)** : Modèle murin invalidé pour les LXRs : dyslipidémie et altération de la capacitation. Marseille, 22-24 Janvier 2014.

**<u>Une partie de ces travaux a fait l'objet d'articles soumis ou en cours de soumissions</u> :**

**<u>Whitfield M</u>**, Ouvrier A, Cadet R, Damon-Soubeyrand C, Guiton R, Jany L, Kocer A, Marceau G, Pons-Rejraji H, Trousson A, Drevet JR, Saez F. Liver X Receptors (LXRs) Alpha and Beta Play Distinct Roles in the Mouse Epididymis. ***Biol Reprod.*** Mars, 2016 (**Article 1**).

**<u>Whitfield M</u>**, Guiton R, Rispal J, Acar N, Kocer A, Drevet JR, and Saez F. Dyslipidemia alters sperm maturation and capacitation in LXR-null mice. ***Molecular Human Reproduction*** En révision (**Article 2**).

**<u>L'article suivant est présenté en annexe</u>**

**<u>Whitfield M</u>**, Pollet-Villard X, Levy R, Drevet JR, Saez F. Posttesticular sperm maturation, infertility, and hypercholesterolemia. ***Asian J Androl***. Septembre, 2015. **Review**

# *Résumé*

La production de spermatozoïdes fécondants est un processus long et multi étapes, débutant par la production des gamètes mâles dans le testicule. Les spermatozoïdes sont ensuite successivement maturés au cours du transit épididymaire puis lors de leur passage dans les voies génitales femelles au cours du processus de capacitation. Ces étapes de maturation post-testiculaires concernent notamment la composition lipidique du gamète pour lui permettre d'acquérir une fluidité membranaire essentielle à la fécondation. Le développement de l'hyperactivation flagellaire, la réaction acrosomique et les étapes de fusion membranaires avec l'ovocyte sont en effet dépendantes de cette fluidité membranaire.

Les résultats présentés dans cette thèse mettent en évidence l'importance de l'homéostasie lipidique épididymaire pour la maturation lipidique des spermatozoïdes et l'acquisition du pouvoir fécondant. Au niveau moléculaire cette homéostasie lipidique est régulée par les isoformes α et β des LXRs, les récepteurs nucléaires des oxystérols (NR1H3 et NR1H2, respectivement). Un régime alimentaire enrichi en cholestérol chez des souris jeunes invalidées pour les LXRs entraîne une infertilité avec une atteinte spécifique de l'épididyme. La maturation épididymaire des spermatozoïdes est alors altérée, entrainant des défauts de compositions lipidiques et protéiques de la membrane plasmique spermatique. Ces défauts ont des répercussions délétères sur la capacitation, issues de perturbation des flux calciques et de la tyrosine phosphorylation.

En plus de leurs répercussions endocriniennes, les dyslipidémies semblent également affecter la maturation post-testiculaire. Ces résultats sont à considérer dans le cadre des protocoles de PMA puisque le bilan lipidique plasmatique ne fait pas partie des examens classiques des couples en PMA. Or en France, 55% des hommes entre 30 et 54 ans sont atteints d'une dyslipidémie. Ces désordres métaboliques lipidiques pourraient altérer la maturation post-testiculaire des gamètes, provoquant un certain nombre d'infertilités et/ou d'échecs en PMA.

LXR : Liver X Receptor, PMA : Procréation Médicalement Assistée.

# *Abréviations*

| | |
|---|---|
| AA | Acide arachidonique |
| AAA | ATPase associated with various cellular activities |
| ABC | ATP binding cassette |
| ACC | Acetyl-CoA carboxylase |
| ADAM | A disintegrin and metalloprotease |
| AG | Acide gras |
| AKAP | A kinase anchoring protein |
| AKT | Protéine kinase B |
| AMPc | AMP cyclique |
| APM | Acrosomal plasma membrane |
| APOE | Apolipoprotéine E |
| AR | Androgen receptor |
| BLVRA | Biliverdin reductase A |
| BSA | Bovine serum albumin |
| BSG | Basigine |
| CA | Anhydrase carbonique |
| CABYR | Calcium binding tyrosine phosphorylation regulated |
| CaM | Calmoduline |
| CASA | Computer assisted sperm analysis |
| CatSper | Cation channel of spermatozoa |
| CFTR | Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| COX-2 | Cyclooxygénase-2 |
| CRISP | Cystein rich secretory protein-1 |
| CT | Cholestérol total |
| DAG | Diacylglycérol |
| DFI | DNA fragmentation index |
| DHA | Acide docosahéxaénoïque |
| DHT | Dihydrotestostérone |
| DKO | Double knock out LXR |
| DPA | Acide docosapentaénoïque |
| DRM | Detergent-resistant membrane |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |

| | |
|---|---|
| ELF | Epididymal luminal fluid |
| ELSPBP1 | Epididymal sperm binding protein 1 |
| ENaC | Epithelial $Na^+$ channel |
| ENNS | Etude national nutrition santé |
| EOR | Espèces oxygénées réactives |
| ER | Estrogen receptor |
| ERK | Extracellular regulated kinase |
| ES | Equatorial segment |
| FAK | Focal adhesion kinase |
| FASN | Fatty acid synthase |
| FBP | Fructose-1,6-biphosphatase |
| FIV | Fécondation *in vitro* |
| FRAP | Fluorescence recovery after photobleaching |
| FSIP2 | Fibrous sheath-interacting protein 2 |
| G6P | Glucose-6-phosphatase |
| GFP | Green fluorescent protein |
| GLUT4 | Glucose transporteur 4 |
| GM1 | Ganglioside m1 |
| GPI | Glycosylphosphatidylinositol |
| GST | Glutathion-S-transférase |
| HAF | Hyperactivation flagellaire |
| HCD | High cholesterol diet |
| HDL | High density lipoprotein |
| HMGCR | Hydroxyméthyglutaryl-CoA reductase |
| HMGCS | Hydroxyméthyglutaryl-CoA synthase |
| ICSI | Intra cytoplasmic sperm injection |
| IDOL | Inducible degrader of the LDLR |
| IIU | Insémination intra-utérine |
| IL6 | Interleukine-6 |
| IMC | Indice de masse corporelle |
| IP3 | Inositol-3-phopshate |
| IS | Segment initial |
| KO | Knock out |

| | |
|---|---|
| LDL | Low density lipoprotein |
| LDLR | LDL receptor |
| LXR | Liver X receptor |
| LXRE | LXR responsive element |
| MEK | Mitogen activated protein kinase kinase |
| MET | Microscopie éléctronique à transmission |
| MMP-9 | Métalloprotéinase matricielle 9 |
| MUFA | Monounsaturated fatty acid |
| NAG | Neutral-α-glucosidase |
| NBC | Sodium bicarbonate co-transporter |
| NK | Natural killer |
| NO | Oxyde nitrique |
| NOS | Nitric oxide synthase |
| NPC1L1 | Niemann-Pick C1 like 1 |
| NPC2 | Niemann-Pick disease type C2 |
| ODF | Outer dense fiber |
| PAPM | Post-acrosomal plasma membrane |
| PC | Phosphatidylcholine |
| PCK | Phospho-enol-pyruvate-carboxykinase |
| PDE | Phosphodiestérase |
| PDH | Pyruvate déshydrogénase |
| PE | Phosphatidyléthanolamine |
| PI | Phosphatidylinositol |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate |
| PKA | Protéine kinase A |
| PKAR | Protein kinase A regulatory subunit |
| PKC | Protéine kinase C |
| PL | Phospholipide |
| PLC | Phospholipase C |
| PMA | Procréation médicalement assistée |
| PMCA4 P | Plasma membrane calcium-ATPase 4 |
| PP | Protéine phosphatase |
| PS | Phosphatidylsérine |

| | |
|---|---|
| PTK | Protéine tyrosine kinase |
| PUFA | Polyunsaturated fatty acids |
| PYK2 | Proline-rich tyrosine kinase 2 |
| RAF | Rapidly accelerated fibrosarcoma |
| RAS | Rat sarcoma |
| RTK | Récepteur tyrosine kinase |
| RXR | Retinoid X receptor |
| sAC | Soluble adenylyl cyclase |
| SACY | Soluble adenylyl cyclase |
| SAR | Sub-acrosomal ring |
| SCD | Stearoyl-CoA desaturase |
| SFA | Saturated fatty acid |
| SFK | SRC family kinase |
| SH2 | Src homology 2 |
| SHC | Src homology 2 domain containing |
| SKO | Simple knock out LXR |
| SLC | Solute carrier |
| SNARE | Soluble N-ethyl-maleimide |
| SOD | Superoxyde dismutase |
| SPAM1 | Sperm adhesion molecule 1 |
| SPM | Sphingomyéline |
| SQS | Squalène synthase |
| SR-B1 | Scavenger receptor – B1 |
| Src | Sarcoma |
| SREBP | Sterol regulatory element-binding protein |
| TAT1 | Testis anion transporter 1 |
| TEC | Transfert d'embryon congelé |
| TERA | Transitional endoplasmic reticulum ATPase |
| TG | Triglycérides |
| TP | Tyrosine phosphorylation |
| tRF | t RNA fragment |
| VCP | Valosine-containing protein |
| VDAC2 | Voltage-dependent anion channel 2 |

| | |
|---|---|
| VDCC | Voltage-dependent calcium channel |
| VLCPUFA | Very long chain PUFA |
| VLDL | Very low density lipoprotein |
| YWHAZ | Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta |
| ZP | Zone pellucide |

# *Sommaire*

*Introduction Bibliographique* ..... 1

**I- L'Epididyme** ..... 2

A- Organisation structurale de l'épididyme ..... 2

1- Anatomie ..... 2

2- Les différents types cellulaires de l'épididyme ..... 3

a) Les cellules principales ..... 3

b) Les cellules basales ..... 4

c) Les cellules apicales ..... 4

d) Les cellules étroites ..... 5

e) Les cellules claires ..... 5

f) Les cellules en halo ..... 6

3- La barrière hémato-épididymaire ..... 6

B- Les fonctions de l'épididyme ..... 7

1- Le transport des spermatozoïdes ..... 7

2- Le stockage des spermatozoïdes ..... 7

3- La protection des spermatozoïdes ..... 9

4- La maturation des spermatozoïdes ..... 10

a) Les modifications morphologiques ..... 10

b) Les modifications fonctionnelles ..... 11

c) Les modifications biochimiques ..... 12

5- Régulation des fonctions épididymaires ..... 12

a) Les facteurs endocrines ..... 12

b) Les facteurs lumicrines ..... 14

c) Les facteurs paracrines et/ou autocrines ..... 14

C- Maturation biochimique du spermatozoïde au cours du transit épididymaire ..... 14

1- Les glycosylations ..... 15

a) Formation et fonctions du glycocalyx ..... 15

b) Maturation épididymaire du glycocalyx ..... 16

2- Les lipides ..... 19

a) Les différentes classes de lipides et leurs représentations dans la membrane spermatique ..... 19

a-1) Les lipides simples ..... 19

a-2) Les lipides complexes ..... 22

b) Maturation épididymaire de la composition lipidique des spermatozoïdes ..... 24

c) Conséquences de la maturation épididymaire sur la dynamique membranaire ..... 25

d) Structure de la membrane spermatique ..... 27

3- Les protéines ..... 30
a) La modification de protéines d'origine testiculaire ..... 30
b) Les protéines secrétées ..... 31
b-1 Les protéines associées superficiellement ..... 31
b-2 Les protéines ancrées à la membrane ..... 32
c) Les épididymosomes ..... 33
c-1 Mode de sécrétion des épididymosomes ..... 33
c-2 Epididymosomes et transfert de protéines ..... 34
c-3 Autres rôles des épididymosomes ..... 36
**II- La capacitation** ..... 39
A-Définition générale ..... 39
B-Acteurs et flux ioniques ..... 40
1- Les principaux acteurs de la capacitation ..... 41
a) Le cholestérol ..... 41
b) L'adénylate cyclase ..... 43
b-1) L'adénylate cyclase soluble ..... 44
b-2) Les adénylate cyclases transmembranaires ..... 45
b-3) Régulation de la concentration d'AMPc ..... 46
c) La protéine kinase A ..... 46
c-1) Activation et rôle de la PKA au cours de la capacitation ..... 47
c-2) Régulation de l'activité PKA ..... 47
2- Les flux ioniques ..... 48
a) Le bicarbonate ..... 48
a-1) Le co-transporteur sodium/bicarbonate NBC ..... 49
a-2) Les échangeurs chlore/bicarbonate ..... 49
a-3) Anhydrase carbonique ..... 51
b) Alcalinisation et hyperpolarisation membranaire ..... 52
b-1) Les échangeurs $Na^+/H^+$ (NHEs) ..... 53
b-2) Le canal $H^+$ voltage dépendant (Hv) ..... 53
b-3) Le canal $K^+$ SLO3 ..... 54
b-4) L'échangeur $Na^+/K^+$-ATPase ..... 54
b-5) ENaC ..... 55
c) Le calcium ..... 56
c-1) Les canaux calciques voltage-dépendants $Ca_v$ ..... 56
c-2) Le canal anionique voltage-dépendant VDAC2 ..... 57
c-3) Le canal CatSper ..... 58

c-4) La pompe à calcium PMCA4 ..... 60
c-5) Rôle biphasique du calcium ..... 61

C- Les voies de signalisation de la capacitation ..... 62
1-Voie de signalisation AMPc/PKA ..... 63
a) Les évènements rapides de la voie AMPc/PKA ..... 63
b) Les évènements lents de la voie AMPc/PKA ..... 63
2- La voie ERK ..... 65
3- Les EOR ..... 65
4- La voie des endocannabinoïdes ..... 67

D- La tyrosine phosphorylation : marqueur terminal de la capacitation ..... 68
1- Les tyrosine kinases au cours de la capacitation ..... 68
a) Les récepteurs tyrosine kinases ..... 69
b) Les protéines tyrosine kinases ..... 69
2- Identité et rôle des protéines tyrosine phosphorylées ..... 70
a) Les protéines de structure tyrosine phosphorylées ..... 71
b) Les protéines chaperonnes tyrosine phosphorylées ..... 72
c) Les canaux ioniques tyrosine phosphorylés ..... 72
d) Les enzymes métaboliques tyrosine phosphorylées ..... 73
e) Les enzymes anti-oxydantes tyrosine phosphorylées ..... 74

E- Les conséquences fonctionnelles de la capacitation ..... 75
1- L'hyperactivation flagellaire ..... 75
2- La réaction acrosomique ..... 77
a) Mécanismes moléculaires de la réaction acrosomique ..... 78
b) Localisation de la réaction acrosomique ..... 79

**III- Dyslipidémies et impact sur la fertilité mâle** ..... 81

A- Les dyslipidémies ..... 81
1) Lipides et maturation post-testiculaire des spermatozoïdes ..... 81
2) Définition des dyslipidémies ..... 82
3) Prévalences des dyslipidémies ..... 83

B- Dyslipidémies et infertilité mâle ..... 85
1) Modèles animaux d'infertilité en lien avec une perturbation du cholestérol ..... 86
a) Les souris *ApoB*$^{+/-}$ ..... 86
b) Les souris *Npc2*$^{-/-}$ ..... 86
c) Les souris *Dicer1* knock out conditionnel de l'épididyme ..... 87
d) Les lapins hypercholestérolémiques ..... 88

2) Dyslipidémies et fertilité chez l'homme ..... 88

C- Modèle d'étude : les souris invalidées pour les LXRs ..... 90

1) Les LXRs ..... 90

a) Généralités ..... 90

b) Fonctions principales des LXRs ..... 91

b-1) LXRs et homéostasie du cholestérol ..... 91

b-2) Métabolisme des acides gras et du glucide ..... 93

b-3) L'immunité ..... 93

2) Fertilité des souris Lxrα;$\beta^{-/-}$ ..... 94

a) Le phénotype testiculaire ..... 94

b) Le phénotype épididymaire ..... 96

3) Le modèle Lxrα;$\beta^{-/-}$ HCD ..... 98

*Projet de Recherche* ..... 100

*Résultats* ..... 103

**Présentation de la première publication** ..... 104

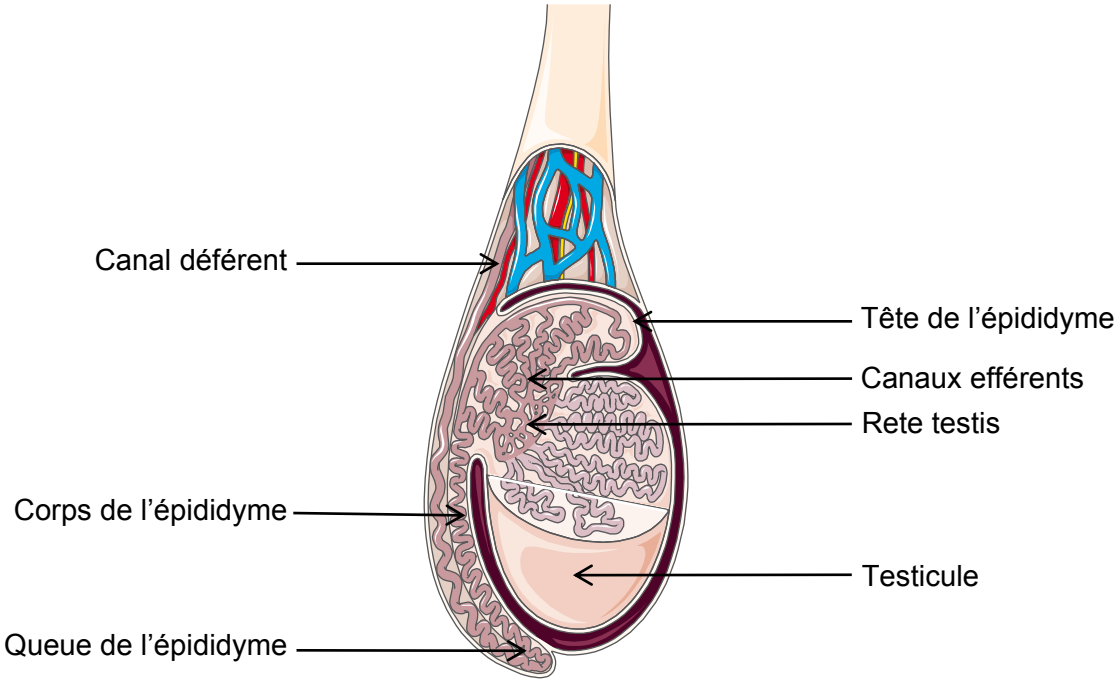
**Présentation de la deuxième publication** ..... 105

*Discussion & Perspectives* ..... 106

*Annexes* ..... 127

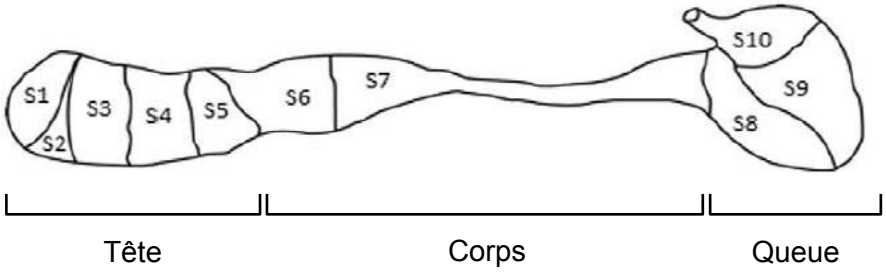
*Références Bibliographiques* ..... 128

# *Introduction Bibliographique*




**<u>Figure 1</u> : Représentation schématique du testicule et de l'épididyme.**

L'épididyme, situé à la face postérieure du testicule, relie les canaux efférents au canal déférent. *www.servier.fr*




**<u>Figure 2</u> : Segmentation de l'épididyme murin.**

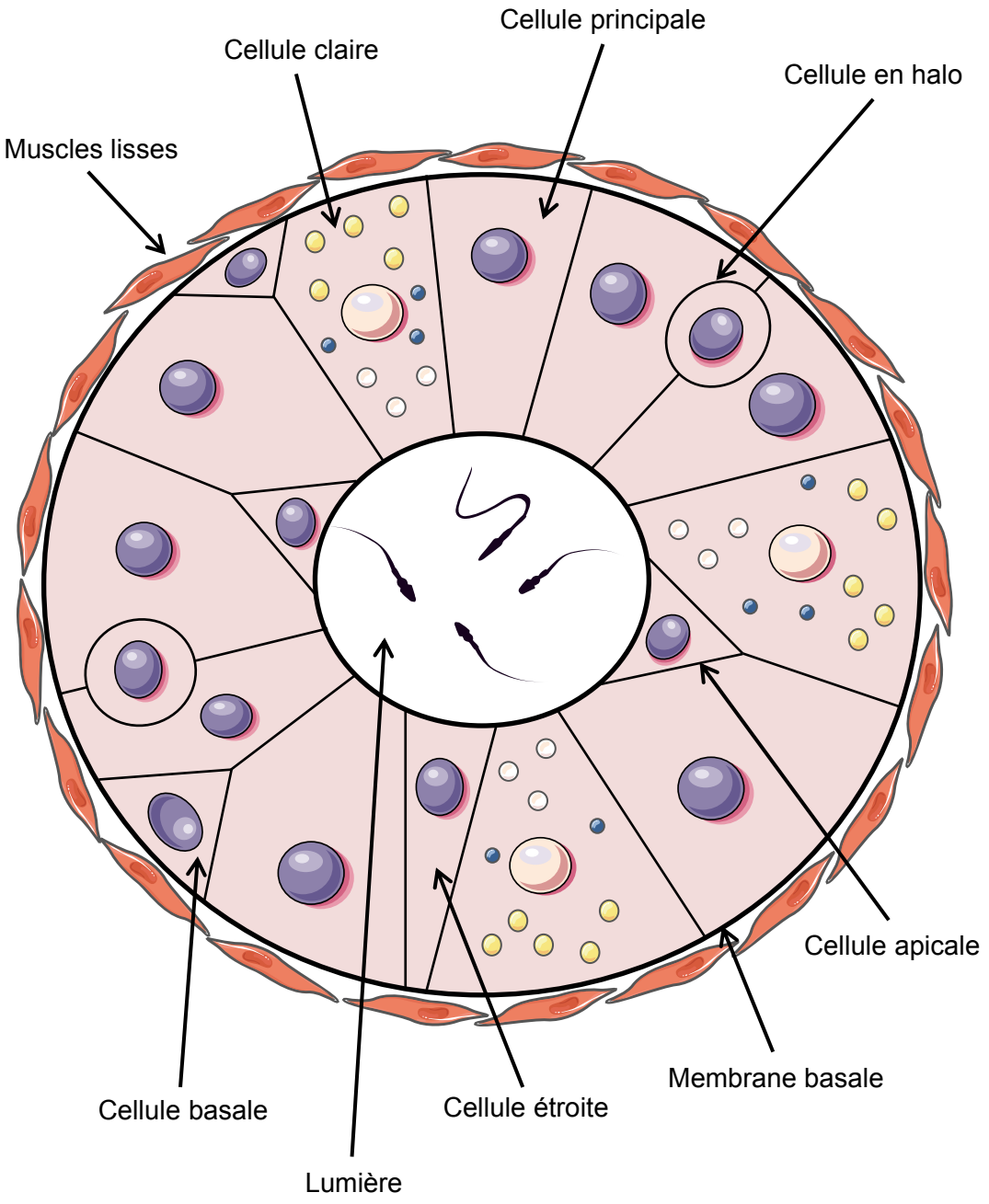
L'épididyme est divisé en trois parties anatomiques et fonctionnelles : la tête, le corps et la queue. Ces parties sont subdivisées en 10 segments chez la souris (d'après *Jelinski et al., 2007*).

# I- L'Epididyme

## A- Organisation structurale de l'épididyme

### *1- Anatomie*

L'épididyme des mammifères est un organe du tractus génital mâle accolé à la face postérieure du testicule (**Figure 1**). L'organe est composé d'un long tube unique fortement replié sur lui-même et entouré d'une fine capsule fibreuse : il permet de relier les canaux efférents au canal déférent. Il mesure plus d'un mètre chez la souris (Takano et al., 1981) et peut atteindre jusqu'à 5 mètres chez l'homme (Sullivan, 2004). L'épididyme est un dérivé Wolfien à l'exception de la partie la plus proximale (ou segment initial) qui dérive du mésoderme mésonéphrotique. Le segment initial a ainsi une origine embryonnaire commune avec le rein, ce qui rappelle les analogies de fonctionnement de ces deux organes en terme de réabsorption et filtration de fluide (Robaire et al., 2006). Il n'y a pas de segment initial chez l'homme, la partie proximale de l'épididyme étant principalement occupée par les canaux efférents qui sont également dérivés du mésoderme mésonéphrotique. Sur la base de sa morphologie et de son histologie, cet organe peut être divisé en trois parties distinctes : la tête ou *caput* en région proximale, le corps ou *corpus* en région médiane et la queue ou *cauda* en région distale. Ces différentes parties sont subdivisées en segments dont le nombre diffère selon les espèces. Chez la souris la description la plus classique dénombre dix segments, présentant des caractéristiques fonctionnelles et anatomiques différentes, et séparés entre eux par des travées conjonctives appelées *septa* (**Figure2** - (Abe et al., 1983; Johnston et al., 2005). Cette subdivision repose sur des analyses ultrastructurales ainsi que sur l'étude des activités enzymatiques et transcriptionnelles qui évoluent tout au long de l'organe assurant ainsi la maturation progressive des spermatozoïdes.




**<u>Figure 3</u> : Représentation schématique d'une coupe transversale de tubule épididymaire.**

Représentation des différents types cellulaires qui composent l'épithélium épididymaire : les cellules claires, les cellules en halo, les cellules basales, les cellules étroites, les cellules apicales et les cellules principales. La membrane basale est entourée d'une couche de muscles lisses. D'après *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 2006*.

### *2- Les différents types cellulaires de l'épididyme*

Le canal épididymaire est plongé dans un tissu conjonctif très vascularisé et riche en fibres de collagène. L'épithélium épididymaire est entouré d'une tunique musculaire composée de fibres lisses qui participent au transit des spermatozoïdes le long de l'épididyme grâce à des contractions péristaltiques régulières. L'épithélium épididymaire, de type pseudostratifié cylindrique, est composé de différents types cellulaires reposant sur la lame basale (**Figure 3**). La proportion de ces types cellulaires varie selon les différentes régions de l'organe assurant ainsi une évolution de la composition du fluide épididymaire.

#### a) Les cellules principales

Les cellules principales sont les cellules les plus abondantes de l'épithélium épididymaire et constituent environ 80% de la population cellulaire totale dans le segment initial. Le nombre de ces cellules décroît graduellement tout au long de l'organe et elles ne représentent plus que 65% de la population cellulaire totale dans la queue de l'épididyme (Trasler et al., 1988). Elles présentent des modifications morphologiques en fonction des régions dans lesquelles elles se situent (Hermo et al., 1994) en lien avec l'évolution de leur fonction. Dans le segment 1 chez la souris, ces cellules sont hautes et possèdent à leur pôle apical de nombreuses microvillosités qui se projettent dans la lumière du tubule (Abe et al., 1983). La hauteur de ces cellules ainsi que le nombre et la taille des microvillosités diminuent fortement dans la queue de l'épididyme.

Les cellules principales synthétisent un grand nombre de protéines qui peuvent être activement secrétées dans le compartiment luminal notamment de manière apocrine (Robaire et al., 2006). Elles présentent fréquemment des protrusions ou « blebs » émanant de leur pôle apical, à l'origine de la formation des épididymosomes. Ces cellules jouent également un rôle actif dans l'endocytose de protéines provenant du compartiment luminal (Robaire and Hermo, 2002). Les cellules principales sont liées entre elles par des jonctions serrées et participent ainsi à la formation de la barrière hémato-épididymaire (Agarwal and Hoffer, 1989; Suzuki and Nagano,

1978). Enfin, elles sont également impliquées dans la réabsorption du bicarbonate présent dans le fluide permettant son acidification et le maintien des spermatozoïdes dans un état quiescent (Pastor-Soler et al., 2005).

### b) Les cellules basales

Les cellules basales représentent 10 à 20% de la population cellulaire totale de l'épithélium épididymaire (Soranzo et al., 1982). De forme triangulaire et aplatie, elles sont situées à la base de l'épithélium épididymaire et ne sont donc pas en contact direct avec la lumière du tubule. Cependant dans le segment initial (IS) chez la souris elles émettent des projections cytoplasmiques entre les autres cellules épithéliales en direction de la lumière (Kim et al., 2015). De plus les cellules basales sont en association étroite avec les cellules claires, avec lesquelles elles participent à la régulation de l'acidité du fluide épididymaire (Shum et al., 2009), *via* la présence d'extensions cytoplasmiques (Seiler et al., 1999; Veri et al., 1993). Leur rôle complet est encore aujourd'hui peu défini bien qu'elles semblent impliquées dans la détoxication des radicaux libres (Veri et al., 1993) et la protection immune des spermatozoïdes (Cooper, 1998).

### c) Les cellules apicales

Les cellules apicales présentent un cytoplasme dense très riche en mitochondries et sont qualifiées ainsi en raison de la présence de leur noyau au pôle apical. Elles se trouvent principalement dans l'IS, où elles représentent 10% de la population cellulaire totale de l'épididyme et leur nombre diminue tout au long de l'organe pour ne représenter que 1% dans la queue de l'organe (Adamali and Hermo, 1996). Tout comme les types cellulaires précédents, elles participent à l'acidification du fluide épididymaire et donc à la quiescence des spermatozoïdes grâce à la production d'anhydrase carbonique qui permet la sécrétion de protons et la réabsorption du bicarbonate (Hermo et al., 2005; Martínez-García et al., 1995). De plus la proportion de ce type cellulaire est augmentée en cas de stress inflammatoire tel que celui occasionné lors d'une carence en magnésium, sans que leur implication dans ces processus

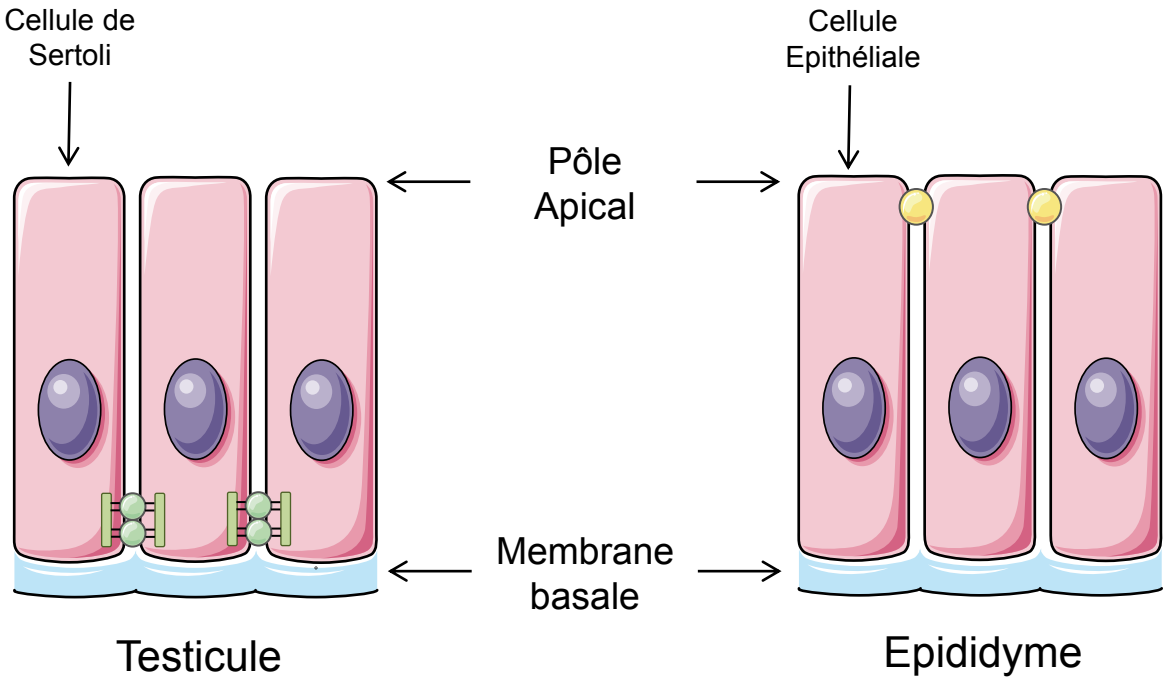
inflammatoires soit réellement connue (Vernet et al., 2004). Les cellules apicales ont également été montrées comme étant capables d'endocyter des substances présentes dans la lumière (Robaire and Hermo, 2002). Enfin, elles semblent également jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol au sein de l'épithélium épididymaire, puisqu'elles présentent le transporteur inverse de cholestérol ABCA1 (*ATP binding cassette A1*) à leur pôle apical (Ouvrier et al., 2009).

#### d) Les cellules étroites

Les cellules étroites représentent un faible pourcentage des cellules de l'épithélium épididymaire et ne sont présentes que dans la tête de l'épididyme chez la souris (Adamali and Hermo, 1996; Sun and Flickinger, 1980). Ces cellules sont plus fines que les cellules principales et sont reliées à la membrane basale par un mince filet cytoplasmique. Les fonctions de ce type cellulaire au sein de l'épithélium ne sont pas clairement définies. Elles semblent participer à l'acidification du fluide épididymaire car elles possèdent une activité anhydrase carbonique et sont capables de sécréter des protons dans la lumière (Cohen et al., 1976; Hermo et al., 2005; Pietrement et al., 2006). Aujourd'hui la distinction entre cellules apicales et cellules étroites reste controversée.

#### e) Les cellules claires

Les cellules claires se retrouvent essentiellement dans le corps et la queue de l'épididyme (Soranzo et al., 1982). Elles sont caractérisées par la présence de vésicules claires en région apicale, de lysosomes en partie médiane et d'inclusions lipidiques dans la région basale (Robaire and Hermo, 1988). Ces cellules ont un rôle d'endocytose bien plus important que celui des cellules principales (Olson and Hinton, 1985; Robaire and Hermo, 1988) et sont capables de récupérer le contenu des gouttelettes cytoplasmiques relarguées par les spermatozoïdes lorsqu'ils traversent le canal épididymaire (Hermo et al., 1988; Robaire and Hermo, 1988). Elles sont également impliquées dans l'absorption de certains composés présents dans le compartiment




**<u>Figure 4</u> : Représentation schématique des barrières hémato-testiculaire et épididymaire.**

Les jonctions serrées au pôle basal des cellules de Sertoli sont très spécialisées et verrouillent totalement le testicule. Les jonctions serrées dans l'épididyme sont plus lâches et situées au pôle apical des cellules épithéliales. D'après *Hedger., 2011*.

luminal (Beaulieu et al., 2005) et dans la régulation du pH du fluide épididymaire (Kujala et al., 2007).

#### f) Les cellules en halo

Les cellules en halo sont situées à la base de l'épithélium mais ne sont pas en contact avec la lame basale. Leur rôle n'est toujours pas clairement défini même si elles semblent liées à la défense immunitaire. En effet, elles ont été assimilées à des lymphocytes intra-épithéliaux ou à des monocytes résidents (Hoffer et al., 1973; Serre and Robaire, 1999).

### *3- La barrière hémato-épididymaire*

Les spermatozoïdes apparaissent chez l'homme après l'établissement du répertoire immunitaire. Certaines protéines spécifiques des gamètes mâles seront donc considérées comme « étrangères » par celui-ci. Une barrière physique séparant les spermatozoïdes du compartiment sanguin est donc nécessaire pour garantir la fertilité et empêcher la production d'autoanticorps. Cette barrière est constituée de jonctions serrées aux pôles apicaux des cellules principales et apicales (**Figure 4** - (Cyr et al., 1995; Friend and Gilula, 1972). Elle présente une imperméabilité aux traceurs à 21 jours chez la souris, suggérant qu'elle est fonctionnelle à cet âge (Suzuki and Nagano, 1978). Au-delà de la protection immunitaire qu'offre la barrière hémato-épididymaire, celle-ci permet aussi de maintenir un microenvironnement luminal particulier pour la protection et la maturation des spermatozoïdes. En effet, certaines molécules comme l'inositol ou la carnitine vont être concentrées de 10 à 100 fois entre la tête et la queue de l'épididyme, la barrière hémato-épididymaire les laissant diffuser. En revanche cette barrière est imperméable à d'autres molécules comme le L-glucose, l'insuline ou l'albumine, permettant ainsi une fine régulation de la composition du fluide épididymaire (Hinton, 1985; Hinton and Palladino, 1995; Turner, 1991).

La complexité de l'organisation structurale et histologique suggère que cet organe n'est pas seulement un lieu de « passage » pour les spermatozoïdes. La variation de la proportion des différents types cellulaires tout au long de l'organe, les fonctions propres de ces cellules et la

sélectivité de la barrière hémato-épididymaire vont permettre à l'épididyme de remplir ses différentes fonctions vis-à-vis des gamètes mâles.

## B- Les fonctions de l'épididyme

### *1- Le transport des spermatozoïdes*

Après leur relargage dans la lumière des tubes séminifères, les spermatozoïdes sont transportés à travers les canaux efférents vers la tête de l'épididyme. Des techniques d'incorporation d'isotopes marqués dans les cellules germinales ont permis de déterminer le temps de transit des gamètes dans l'épididyme. Ce temps de transit a été évalué à 12 jours chez l'homme (Rowley et al., 1970) et à environ 10 jours chez la souris (Meistrich et al., 1975). L'épithélium épididymaire est bordé par des stéréocils immobiles et la quantité de fluide est fortement réduite à l'entrée de l'organe (Crabo, 1965). Le transport des spermatozoïdes ne peut se faire de manière passive, la pression hydrostatique augmentant entre la tête et la queue de l'épididyme (Johnson and Howards, 1975). C'est pourquoi, les tubules épididymaires sont entourés d'une couche de muscles lisses dont l'épaisseur et l'innervation adrénergique augmentent de la tête de l'épididyme vers la queue (Baumgarten et al., 1971) ce qui permet de faire progresser les spermatozoïdes par des contractions péristaltiques.

### *2- Le stockage des spermatozoïdes*

Le site de stockage majeur des spermatozoïdes chez les mammifères est la queue de l'épididyme. A ce stade, les spermatozoïdes sont matures et fécondants et le rôle de la queue de l'épididyme va être de les conserver dans cet état et d'empêcher tout déclenchement prématuré de la capacitation qui compromettrait la fertilité. Afin de maintenir les spermatozoïdes dans un état quiescent l'épithélium épididymaire caudal sécrète des facteurs décapacitants, maintien un pH

luminal (Carr et al., 1985) et des concentrations calciques faibles (Armstrong et al., 1994; Morton et al., 1978), et sécrète des immobilines, glycoprotéines permettant de mécaniquement empêcher la mobilité des gamètes chez le rat et le hamster en créant un environnement hautement viscoélastique (Carr et al., 1985; Usselman and Cone, 1983). De plus il a été démontré que le fluide épididymaire contient des quantités importantes d'aldose réductase, une enzyme responsable de la conversion du glucose en sorbitol. Le pH épididymaire est optimal pour le fonctionnement de cette enzyme. Ainsi, le sorbitol produit en grande quantité entraîne une augmentation de l'osmolarité et une privation du milieu épididymaire en source énergétique, deux mécanismes favorisant le maintien des spermatozoïdes dans un état inactif. Alors que la quantité d'aldose réductase décroît vers la queue de l'épididyme, celle de la sorbitol déshydrogénase augmente. Cette enzyme permet la conversion du sorbitol en fructose, mais le pH épididymaire n'est pas optimal pour son fonctionnement. A l'éjaculation en revanche, le pH augmentant et le sorbitol étant présent en grande quantité, cette enzyme va pouvoir fournir un substrat énergétique au gamète et ainsi favoriser sa mobilité (Frenette et al., 2004).

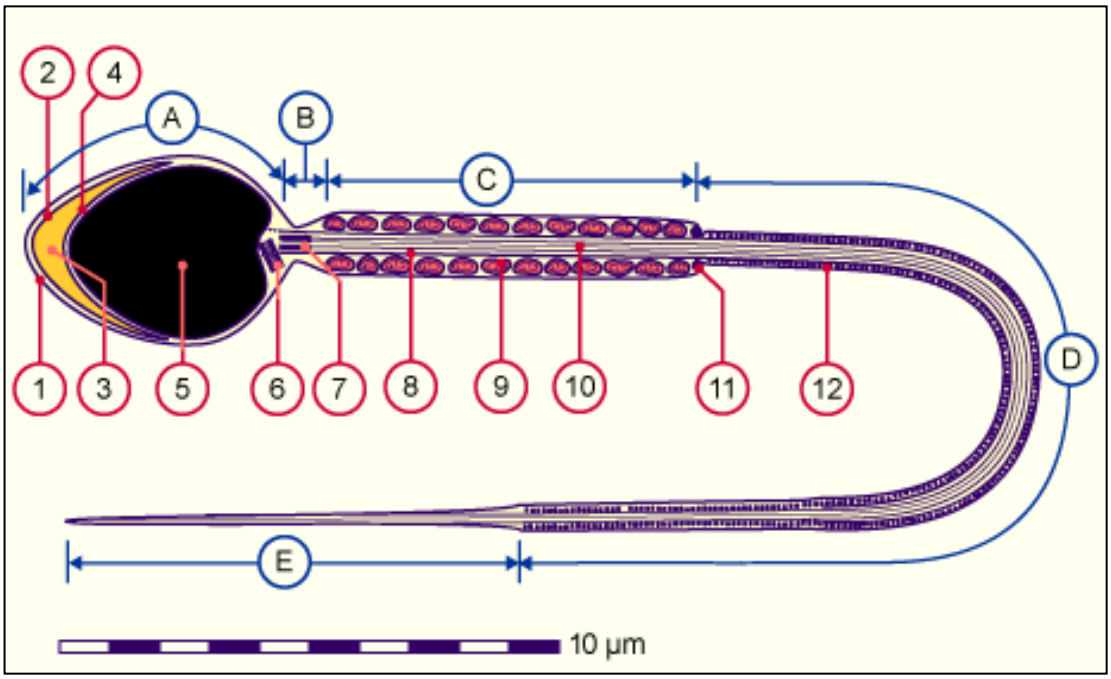
L'hypothèse selon laquelle les gamètes anormaux pouvaient être éliminés durant le stockage dans la queue de l'épididyme a été émise par certains auteurs. Une équipe a notamment montré que les spermatozoïdes défectueux pouvaient être ubiquitinylés déclenchant un signal de phagocytose pour les cellules principales épididymaires (Sutovsky et al., 2001). Cependant ces données furent vivement critiquées car les observations histologiques de l'épididyme ne montrent que très rarement une phagocytose des gamètes mâles, ce mécanisme est donc peu probable pour expliquer l'élimination des spermatozoïdes défectueux produits chaque jour (Cooper et al., 2002). Le groupe d'Olson a quant à lui démontré que les spermatozoïdes morts étaient enveloppés d'une glycoprotéine, FGL2 (*Fibrinogen Like protein 2*), secrétée par l'épithélium épididymaire. Cette équipe propose que ce mécanisme permettrait d'isoler les gamètes morts de la population de spermatozoïdes vivants permettant de préserver cette dernière des potentielles enzymes délétères libérées par les spermatozoïdes morts (NagDas et al., 2000; Olson and Hinton, 1985). Un autre

groupe a également mis en évidence l'acquisition *via* les épididymosomes d'ELSPBP1 (*Epididymal Sperm Binding Protein 1*) spécifiquement par la sous-population de spermatozoïdes morts (D'Amours et al., 2012) - voir partie I-C-c3).

### *3- La protection des spermatozoïdes*

Les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles au stress oxydant et il est démontré depuis longtemps que le peroxyde d'hydrogène entraîne une diminution de la mobilité et la mort des spermatozoïdes (Tosic and Walton, 1950). En effet la membrane plasmique des spermatozoïdes est principalement composée d'acides gras polyinsaturés (PUFA), ce qui rend les gamètes mâles hautement susceptibles à la peroxydation lipidique. De plus les espèces oxygénées réactives (EOR) entraînent également des dommages à l'ADN spermatique (Sawyer et al., 2003). Cette oxydation va entraîner des mutations de l'ADN pouvant conduire à des anomalies de développement, une augmentation des fausses couches et une augmentation de la morbidité dans la descendance (Aitken and Baker, 2004). Il est donc essentiel de protéger les gamètes mâles contre ces dommages afin de garantir la fertilité et la santé de la descendance.

Les spermatozoïdes sont des cellules particulièrement fragiles. Dénuées d'activité transcriptionnelle, elles ne peuvent engager de réponse face aux stress extérieurs. De plus, les spermatozoïdes perdent la quasi-totalité de leur cytoplasme au cours de la spermiogénèse et ne possèdent donc pas de réserve enzymatique cytosolique pour se protéger du stress. Ils sont alors complètement dépendants de leur environnement pour assurer leur protection. L'épididyme sécrète dans le fluide de nombreuses enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase (Alvarez et al., 1987), les glutathion peroxydases (Chabory et al., 2010; Dufaure et al., 1996; Noblanc et al., 2012; Schwaab et al., 1998) et les glutathion transférases (Robaire and Hales, 1982). De plus le fluide épididymaire contient de nombreuses molécules aux propriétés anti-oxydantes comme la taurine (Alvarez and Storey, 1983), le glutathion (Lenzi et al., 1994) ou l'albumine (Twigg et al., 1998). Chacune de ces enzymes ou molécules anti-oxydantes va être




**<u>Figure 5</u> : Représentation schématique d'un spermatozoïde mature.**

A) Tête - B) Collet - C) Pièce intermédiaire - D) Pièce principale - E) Pièce terminale

1) Membrane plasmique - 2) Membrane acrosomique externe - 3) Acrosome - 4) Membrane acrosomique interne - 5) Noyau - 6) Centriole proximal - 7) Restes du centriole distal - 8) Faisceaux longitudinaux extérieurs denses - 9) Mitochondrie - 10) Axonème - 11) Annulus - 12) Fibres denses externes. D'après *http://www.embryology.ch*.

retrouvée à différents degrés tout au long de l'épididyme selon les EOR en présence et ainsi assurer la protection des gamètes.

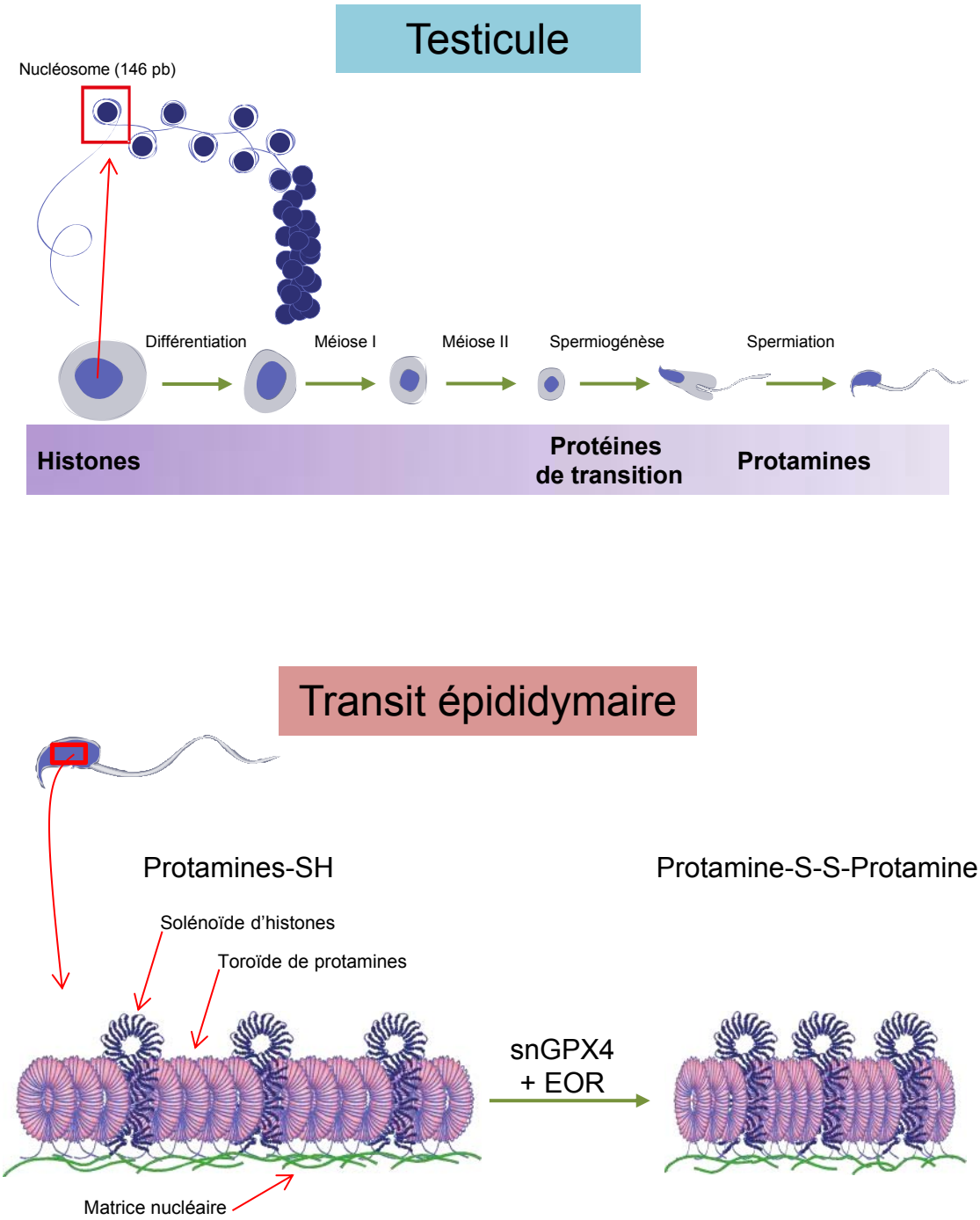
### *4- La maturation des spermatozoïdes*

La maturation des spermatozoïdes est la fonction majeure de l'épididyme. En effet, les spermatozoïdes, à l'issue de leur production dans le testicule, sont des cellules hautement polarisées mais immatures d'un point de vue fonctionnel car incapables de féconder un ovocyte. Une étude a notamment montré que seules 8% des ovocytes fécondés par des spermatozoïdes issus de la tête de l'épididyme étaient capables de se développer en blastocyste *in vitro*, ce chiffre montant à 48% pour des spermatozoïdes de queue d'épididyme (Wazzan et al., 1990). Cette étude montre qu'au-delà d'être essentielle pour la fécondation en elle-même, la maturation épididymaire est également indispensable pour garantir un développement embryonnaire normal.

Cette maturation concerne plusieurs aspects avec des modifications morphologiques, fonctionnelles et biochimiques.

#### a) Les modifications morphologiques

Les modifications morphologiques concernent le noyau du spermatozoïde (**Figure 5**). En effet au cours du transit épididymaire on observe une augmentation de la compaction du noyau spermatique. Cette condensation est initiée durant la phase finale de la spermatogénèse testiculaire *via* le remplacement des histones par les protamines (Sergerie et al., 2005). La condensation se poursuit ensuite durant le transit épididymaire par une intense activité de pontage disulfure inter et intra-protamines, au niveau des nombreux résidus cystéines portés par ces protéines nucléaires (**Figure 6**). Cette activité de pontage disulfure est assurée par un variant spermatique de la glutathion peroxydase 4, la snGPX4 (*sperm nucleus GPX4*) présente dans le noyau spermatique (Conrad et al., 2005). L'environnement luminal dans la tête de l'épididyme fournit un contexte pro-oxydant suffisant pour que cette activité de pontage disulfure ait lieu (cette enzyme utilisant les EOR pour sa réaction). Comme nous l'avons vu précédemment les




**<u>Figure 6</u> : Représentation schématique des évènements testiculaire et épididymaire qui conduisent au remaniement de la chromatine spermatique.**

Au cours de la spermatogénèse les histones sont progressivement remplacées par des protéines nucléaires de transition (TNP), elles-mêmes finalement remplacées par les protamines. A la fin de la spermiogénèse l'ADN lié aux protamines prend une apparence de toroïde de 50 à 100 kb. A certains endroits, l'ADN reste lié à des histones persistantes et forme les solénoïdes. Au cours du transit épididymaire, l'ADN spermatique est à nouveau condensé par un intense pontage disulfure. La snGPX4 utilise les EOR pour créer des ponts disulfures inter et intra-protamines. Modifié d'après *Champroux et al., 2016*. EOR : Espèces oxygénées réactives, snGPX4 : sperm nucleus Glutathione Peroxidase 4.

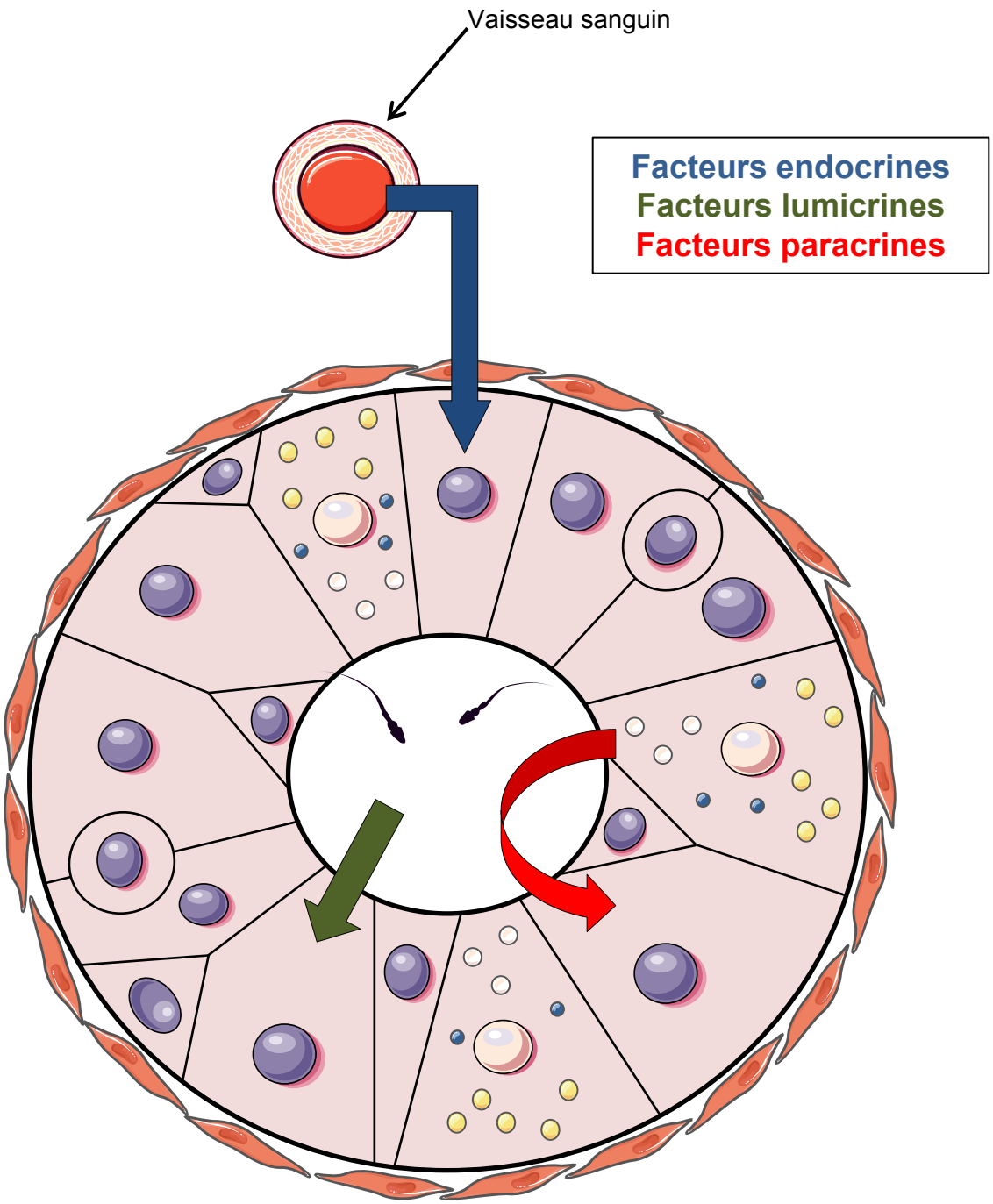
EOR sont donc à la fois délétères pour le spermatozoïde car générateurs de peroxydation lipidique et de mutations génétiques, mais également essentielles pour assurer le pontage disulfure et donc la condensation du noyau spermatique. L'épididyme a en charge d'équilibrer parfaitement la concentration de ces EOR. En effet cette compaction du noyau spermatique permettra de diminuer la taille de la tête spermatique, un évènement contribuant à l'acquisition de la mobilité, et de protéger le génome paternel, deux critères essentiels pour garantir un succès reproductif (Noblanc et al., 2011).

Enfin au niveau du flagelle, la migration de la gouttelette cytoplasmique de la base de la tête vers l'annulus au cours du transit épididymaire est observée dans de nombreuses espèces (Cooper and Yeung, 2003). Cette gouttelette pourrait intervenir dans la régulation du volume cellulaire. De nombreuses observations mettent en évidence la perte de la gouttelette cytoplasmique suite à sa migration. Cependant ce sujet est soumis à controverse puisque la majorité de ces observations est réalisée sur des spermatozoïdes dilués dans un milieu hypotonique pouvant entraîner la rupture et la perte de la gouttelette cytoplasmique.

#### b) Les modifications fonctionnelles

La modification fonctionnelle majeure observée au cours du transit épididymaire est l'acquisition de la mobilité spermatique, obtenue dès le passage de la tête de l'épididyme. Cette mobilité est caractérisée par des mouvements désordonnés et asymétriques associés à une progression circulaire. Ce n'est que dans la queue de l'épididyme que les spermatozoïdes seront capables de progresser de manière linéaire (Soler et al., 1994), bien que cette aptitude soit inhibée par l'environnement épididymaire (voir partie I-B-2).

Ces différents types de mobilité ne sont visibles qu'une fois les spermatozoïdes sortis de leur environnement épididymaire. En effet le fluide épididymaire, par son pH acide et sa viscosité, maintient les gamètes mâles dans un état quiescent, immobile, afin qu'ils conservent




**<u>Figure 7</u> : Les différentes sources de régulation des fonctions épididymaires.**

Les facteurs endocrines proviennent de la circulation systémique, les facteurs lumicrines sont véhiculés par le fluide et les facteurs paracrines sont produits par les cellules épithéliales avoisinantes.

leurs réserves énergétiques (Cooper, 1998). La mobilité ne se développera qu'après éjaculation, lors du mélange avec les sécrétions des glandes accessoires.

#### c) Les modifications biochimiques

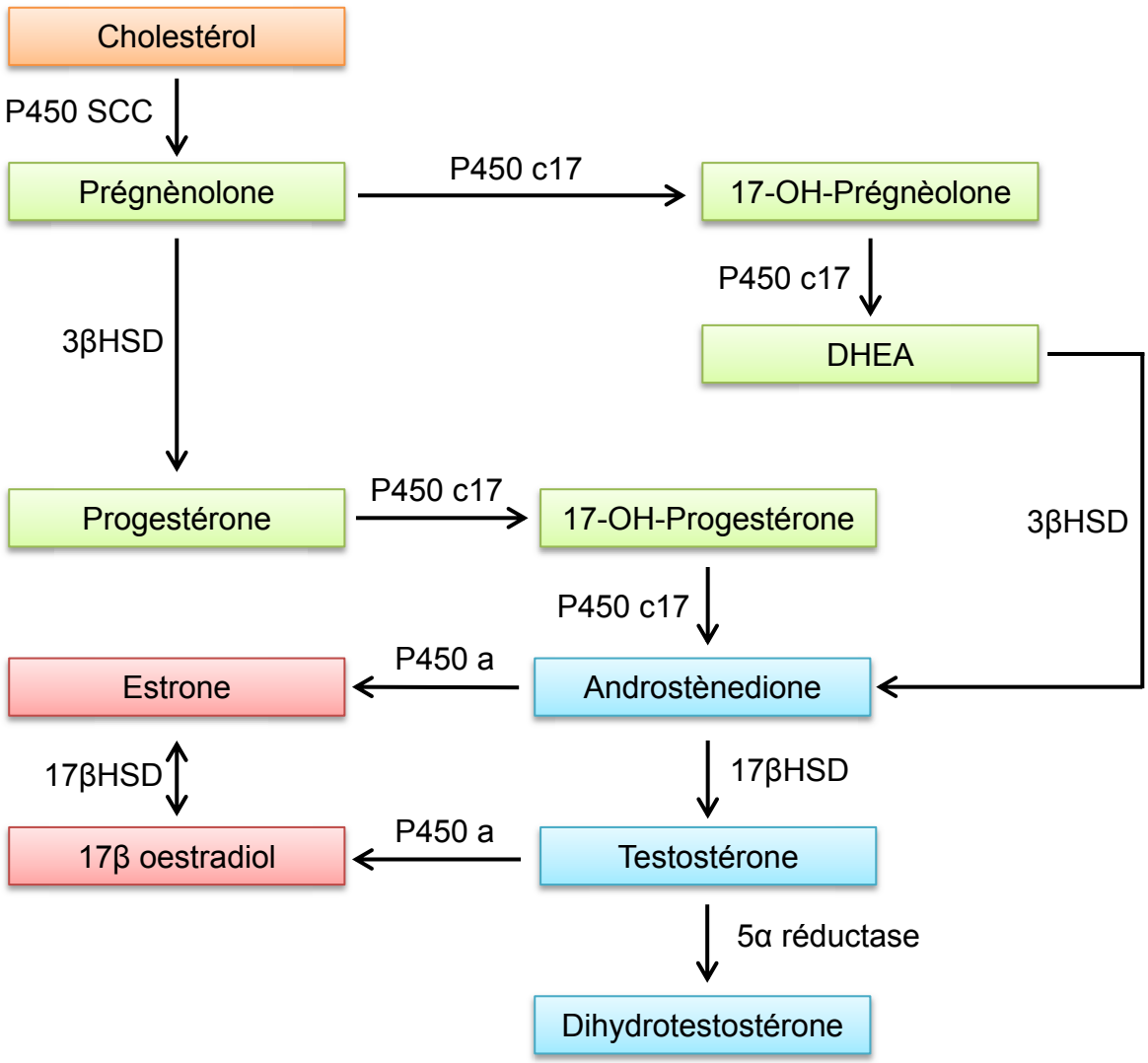
Au contact du fluide épididymaire dont la composition est finement régulée tout au long de l'organe, les spermatozoïdes vont subir un remodelage complet de leur surface en termes de sucres, de lipides et de protéines. Il s'agit de la partie la plus complexe de la maturation épididymaire qui nous intéresse plus particulièrement et qui sera traitée de manière exhaustive dans la partie suivante (I-C).

### *5- Régulation des fonctions épididymaires*

Les fonctions épididymaires sont complexes, variées et particulières en chaque point de l'organe. Elles doivent être finement régulées pour assurer une maturation gamétique adéquate. La régulation de ces fonctions fait appel à un réseau complexe de molécules biochimiquement très variées, qui vont agir au niveau des cellules épithéliales afin de réguler l'expression de gènes cibles et par conséquent agir sur la physiologie de l'organe. Selon l'origine de ces molécules on distingue les facteurs endocrines, arrivant par voie systémique, les facteurs lumicrines, véhiculés par le canal épididymaire et les facteurs paracrines et/ou autocrines produits par des cellules avoisinantes ou la cellule elle-même (**Figure 7**). Voici un bref aperçu de ces facteurs.

#### a) Les facteurs endocrines

<u>Les androgènes</u> : l'action de ces hormones, et notamment la testostérone arrivant à la fois par voie sanguine et par le fluide testiculaire, est médiée par la 5α-dihydrotestostérone, ou DHT, obtenue après conversion de la testostérone par la 5α-réductase I et II principalement au niveau du segment initial (Robaire and Hermo, 1988) - **Figure 8**). La DHT agit *via* le récepteur aux androgènes AR, fortement exprimé dans les cellules épithéliales de la tête de l'épididyme, qui va alors réguler l'expression de ses gènes cibles. L'importance des androgènes dans le maintien des fonctions épididymaires a été déterminée après castration, celle-ci entraînant une involution




**<u>Figure 8</u> : Voies de synthèse des œstrogènes et de la dihydrotestostérone.**

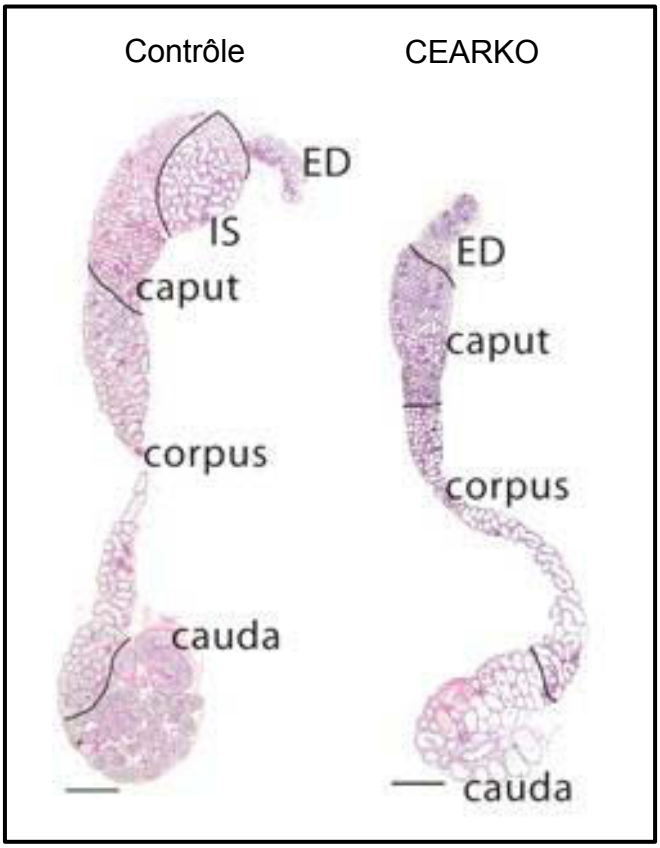
P450 SCC : 20,22-desmolase. P450 c17 : Stéroïde 17 α-hydroxylase/17,20 lyase. 3βHSD : 3β-Hydroxystéroïde déshydrogénase. 17βHSD : 17β-Hydroxystéroïde déshydrogénase. P450 a : Aromatase. DHEA : déhydroépiandrostérone.

drastique de l'épididyme (Smithwick and Young, 2001), une diminution de la hauteur des cellules épithéliales et du diamètre des tubules ainsi qu'une perte des microvillosités au pôle apical des cellules principales (Moore and Bedford, 1979). Enfin, l'invalidation du récepteur des androgènes AR dans la tête de l'épididyme prévient la formation du segment initial et entraîne une diminution de la hauteur de l'épithélium épididymaire dans le reste de la tête (O'Hara et al., 2011) - **Figure 9**). De plus, la perte des muscles lisses entourant les tubules entraîne une accumulation de spermatozoïdes dans les canaux efférents et la pression qui en résulte provoque la destruction des tubes séminifères. Les androgènes sont donc nécessaires au développement et au maintien de l'épididyme.

Les œstrogènes : chez le mâle, les œstrogènes sont synthétisés au niveau testiculaire sous forme de 17β-œstradiol dont l'action est médiée *via* la fixation au récepteur nucléaire ER. Les souris invalidées pour ER-α ont permis de montrer l'implication des œstrogènes dans la réabsorption du fluide au niveau de la tête de l'épididyme (Hess et al., 1997).

Les hormones corticosurrénaliennes : On retrouve dans l'épididyme la présence de récepteurs aux minéralocorticoïdes, suggérant un rôle de ces hormones dans la réabsorption d'eau et le contrôle de mouvements ioniques entre le fluide et les cellules épididymaires (Roy et al., 2013; Turner and Cesarini, 1983).

Les hormones thyroïdiennes : ces hormones (triiodothyronine T3 principalement) jouent un rôle important dans les fonctions épididymaires. L'hypothyroïdie conduit à une diminution du nombre et de la mobilité des gamètes ainsi qu'à une atteinte sévère de l'histologie de l'épididyme (del Rio et al., 1979). L'hyperthyroïdie entraîne également une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes ainsi qu'une altération de la composition en lipides épididymaires (Kumar et al., 1996).




**<u>Figure 9</u> : Morphologie de l'épididyme des souris invalidées pour AR (CEARKO).**

L'invalidation du récepteur des androgènes dans l'épididyme prévient la formation du segment initial. IS : segment initial. ED : canaux efférents. *O'Hara et al., 2011*.

### b) Les facteurs lumicrines

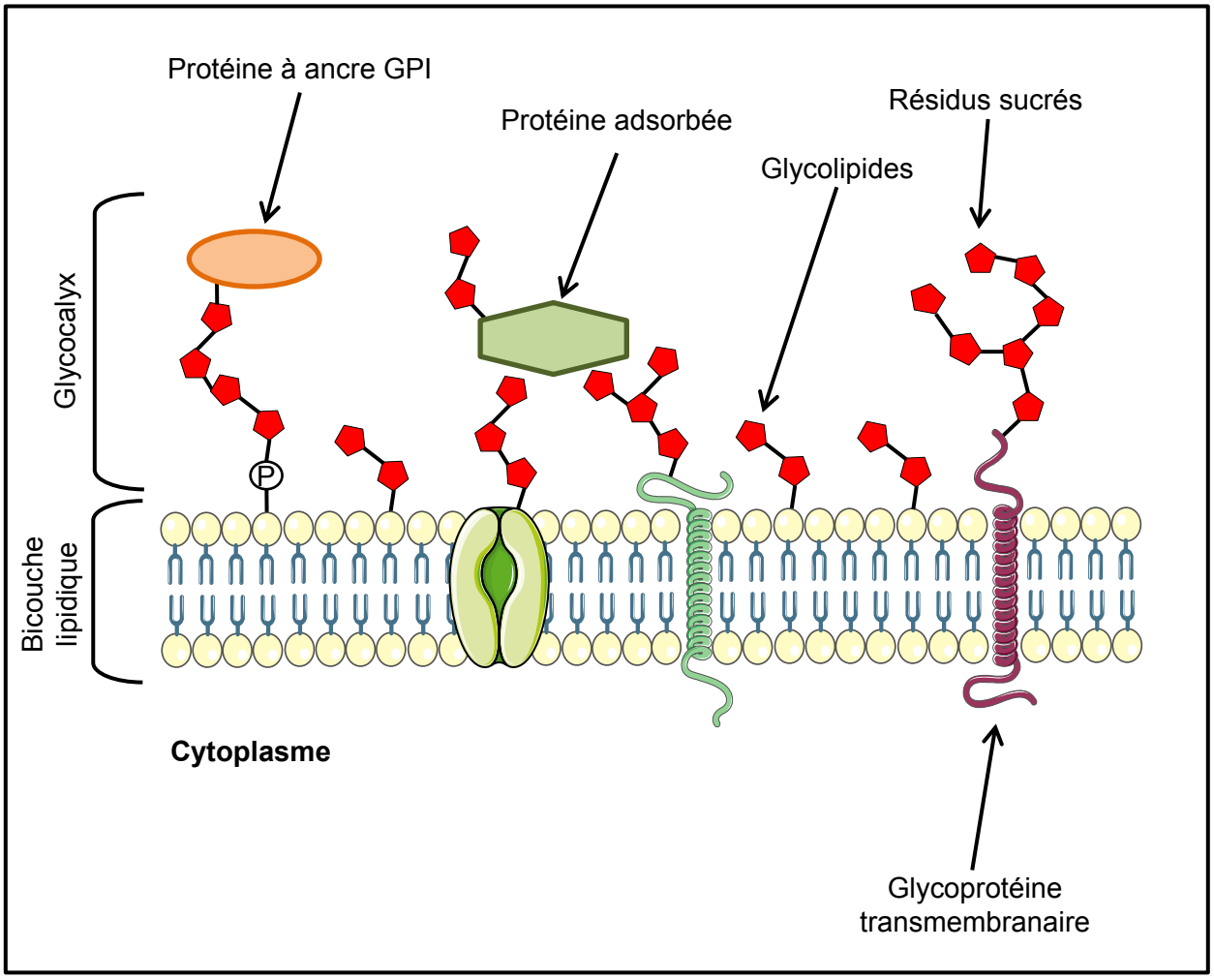
Ces facteurs sont produits en amont par les différents types cellulaires qui composent le testicule et sont acheminés à l'épididyme *via* le fluide luminal (Hinton et al., 1998). Ces facteurs sont très importants pour la physiologie de l'organe comme en témoignent des études réalisées après ligature des canaux efférents (Holland and Orgebin-Crist, 1988; Jones et al., 1980). Les auteurs observent notamment une forte diminution de la synthèse protéique dans l'épididyme. Parmi ces facteurs on retrouve les androgènes (Brooks, 1981) et de très nombreux facteurs de croissance (Abe et al., 1984).

### c) Les facteurs paracrines et/ou autocrines

Ces facteurs, très nombreux et variés, ne seront pas détaillés ici. On peut citer notamment le monoxyde d'azote (Srivastava et al., 2000, 2006), les EOR (Baker and Aitken, 2004), l'endothéline-1 (Peri et al., 1998) et les ions (Huang et al., 1992, 1993).

## C- Maturation biochimique du spermatozoïde au cours du transit épididymaire

Comme nous l'avons précisé précédemment, à l'issue de leur production dans le testicule les spermatozoïdes sont fonctionnellement immatures et incapables de féconder un ovocyte. De plus, le spermatozoïde ne peut assurer seul sa maturation puisqu'il est transcriptionnellement et traductionnellement inactif et donc absolument dépendant de son environnement pour assurer sa maturation. Une complète fertilité ne sera atteinte qu'à l'issue du transit épididymaire, au cours duquel la composition de la membrane plasmique va être profondément remaniée en termes de glycosylations, de lipides et de protéines. L'évolution de la dynamique membranaire et les nouvelles fonctions acquises confèreront au spermatozoïde tout son pouvoir fécondant.




**<u>Figure 10</u> : Représentation schématique du glycocalyx.**

Le glycocalyx est composé de glycoprotéines transmembranaires, de glycolipides, de protéines liées par des ancres GPI et de protéines associées par des interactions hydrophobes.

### *1- Les glycosylations*

Les gamètes mâles sont entourés d'un revêtement dense, riche en carbohydrates, de 20 à 60 nm d'épaisseur appelé le glycocalyx qui forme une véritable « forêt » moléculaire autour du spermatozoïde (Bearer and Friend, 1990). Ces résidus sucrés, liés à des protéines ou des lipides de la membrane plasmique pour former des glycoconjugués, fixent les protéines *via* les ancres GPI, ou sont superficiellement associés *via* des interactions hydrophobes (**Figure 10**). Une étude a révélé que 297 protéines spermatiques chez l'homme étaient N-glycosylées (Wang et al., 2013) témoignant de l'importance de cette modification post-traductionnelle.

#### a) Formation et fonctions du glycocalyx

Le glycocalyx se met en place au niveau testiculaire au cours de la spermatogénèse. Certains composants sont synthétisés par le spermatozoïde lui-même alors que d'autres sont assemblés ou produits par les cellules de Sertoli (Schröter et al., 1999). Par la suite, les modifications du glycocalyx seront assurées par l'environnement du gamète et en particulier l'épididyme, le spermatozoïde étant incapable de synthétiser *de novo* des glycanes.

Le glycocalyx mature permet au spermatozoïde de pénétrer le mucus cervical en conférant à la membrane spermatique une charge négative (Gilks et al., 1989; Tollner et al., 2008a). Ce revêtement permet également aux gamètes mâles d'être protégés du système immunitaire cellulaire et humoral présent dans l'utérus (Pandya and Cohen, 1985; Thompson et al., 1992). En effet le glycocalyx du spermatozoïde présente des acides sialiques dont les propriétés inhibitrices de la réponse immunitaire utérine ont été mises en évidence (Toshimori et al., 1991; Varki, 2011), et des N-glycanes fucosylés possédant une activité immuno-modulatrice dans l'utérus (Pang et al., 2007). En effet les glycanes vont « masquer » les antigènes présents sur le spermatozoïde et ainsi empêcher la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Les spermatozoïdes sont dépourvus de CMH de classe I et pourraient donc être lysés par les lymphocytes NK (Natural Killer). Là encore les glycanes, en masquant la surface du gamète, vont

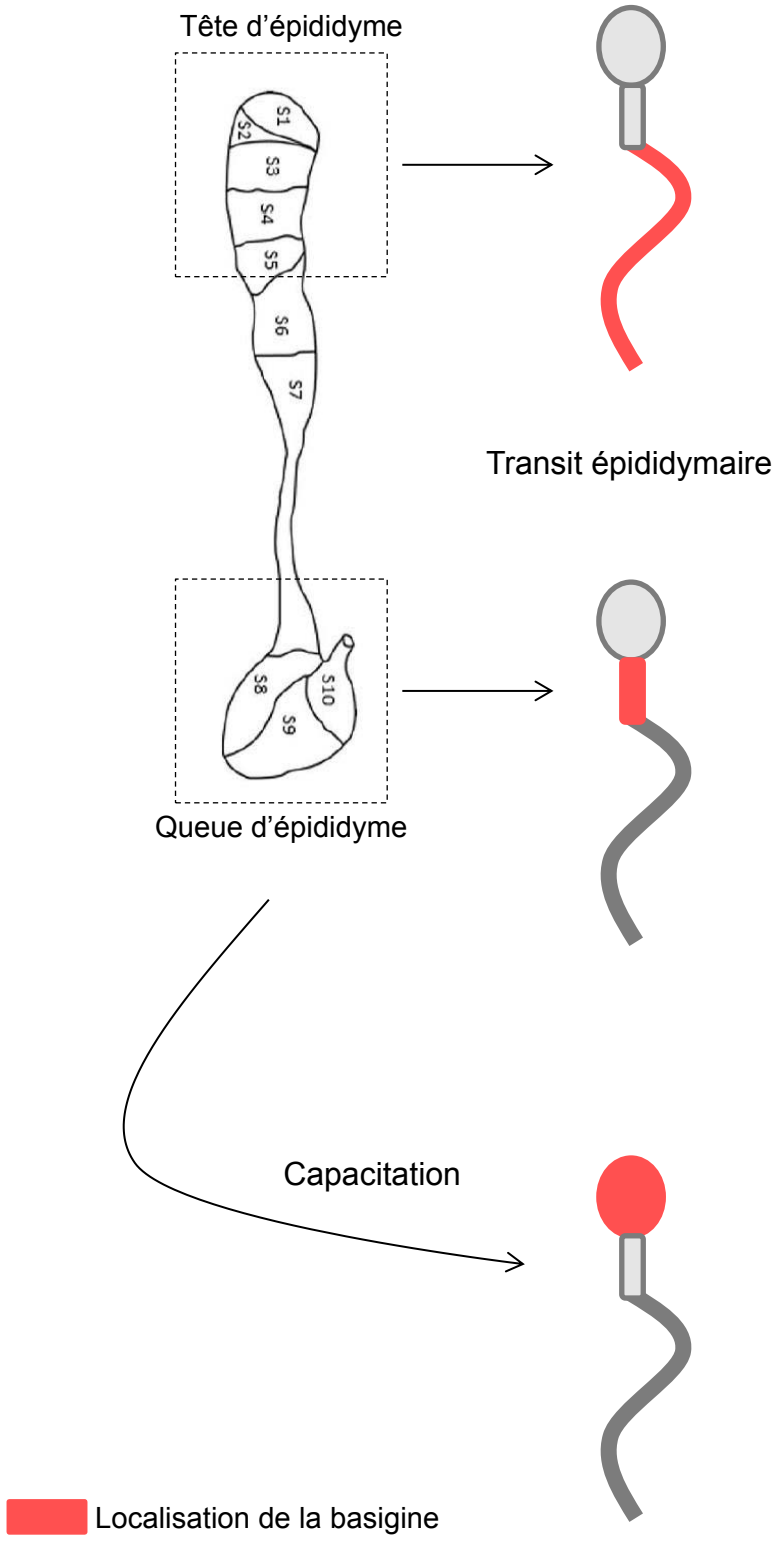
empêcher la reconnaissance par les cellules NK. Les interactions médiées par les glycanes sont également impliquées dans l'attachement des spermatozoïdes à l'épithélium oviductaire durant la formation du réservoir de spermatozoïdes chez les mammifères (Suarez and Pacey, 2006). Enfin, de nombreux auteurs ont également émis l'hypothèse que les glycanes seraient impliqués dans la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide (Diekman, 2003).

### b) Maturation épididymaire du glycocalyx

Après avoir été produit dans le testicule, le spermatozoïde immature doit subir de nombreuses modifications afin d'acquérir son pouvoir fécondant. L'épididyme a été décrit comme un site de haut métabolisme glycosidique extracellulaire impliquant l'activité sécrétoire des cellules principales (Schröter et al., 1999). L'épididyme est capable de transférer des glycoprotéines à ancre GPI sur le spermatozoïde, mais également de réaliser des modifications post-traductionnelles de glycosylations déjà en place *via* la sécrétion d'enzymes de type glycosyltransférase ou glycosidase (Tulsiani, 2006). Ces activités enzymatiques représentent à elles seules plus de 80% de l'activité enzymatique totale présente dans le fluide luminal épididymaire (Tulsiani et al., 1998). De plus, ces modifications sont très régulées tout le long de l'organe puisque les différentes enzymes vont suivre une certaine organisation spatiale entre la tête, le corps ou la queue de l'épididyme (Ram et al., 1989; Scully et al., 1987; Srivastava et al., 2000). Schröter parle alors d'organisation « en 4 dimensions » du glycocalyx, ajoutant la dimension temporelle (Schröter et al., 1999).

Afin d'illustrer l'importance de la maturation glycosidique au cours du transit épididymaire, voici quelques exemples de glycoprotéines acquises par le spermatozoïde ou modifiées dans l'épididyme :

<u>HE2</u> : *HE2* est un gène fortement exprimé dans l'épididyme proximal par les cellules principales et qui représente 0,2% des ARNm épididymaires chez l'homme (Kirchhoff et al., 1996; Osterhoff et al., 1994). HE2 est un petit polypeptide de 81 acides aminés comprenant de




**<u>Figure 11</u> : Relocalisation de la basigine au cours du transit épididymaire et de la capacitation.**

La basigine, initialement présente sur la pièce principale, est relocalisée vers la pièce intermédiaire au cours du transit épididymaire par l'action d'une glycosidase. Elle sera une nouvelle fois relocalisée au niveau de la tête au cours de la capacitation.

nombreuses O et N-glycosylations. Cette protéine reste fortement liée aux spermatozoïdes même après éjaculation. La présence d'un motif d'adhésion cellulaire dans sa structure primaire pourrait impliquer HE2 dans l'interaction ovocyte-spermatozoïde sans que cela soit démontré aujourd'hui (Schröter et al., 1999). Des études plus récentes ont montré que cette protéine pourrait avoir des propriétés antibactériennes et participer ainsi à la protection des spermatozoïdes dans le tractus génital mâle (von Horsten et al., 2002; Yenugu and Narmadha, 2010).

Basigine : la basigine (BSG) est une glycoprotéine (N-glycosylation) transmembranaire nécessaire au bon déroulement de la spermatogénèse. En effet les souris invalidées pour ce gène présentent une stérilité causée par l'absence de spermatozoïdes matures dans le testicule (arrêt de la spermatogénèse au début du stade spermatides rondes - (Bi et al., 2013). Au cours du transit épididymaire cette protéine va être maturée *via* l'action d'une glycosidase conduisant à la perte des N-glycanes. Cela entraîne sa relocalisation de la pièce principale vers la pièce intermédiaire entre la tête et la queue de l'épididyme (Saxena et al., 2002). Au cours de la capacitation cette protéine est à nouveau relocalisée, cette fois-ci vers la tête du spermatozoïde où elle semble être impliquée dans les évènements de liaison du spermatozoïde à la zone pellucide (Saxena et al., 2002) - **Figure 11**).

CD52 : CD52 est une petite protéine de 12 acides aminés à ancre GPI sécrétée par l'épithélium épididymaire au niveau du corps distal et de la queue (Kirchhoff and Schröter, 2001; Schröter et al., 1999). Cette protéine, qui porte de nombreux N et O-glycanes, est ensuite recrutée à la membrane plasmique du spermatozoïde *via* son ancre GPI (Diekman et al., 1999; Parry et al., 2007) et représente la glycoprotéine la plus importante du spermatozoïde (Schröter et al., 1999). CD52 a été appelée « *major maturation-associated sperm membrane antigen* » parce que sa liaison à la surface spermatique dans l'épididyme coïncide avec l'acquisition du pouvoir fécondant (mobilité et capacité à lier la zone pellucide - (Kirchhoff, 1996). Le rôle précis de cette glycoprotéine est aujourd'hui encore peu connu. Des auteurs ont émis l'hypothèse que la présence de CD52,

recouvrant tout le spermatozoïde et mise en place tardivement dans l'épididyme, pourrait servir à masquer d'autres molécules de la membrane plasmique qui ne devront être exposées ou modifiées que plus tard au cours de la maturation spermatique (Schröter et al., 1999). Enfin, durant la capacitation *in vitro*, une certaine quantité de CD52 est perdue, suggérant que cette glycoprotéine pourrait représenter un facteur décapacitant (Della Giovampaola et al., 2001).

HE4 : HE4 est l'exemple d'une glycoprotéine qui a une relativement faible association avec le glycocalyx du spermatozoïde. Cette petite protéine N-glycosylée de 95 acides aminés est produite par l'épithélium épididymaire principalement dans le corps et la queue (Kirchhoff et al., 1991). Lorsque les spermatozoïdes sont incubés dans un milieu capacitant, cette glycoprotéine diffuse indiquant sa faible liaison au glycocalyx et ses possibles propriétés de facteur décapacitant (Schröter et al., 1999).

Bêta-Défensine 126 : la bêta-Défensine 126 (DEFB126) est associée au spermatozoïde lors du transit à travers le corps proximal de l'épididyme chez les primates (Belleannée et al., 2012). Cette protéine, ainsi que son homologue murin Defb22, est fortement amarrée dans la membrane plasmique du spermatozoïde, sous forme d'homodimère *via* des acides aminés hydrophobes (Tollner et al., 2012) et présente de très nombreuses O-glycosylations riches en acide sialique. Cette glycoprotéine est essentielle pour la fertilité, des études ont notamment montré que les acides sialiques présents sur DEFB126 étaient impliqués dans la pénétration du mucus cervical (Gilks et al., 1989; Tollner et al., 2008a). Une délétion du gène *DEFB126* chez l'homme, ayant pour conséquence une diminution de la quantité de O-glycanes présents sur la protéine, entraîne une diminution de la fertilité (Tollner et al., 2011). Les spermatozoïdes de ces hommes présentent une morphologie et une mobilité normales, mais sont incapables de traverser le mucus du tractus génital féminin. Cette glycoprotéine participe également à la formation du réservoir spermatique au niveau de l'isthme tubaire (Tollner et al., 2008b) ainsi qu'à l'immunoprotection du spermatozoïde dans les voies génitales féminines (Yudin et al., 2005).

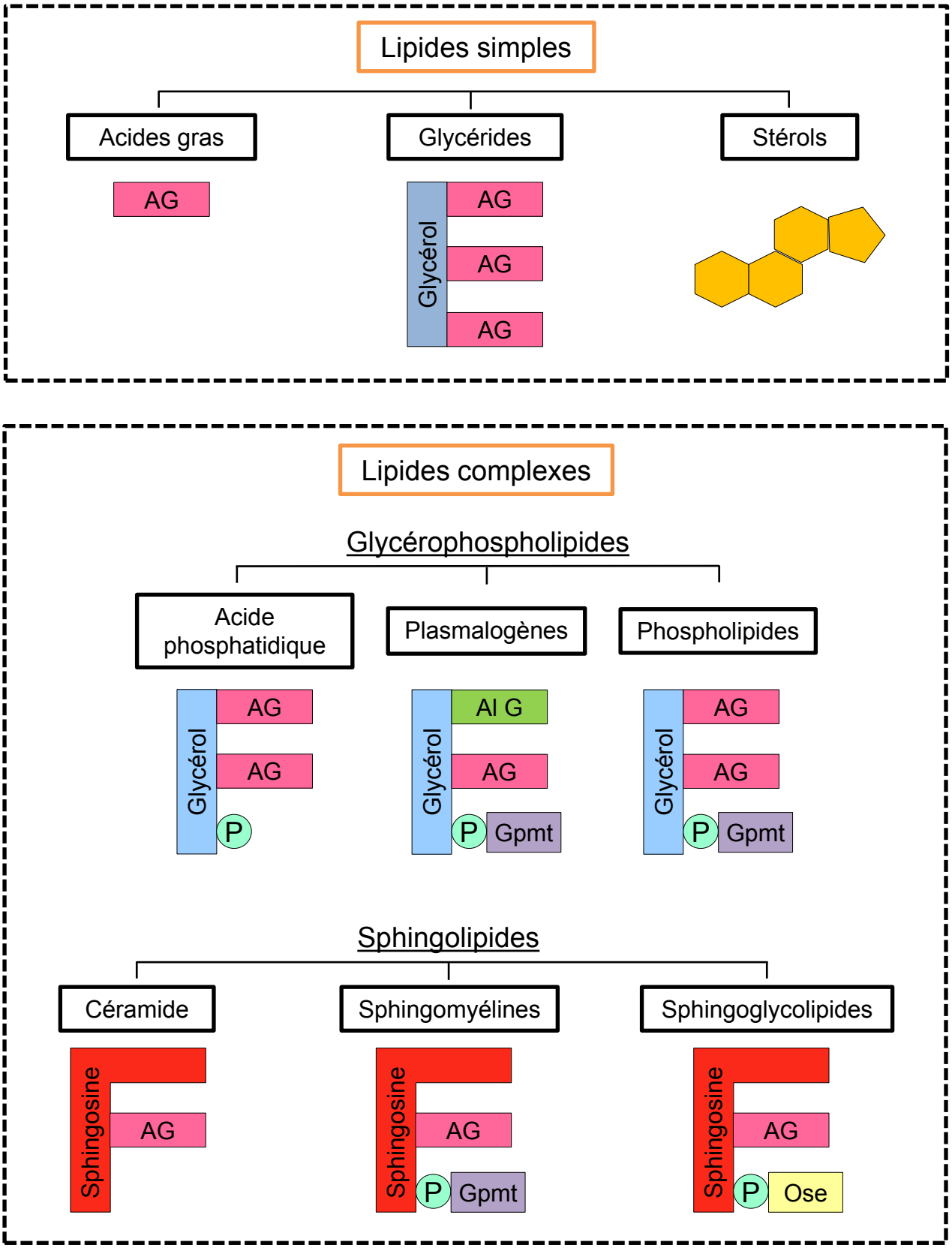



**Figure 12 : Classification des lipides.**

On distingue les lipides simples qui englobent les acides gras, les glycérides et les stérols, des lipides complexes regroupant les glycérophospholipides et les sphingolipides.

AG : acides gras, Al G : Alcool gras, P : groupement phosphate, Gpmt : groupement pouvant être sérine, éthanolamine, choline, inositol.

L'intérêt du glycocalyx n'est plus à démontrer aujourd'hui bien que de nombreuses zones d'ombre subsistent. La nécessité des modifications épididymaires des glycanes spermatiques pour assurer la fertilité met en évidence l'importance de la maturation épididymaire pour l'acquisition du pouvoir fécondant. Cette importance est renforcée au vu des autres modifications biochimiques qu'assure l'épididyme.

### *2- Les lipides*

Les spermatozoïdes, comme toute cellule animale, présentent une membrane plasmique composée d'une bicouche lipidique. Les composants lipidiques de cette bicouche sont les mêmes que ceux retrouvés dans une cellule somatique avec toutefois des particularités quant à leurs représentations et proportions, conférant à la membrane plasmique spermatique des propriétés uniques.

#### a) Les différentes classes de lipides et leurs représentations dans la membrane spermatique

Il n'existe pas de classification unique des lipides, du fait de leur diversité et de la difficulté à adopter une définition universelle, ainsi nous détaillerons ici uniquement les lipides présentant un intérêt pour la fonction de la membrane plasmique spermatique. De manière simple, on peut distinguer les lipides simples ou neutres qui englobent les glycérides, les acides gras et les stérols, des lipides complexes qui comprennent les glycérophospholipides (phospholipides, plasmalogènes) et les sphingolipides (céramides, sphingomyéline, gangliosides - **Figure 12**).

##### a-1) Les lipides simples

- <u>Les acides gras</u>

Les acides gras (AG) sous forme libre sont des constituants mineurs des membranes puisqu'ils sont généralement retrouvés sous forme d'esters et associés à la partie polaire d'autres

lipides. Ils peuvent être saturés (SFA), mono-insaturés (MUFA) ou polyinsaturés (PUFA) selon la présence et le nombre de double liaisons dans la chaîne carbonée.

Les AG membranaires sont importants pour la mobilité spermatique, la viabilité et les processus de fusion entre le spermatozoïde et l'ovocyte (Lenzi et al., 1996). La composition en AG du gamète mâle est particulière car cette cellule possède de fortes quantités de PUFA (Ladha, 1998; Neill and Masters, 1973), une particularité que l'on retrouve uniquement dans la rétine (Wiegand and Anderson, 1983) et certaines régions du cerveau (Breckenridge et al., 1972), c'est-à-dire dans des cellules hautement spécialisées dans la transduction du signal et l'interaction cellule-cellule. Cette composition particulière en PUFA semble jouer un rôle dans les évènements de fusion membranaire (réaction acrosomique notamment) qui ont lieu durant le processus de fécondation, les PUFA étant connus pour contribuer à la fluidité et la flexibilité membranaires (Fleming and Yanagimachi, 1984; Meizel and Turner, 1983). Chez l'homme les proportions des différents types d'AG ont été décrites comme suit : 45% de SFA, 15% de MUFA et 40% de PUFA (Aksoy et al., 2006; Martínez-Soto et al., 2013; Tavilani et al., 2006). Dans ces différents articles le PUFA majoritaire décrit est l'acide docosahéxaénoïque (DHA, C22:6 ω-3), qui est l'AG le plus insaturé et l'un des plus long (Wassall and Stillwell, 2009). Chez la souris les proportions décrites sont équivalentes mais les PUFA majoritaires sont l'acide arachidonique (AA, C20:4 ω-6) et l'acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5 - (Rejraji et al., 2006; delBarco-Trillo et al., 2015). La forte proportion en PUFA, en particulier en DHA, est importante pour la fertilité. En effet, une étude a montré une diminution de ce type d'AG chez des hommes asthénozoospermiques comparés à des normozoospermiques (Tavilani et al., 2006). Une autre étude a également mis en évidence une corrélation négative entre l'indice de masse corporelle (IMC) et le DHA, ainsi qu'une corrélation positive entre le DHA et les paramètres spermatiques normaux (numération, viabilité, mobilité, morphologie des spermatozoïdes - (Andersen et al., 2016). De plus contrairement à une idée ancienne (Jones et al., 1978), il semble que la forte présence de PUFA ne rende pas les cellules plus susceptibles à la peroxydation lipidique, puisqu'une étude a montré

que cette corrélation n'était pas toujours observée (Kelley et al., 2014) et chez l'homme le DHA spermatique est négativement corrélé avec le DFI (DNA Fragmentation Index - (Andersen et al., 2016).

- Les stérols

Les stérols sont les deuxièmes composants majoritaires de la membrane plasmique. Le cholestérol est le stérol le plus abondamment retrouvé dans la membrane spermatique de nombreuses espèces (Ladha, 1998). Chez l'homme il représente 60 à 70% des stérols spermatiques (Osheroff et al., 1999; Sion et al., 2001) et 60% chez la souris (Visconti et al., 1999a). Les spermatozoïdes sont enrichis en cholestérol dans les tubes séminifères, en effet, au stade spermatocyte, les cellules germinales sont capables de synthétiser *de novo* du cholestérol afin de permettre l'augmentation de leur surface membranaire (Potter et al., 1981). Les cellules de Sertoli participent également à cette augmentation en fournissant aux spermatozoïdes en formation du cholestérol synthétisé *de novo* ou issu de la circulation sanguine (Akpovi et al., 2006; Wiebe and Tilbe, 1979). Dans une moindre mesure, du sulfate de cholestérol est également retrouvé, le rôle de ce dernier sera discuté par la suite.

Les membranes spermatiques se distinguent par la proportion significative de desmostérol (un intermédiaire de la voie de biosynthèse du cholestérol) qu'elles contiennent (Keber et al., 2013). Cette proportion varie selon les espèces et représente 17 à 35% des stérols totaux spermatiques chez l'homme (Sion et al., 2001) et jusqu'à 40% chez la souris (Visconti et al., 1999a). Certaines espèces, comme le macaque rhésus, possèdent même plus de desmostérol que de cholestérol (Lin et al., 1993). Cette étonnante proportion de desmostérol pourrait être due à la faible expression de l'enzyme *Dhcr24* (24-Déhydrocholestérol réductase) dans le testicule (Shima et al., 2004), enzyme permettant de convertir le desmostérol en cholestérol, ou bien à une inhibition de cette enzyme (Keber et al., 2013).

Plus récemment la présence d'oxystérols a été décrite chez plusieurs espèces telles que le bovin (Brouwers et al., 2011), ainsi que le porc et la souris (Boerke et al., 2013). Ces dérivés

oxydés du cholestérol pourraient influer sur la fluidité membranaire et sur la disponibilité du cholestérol (Bielska et al., 2014).

La composition en stérols de la membrane spermatique est finement régulée, en effet les stérols jouent un rôle primordial dans l'organisation structurale de la membrane, sa dynamique ainsi qu'au cours de la capacitation. Ces sujets seront développés ultérieurement.

### a-2) Les lipides complexes

- Les glycérophospholipides

L'unité de base des glycérophospholipides est l'acide phosphatidique, composé d'un glycérol sur lequel se fixent deux acides gras et un acide phosphorique. Les différentes classes se déclinent ensuite selon la nature de l'alcool qui estérifie l'acide phosphatidique : sérine (PS), éthanolamine (PE), choline (PC) ou inositol (PI). Ces phospholipides sont les constituants majoritaires de toute membrane plasmique. Dans cette classe se retrouve également les plasmalogènes qui, à la différence des phospholipides précédents, présentent un alcool gras (et non un acide gras) fixé au premier carbone du glycérol *via* une liaison vinyl-éther. Les plasmalogènes sont particulièrement abondants dans les tissus excitables tels que le cerveau et le cœur (Lessig and Fuchs, 2009) et auraient, entre autre, un rôle d'antioxydant endogène.

Les phospholipides (PL) sont l'unité de base de toute membrane biologique. Les proportions des différents PL peuvent cependant varier d'un type cellulaire à l'autre. Les gamètes mâles contiennent en majorité des phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamine (Parks and Lynch, 1992). La principale différence observée entre les phospholipides d'une membrane plasmique classique et ceux d'une membrane spermatique concerne les acides gras qui composent ces phospholipides. En effet, les phospholipides qui composent la membrane plasmique spermatique sont fortement constitués de PUFA. La polyinsaturation de ces AG confère à la membrane des propriétés de fluidité et de flexibilité, la rendant extrêmement sensible aux stimuli externes et facilement déstabilisable, des caractéristiques permettant au spermatozoïde d'assurer la fécondation (Gadella et al., 2008). La membrane plasmique spermatique contient également

une grande proportion de plasmalogènes, fortement insaturés (Gorgas et al., 2006). Environ 2/3 des PE et PC membranaires sont sous forme de plasmalogènes (Evans et al., 1980). Les souris mâles invalidées pour la *Dhapat* (dihydroxyacétone-phosphate-acyltransférase), une enzyme impliquée dans la synthèse des plasmalogènes, sont stériles, démontrant l'importance de cette classe de glycérophospholipides dans la fertilité (Gorgas et al., 2006). Bien que leur rôle exact dans la physiologie du gamète mâle soit encore peu connu, les plasmalogènes semblent impliqués dans la formation de macro- et micro-domaines requis pour la spermatogénèse et la compartimentalisation de la membrane (Ladha, 1998; Martínez and Morros, 1996).

- Les sphingolipides

Ce sont des lipides complexes composés d'une molécule de sphingosine sur laquelle est fixé un AG par une liaison amide, et un autre groupement qui déterminera le type de sphingolipide. La sphingomyéline (SPM) est un sphingolipide constitué d'une céramide à laquelle est lié, *via* une liaison phosphodiester, un résidu choline ou éthanolamine. De ce fait la sphingomyéline peut aussi être considérée comme un glycérophospholipide. La sphingomyéline représente 10 à 15% des lipides spermatiques totaux (Ladha, 1998) et, dans les spermatozoïdes de nombreuses espèces, elle est très souvent associée avec des acides gras insaturés à très longue chaîne (*very long chain* –VLCPUFA - (Furland et al., 2007). Cette composition particulière en sphingomyéline participe à la structuration de la membrane car la SPM est étroitement liée au cholestérol. De plus la SPM semble impliquée lors du processus de capacitation au cours duquel elle est dégradée en céramide par une sphingomyélinase (Furland et al., 2007).

La composition lipidique des spermatozoïdes revêt une grande importance au cours de la capacitation et des évènements de fusion membranaire ayant lieu au cours de la fécondation. A l'issue du testicule la composition lipidique de la membrane spermatique n'est pas définitive puisqu'elle va subir de nombreux changements au cours du transit épididymaire.

### b) Maturation épididymaire de la composition lipidique des spermatozoïdes

Le contenu total en lipides de la membrane spermatique diminue au cours du transit épididymaire mais ne touche pas chaque classe de lipides de manière équivalente (Ladha, 1998).

- Les acides gras

On observe pour la majorité des espèces une diminution de la présence des AG saturés et mono-insaturés et une augmentation des PUFA (Ladha, 1998). On note notamment chez la souris une augmentation du DHA et du DPA, constituant les acides gras majoritairement retrouvés (Rejraji et al., 2006). Chez l'homme ces données sont difficiles à obtenir, mais une étude rapporte une augmentation de la proportion de PUFA comme chez la souris (Haidl and Opper, 1997).

- Les stérols

La modification la plus importante au cours du transit épididymaire chez la quasi-totalité des mammifères est la perte de cholestérol (Keber et al., 2013), avec une diminution significative de 50% chez la souris (Rejraji et al., 2006). Chez le verrat le contenu en cholestérol n'est pas modifié au cours du transit épididymaire (Nikolopoulou et al., 1985). En revanche, dans cette espèce le contenu en desmostérol augmente, un paramètre également retrouvé chez le hamster (Awano et al., 1993). Aucune information n'est disponible quant à l'évolution du contenu en oxystérols au cours du transit épididymaire. Cependant, ceux-ci étant générés en partie par la présence des EOR, leur présence devrait augmenter au cours du passage à travers l'épididyme (Aitken, 2011). Enfin des études ont montré que, au cours du transit épididymaire, les spermatozoïdes étaient fortement chargés en sulfate de cholestérol, au niveau de la tête et de la pièce intermédiaire (Langlais et al., 1981; Legault et al., 1979). Le sulfate de cholestérol pourrait être impliqué dans l'inhibition des réactions acrosomiques prématurées.

- Les phospholipides et sphingolipides

Le contenu en phospholipides des gamètes mâles va diminuer entre la tête et la queue de l'épididyme, allant de 29% chez le bélier à 54% chez le rat (Jones, 2002). Les différentes classes ne sont pas également touchées, on observe notamment une diminution sélective des PE, PI et PS au profit de la PC et de la SPM (Nikolopoulou et al., 1985; Okamura et al., 1999; Rejraji et al., 2006). Chez l'homme peu de données sont disponibles, une étude a toutefois montré une augmentation du contenu en PC pour les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme, au détriment des autres classes de phospholipides (Haidl and Opper, 1997).

### c) Conséquences de la maturation épididymaire sur la dynamique membranaire

La modification des différentes classes de lipides au cours du transit épididymaire conduit à augmenter la fluidité membranaire du spermatozoïde. En effet, compte tenu des propriétés intrinsèques de ces différents lipides et du fait qu'ils ne sont pas modifiés de manière équivalente au cours de la descente dans l'épididyme, la dynamique membranaire va évoluer.

Chez l'homme, au cours du transit épididymaire, les modifications décrites précédemment conduisent à une diminution du ratio cholestérol/phospholipides, une augmentation du ratio PC/SPM+PS+PE et une diminution du ratio SFA/PUFA (Haidl and Opper, 1997). La modification de ces ratios concourt à augmenter la fluidité membranaire des spermatozoïdes.

Chez la souris, les observations réalisées sont un peu différentes mais conduisent au même résultat. Les ratios cholestérol/phospholipides et PE/PC ne varient pas significativement alors que le ratio SFA/PUFA diminue fortement entre la tête et la queue de l'épididyme (Rejraji et al., 2006). Là encore ces modifications entraînent une augmentation de la fluidité membranaire comme cela a été démontré par technique de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching* - (Christova et al., 2002). Des observations similaires ont été faites pour la majorité des

mammifères (Aveldaño et al., 1992; Evans and Setchell, 1979; Parks and Hammerstedt, 1985; Poulos et al., 1973; Rana et al., 1991).

Malgré l'importance évidente des modifications de composition lipidique au cours du transit épididymaire, les mécanismes à l'origine de ces modifications sont mal connus. Des pistes et hypothèses ont toutefois été proposées. Tout d'abord, une modification du régime alimentaire en acide gras ou en cholestérol a des répercussions sur la composition des gamètes mâles (Gliozzi et al., 2009; Mitre et al., 2004; Saez Lancellotti et al., 2010). Ces résultats suggèrent clairement qu'il existe des mécanismes de transport entre la circulation sanguine et la lumière épididymaire (Saez et al., 2011). De plus il a été démontré que des protéines transportant le cholestérol étaient présentes dans le fluide épididymaire (Keber et al., 2013). La protéine HE1, découverte chez l'homme, est spécifiquement exprimée dans l'épididyme (Kirchhoff et al., 1991). L'homologue de cette protéine chez le porc a été purifiée du fluide épididymaire et les auteurs ont montré qu'elle était capable de lier le cholestérol (Okamura et al., 1999). Au-delà de ces protéines pouvant être impliquées dans le transport des lipides, des études ont montré que des enzymes secrétées dans le fluide épididymaire étaient capables de modifier la composition lipidique des spermatozoïdes. Les phospholipases $A_2$ sont des enzymes qui hydrolysent la position sn-2 d'un phospholipide libérant un acide gras et un lysophospholipide. Les souris invalidées pour *Pla2g3* (codant l'expression de l'enzyme $PLA_2$ secrétée de groupe III – $sPLA_2$-III) sont hypofertiles avec une diminution du nombre de petits par portée et une diminution du taux de fécondation *in vitr*o en présence de la zone pellucide (Sato et al., 2010). Les auteurs ont montré que cette enzyme était secrétée dans le fluide épididymaire au niveau de la tête de l'organe. Dans ce modèle, seul la maturation épididymaire est altérée et les gamètes présentent des défauts morphologiques, une forte diminution de la mobilité et une composition lipidique anormale. En effet, la proportion de PC contenant de l'acide oléique, linoléique ou arachidonique diminue moins que chez le sauvage entre la tête et la queue de l'épididyme. De plus, l'augmentation des PUFA tels que la DPA et la DHA est moins importante au cours du transit épididymaire que chez le sauvage. Cette étude a

| AG / Membrane | SFA | PUFA | SFA/PUFA |
|---|---|---|---|
| Epididymosomes Tête | 48,4 | 38,9 | 0,94 |
| Epididymosomes Queue | 61,3 | 27,6 | 1,84 |
| **Evolution T/Q** | ↗ | ↘ | ↗ |
| Spermatozoïdes Tête | 49 | 38,3 | 0,96 |
| Spermatozoïdes Queue | 46,3 | 41,2 | 0,86 |
| **Evolution T/Q** | ↘ | ↗ | ↘ |

**<u>Figure 13</u> : Evolution de la composition en acides gras des épididymosomes et des spermatozoïdes entre la tête et la queue de l'épididyme.**

La quantité en acides gras saturés et polyinsaturés évolue en sens inverse entre la tête et la queue de l'épididyme pour les épididymosomes et les spermatozoïdes (les résultats sont présentés en pourcentage d'AG totaux).

AG : acides gras, SFA : acides gras saturés, PUFA : acides gras polyinsaturés, T : tête de l'épididyme, Q : queue de l'épididyme. Réalisé d'après *Rejraji et al., 2006*.

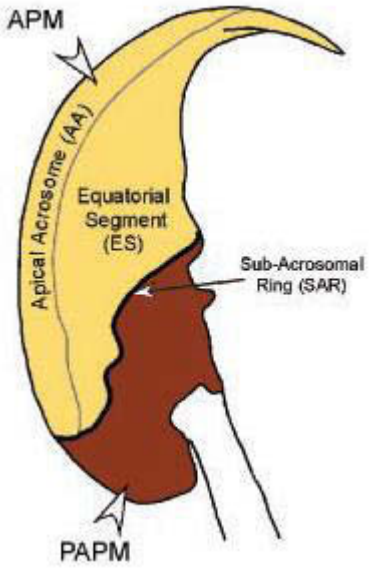
permis de démontrer que la sPLA2-III agissait de manière paracrine sur la maturation des gamètes au cours du transit épididymaire entraînant une augmentation des PUFA. Ces résultats soulignent l'importance de la maturation épididymaire lipidique des gamètes dans l'acquisition du pouvoir fécondant. Enfin l'épithélium épididymaire émet de petites vésicules lipidiques, les épididymosomes, qui sont connus pour participer à la maturation protéique des spermatozoïdes. Des auteurs suggèrent que ces vésicules pourraient également participer à la maturation lipidique. En effet, chez la souris la fluidité membranaire des épididymosomes évolue de manière inverse à celle des spermatozoïdes entre la tête et la queue de l'épididyme, pouvant suggérer que les épididymosomes réalisent des échanges de lipides avec les gamètes mâles (Rejraji et al., 2006) - **Figure 13**). Cependant ceci n'a jamais été démontré directement.

### d) Structure de la membrane spermatique

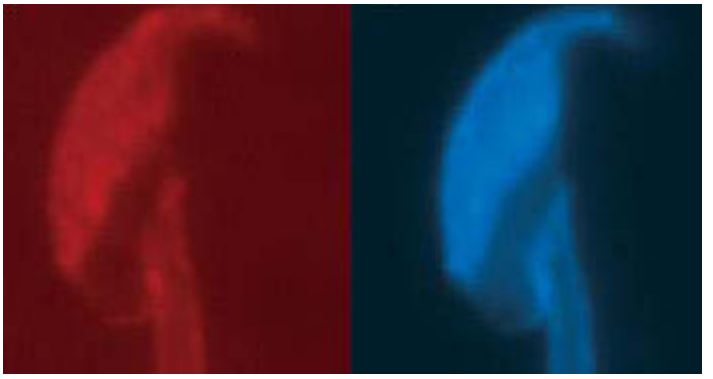
Les modifications lipidiques décrites au cours de la maturation épididymaire sont essentielles pour l'acquisition des propriétés fécondantes. Les études réalisées sur le sujet sont basées sur des dosages lipidiques qui sont représentatifs de la totalité du spermatozoïde. Or l'organisation des lipides sur le gamète n'est pas homogène, ce qui complique encore les mécanismes à l'origine de la maturation lipidique au cours du transit épididymaire puisque celle-ci ne peut se faire au hasard sur le gamète.

L'organisation lipidique de la membrane spermatique est complexe notamment au niveau de la tête. En effet, celle-ci est divisée en plusieurs domaines (**Figure 14-A**). L'APM (*Acrosomal Plasma Membrane*) recouvre la région de la tête où se situe l'acrosome, le reste de la membrane plasmique de la tête étant appelé PAPM (*Post-Acrosomal Plasma Membrane*). L'APM est également divisé en deux sous-domaines d'après leur structure et leur fonction : l'AA (*Apical Acrosome*) est la région où a lieu la fusion entre la membrane plasmique et la membrane acrosomale. L'ES (*Equatorial Segment*) correspond au reste de l'APM. L'APM et le PAPM sont séparés par le SAR (*Sub-Acrosomal Ring*), une structure dense de cytosquelette. Cette compartimentation est basée sur

A




B



**<u>Figure 14</u> : L'organisation lipidique de la tête spermatique.**

A- La tête du spermatozoïde murin se divise en plusieurs domaines : la membrane plasmique acrosomale (APM) subdivisée en acrosome apical (AA) et segment équatorial (ES) et la membrane plasmique post-acrosomale (PAPM), toutes deux séparées par l'anneau sub-acrosomal (SAR). D'après *Selvaraj et al., 2009*.

B- Marquage des GM1 (ganglioside M1 fortement présents dans les radeaux lipidiques) à la CTB (cholera-toxin B subunit) couplée à l'Alexa fluor® 647 (rouge) et localisation des stérols par marquage avec une sonde filipine (bleue). L'APM est riche en GM1 et en stérols. D'après *Selvaraj et al., 2006*.

la fonction de ces domaines mais également sur leur composition. En effet l'APM est très riche en stérols et GM1 (Ganglioside M1) contrairement au PAPM (**Figure 14-B**). La membrane plasmique qui recouvre l'acrosome est elle-même hétérogène puisque composée d'une multitude de radeaux lipidiques (rafts) qui lui confèrent cette composition particulière en lipides. En fait, l'APM du spermatozoïde est un exemple extrême de plateforme lipidique en termes de stabilité et de taille. Dans le gamète mâle cette ségrégation lipidique est maintenue par la présence du SAR. Cet anneau agit comme une barrière sélective laissant diffuser des molécules simples dans la bicouche lipidique entre l'APM et le PAPM, mais bloquant fermement les stérols, GM1 et complexes lipides/protéines. Ainsi les radeaux lipidiques sont confinés dans l'APM (Selvaraj et al., 2006, 2009; Travis et al., 2001). Compte tenu du fait que le spermatozoïde est transcriptionnellement et traductionnellement inactif, cette ségrégation pourrait être nécessaire pour organiser des voies de signalisation cellulaire préassemblées dans des compartiments spécifiques au sein desquels elles pourront assurer une fonction spécifique le moment venu. En effet il semble logique qu'une forte concentration en radeaux lipidiques, donc en protéines, concerne une région impliquée dans des phénomènes de reconnaissance et de fusion membranaire. Le flagelle présente aussi une hétérogénéité dans sa composition lipidique puisque l'annulus contient moins de stérols que la pièce intermédiaire ou la pièce principale, mais est par contre enrichi en GM1 (Lin and Kan, 1996; Selvaraj et al., 2007).

Au-delà de cette répartition particulière des radeaux lipidiques concentrés dans l'APM, une étude a également démontré qu'il existe plusieurs sous-types de radeaux lipidiques remettant en cause la vision dichotomique d'une membrane simplement divisée en région rafts et non-rafts. En général les rafts sont isolés simplement sur la base de leur insolubilité dans les détergents. Cependant ces DRM (*Detergent-Resistant Membrane*) ne sont pas uniquement composés de rafts, rendant cette approche insuffisante pour l'analyse précise de la composition des radeaux lipidiques spermatiques (Kusumi and Suzuki, 2005). Les auteurs ont donc développé une technique qui, après isolation des membranes, permet de séparer les vésicules membranaires

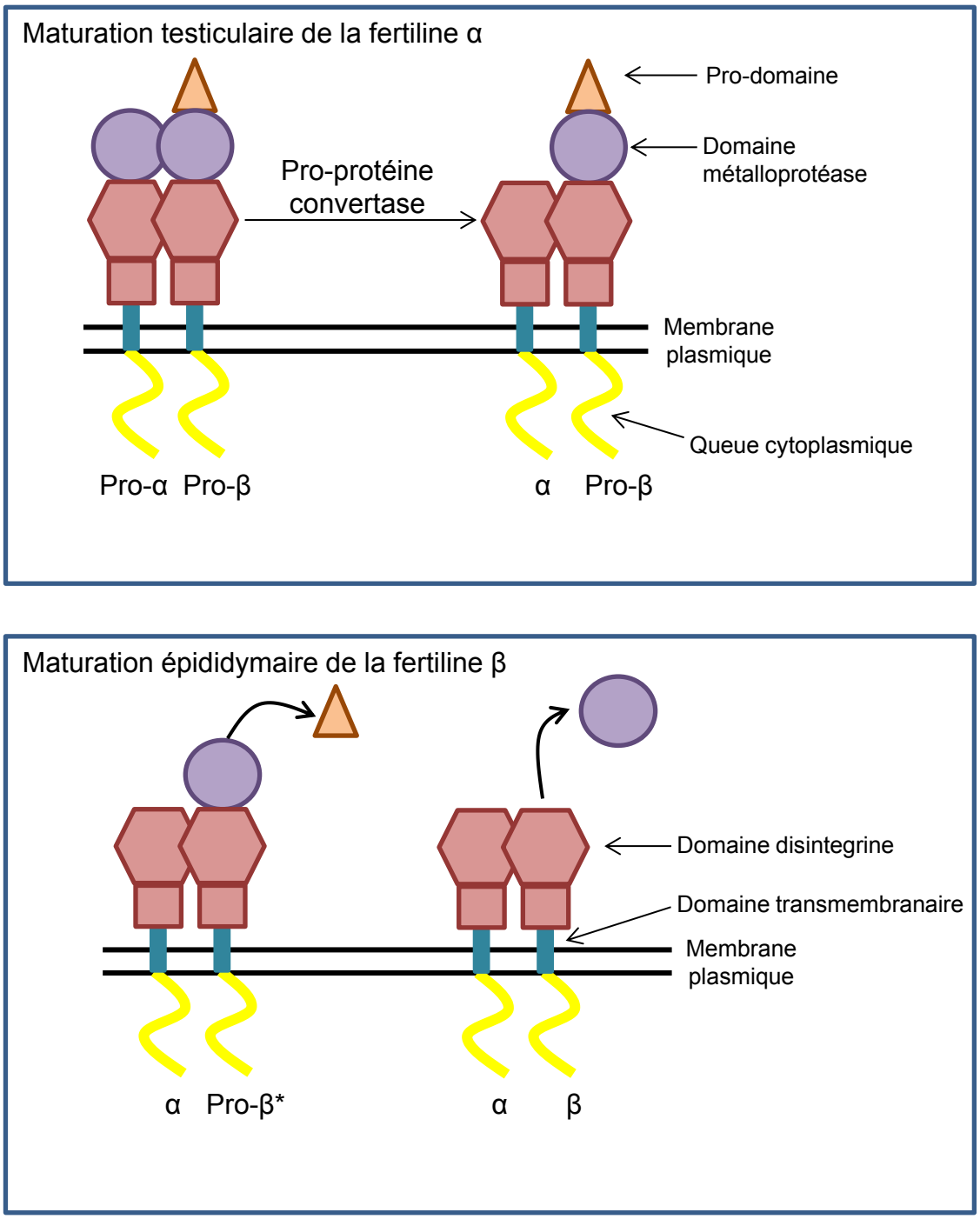
| Fractions | Protéines | Stérols | GM1 |
|---|---|---|---|
| 1-4 | +++ | ++ | ++ |
| 5 et 6 | + | ++ | - |
| 7 | + | + | + |
| 8 et 9 | + | - | - |

**<u>Figure 15</u> : Composition lipidique et protéique des trois sous-types de rafts et de la fraction non-raft des spermatozoïdes murins.**

La membrane des spermatozoïdes est fractionnée puis les vésicules membranaires sont séparées selon leur « flottabilité » sur un gradient de densité linéaire. Les différentes fractions sont caractérisées (+ ou -) selon leurs proportions relatives en ratio molaire (stérols ou GM1 *versus* phospholipides) ou ratio massique (protéines totales/lipides totaux). D'après *Asano et al., 2011*.

obtenues selon leur « flottabilité » sur un gradient de densité linéaire. Les différentes fractions obtenues ont été caractérisées selon leur ratio molaire en stérol et GM1 comparés aux phospholipides et selon un ratio massique de protéines/lipides totaux. Cette technique a permis de mettre en évidence l'existence de trois sous-populations de radeaux lipidiques présentant une composition reproductible en lipides et protéines (Asano et al., 2009) - **Figure 15**). La fraction 1-4 présente des ratios stérols/PL, GM1/PL et protéines/lipides élevés. La fraction 5-6 présente également un ratio stérols/PL élevé mais les ratios GM1/PL et protéines/lipides sont faibles. La fraction 7 possède un fort ratio GM1/PL mais l'enrichissement en stérols et protéines est faible. Enfin les fractions 8 et 9 correspondent aux régions non-rafts avec des faibles ratios stérols/PL, GM1/PL et protéines/lipides. Une étude protéomique a été réalisée sur les différentes fractions et quelques protéines ont été analysées. Ainsi il apparaît que la CA-4 (anhydrase carbonique 4) est enrichie dans les fractions 1-4 et 7, c'est-à-dire celles qui sont les plus riches en GM1. D'autres protéines comme CRISP-1 (*Cysteine Rich Secretory Protein-1*) sont enrichies dans les fractions 1-4 et 5, c'est-à-dire celles qui sont les plus riches en stérols. Il apparaît donc que la localisation des protéines dans les différents types de rafts est corrélée à leur composition.

Afin d'étudier plus particulièrement la membrane acrosomique les auteurs ont réalisé des marquages sur des coupes de testicule (Asano et al., 2009). En effet à certains stades de la spermatogénèse les membranes plasmiques et acrosomiques sont suffisamment séparées pour pouvoir les distinguer. Cette membrane acrosomique apparaît comme étant riche en GM1 mais pauvre en stérols et doit donc logiquement être retrouvée dans la fraction 7. L'année suivante, une analyse protéomique plus fine des différents sous-types de rafts a permis de démontrer que la fraction 7 était enrichie en canaux calciques (importants pour la réaction acrosomique) et en protéines du complexe SNARE (*Soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptors*), des protéines impliquées dans l'exocytose de l'acrosome (Asano et al., 2010). Ces données semblent indiquer que les radeaux lipidiques de la fraction 7 pourraient appartenir en partie à la membrane acrosomique.




**<u>Figure 16</u> : Maturation protéolytique de la fertiline β au cours du transit épididymaire.**

La fertiline β est mise en place au niveau testiculaire en hétérodimaire avec la fertiline α. La fertiline α est maturée au cours de la spermatogénèse. La fertiline β est maturée au cours du transit épididymaire par deux étapes de protéolyse successives. D'après *Blobel, 2000*.

Un enrichissement dans les régions rafts de protéines fortement exprimées dans l'épididyme est observé, alors que les régions non-rafts en sont plutôt dépourvues. Cette donnée supporte la notion que les radeaux lipidiques agissent comme des plateformes d'amarrage pour l'acquisition sélective de protéines au cours du transit épididymaire. En effet, au cours de ce transit, la composition protéique est également remaniée, notamment grâce à la participation des épididymosomes (voir I-C-3-c).

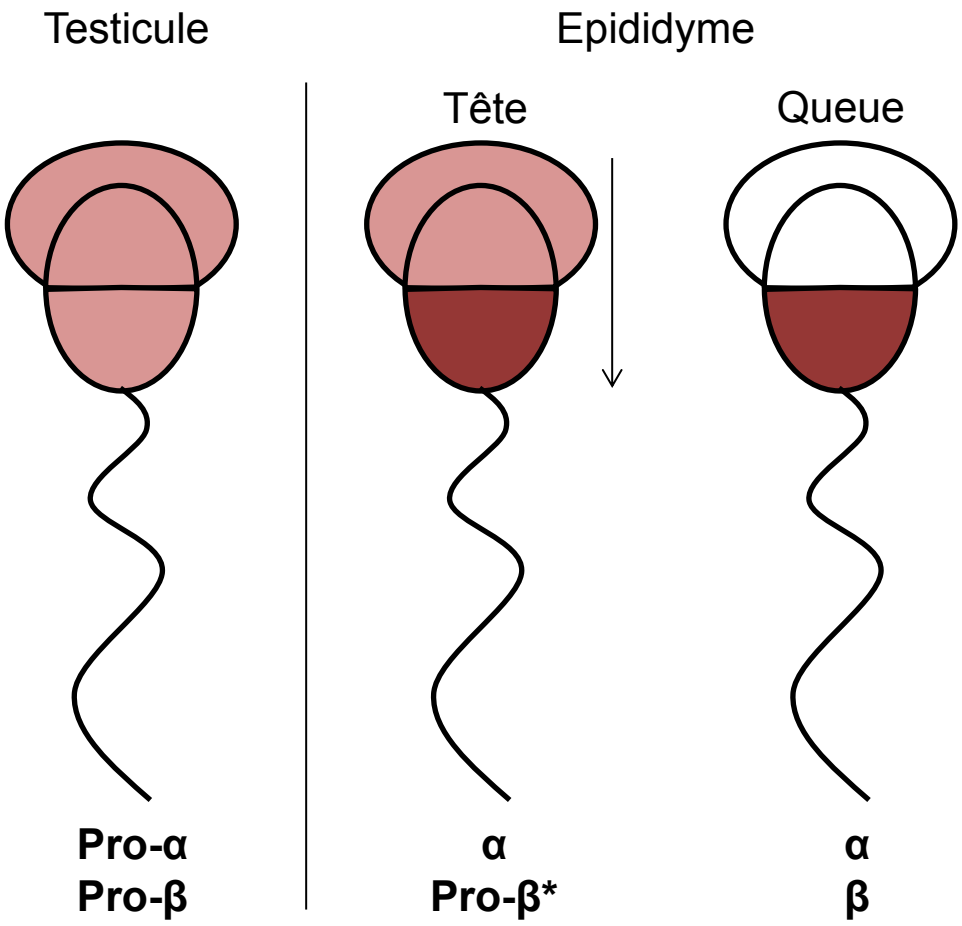
### *3- Les protéines*

Au cours de leur descente dans l'épididyme les spermatozoïdes vont également subir des changements dans leur composition protéique. Certaines protéines d'origine testiculaire vont être modifiées, relocalisées ou éliminées tandis que de nouvelles protéines produites par l'épididyme vont être ajoutées. Ces protéines peuvent être associées superficiellement au spermatozoïde ou ancrées dans la membrane spermatique. La composition protéique du fluide épididymaire va évoluer tout au long de l'organe assurant ainsi une maturation progressive corrélée à l'acquisition du pouvoir fécondant.

#### a) La modification de protéines d'origine testiculaire

De nombreuses protéines d'origine testiculaire vont être maturées au cours du transit épididymaire. Des modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations...) mais également des maturations protéolytiques sont observées (Gatti et al., 2004).

Le meilleur exemple de cette maturation protéolytique est la famille de protéines ADAM (pour « *A Disintegrin And Metalloprotease* »). Parmi cette famille, la fertiline est essentielle à la fertilité puisqu'il a été montré qu'elle était impliquée dans la migration du spermatozoïde à travers l'oviducte, dans la capacité à lier la zone pellucide et dans la liaison à la membrane plasmique de l'ovocyte (Cho et al., 1998). La fertiline est un hétérodimère composé des sous-unités α (ADAM1) et β (ADAM2 - (Blobel et al., 1992), mises en place durant la spermatogénèse sous forme de précurseurs qui seront maturés dans le testicule et l'épididyme par différents




**<u>Figure 17</u> : Relocalisation de l'hétérodimère fertiline α/β au cours du transit épididymaire.**

L'hétérodimère de fertiline est mis en place dans le testicule sur toute la tête du spermatozoïde. La maturation épididymaire de la fertiline β au cours du transit épididymaire conduit à une relocalisation progressive de l'hétérodimère vers la membrane plasmique post-acrosomale uniquement. D'après *Blobel, 2000*.

évènements de protéolyse (Blobel, 2000). La fertiline α est maturée au cours de la spermatogénèse par clivage de son domaine α-métalloprotéase (Blobel et al., 1990) par une pro-protéine convertase du réseau golgien, juste avant son ancrage à la membrane (Lum and Blobel, 1997). La fertiline β est quant à elle maturée au cours du transit épididymaire. Une première étape de protéolyse élimine le pro-domaine permettant le passage de la pro-fertiline β en pro-fertiline $\beta^*$ puis une deuxième étape de clivage conduit à la fertiline β mature (Blobel, 2000). Alors que la pro-fertiline $\beta^*$ est encore détectable dans le corps de l'épididyme, seule la forme mature est retrouvée dans la queue de l'épididyme, indiquant que sa maturation est corrélée à l'acquisition du pouvoir fécondant (**Figure 16**). La maturation de la fertiline β dans l'épididyme va conduire à la relocalisation de l'hétérodimère. Alors qu'au départ celui-ci recouvre toute la tête spermatique, à la fin de la maturation la fertiline n'est localisée qu'au niveau de la membrane plasmique post-acrosomale. Cette relocalisation pourrait servir à augmenter la concentration locale en fertiline ce qui pourrait être important pour la fécondation (**Figure 17** - (Blobel, 2000). Les souris invalidées pour *Adam1* sont infertiles, les spermatozoïdes étant incapables de remonter les voies génitales femelles (Nishimura et al., 2004). Le modèle murin d'invalidation d'*Adam2* présente également une altération de la fertilité, avec des défauts de liaison à la zone pellucide et à l'ovocyte (Cho et al., 1998). De plus, l'absence de la fertiline β entraîne une forte réduction des niveaux d'ADAM3. La fertiline β est donc essentielle pour stabiliser ADAM3 sur le spermatozoïde épididymaire et le complexe fertiline β-ADAM3 pourrait être impliqué dans la liaison à la zone pellucide (Nishimura et al., 2007).

### b) Les protéines secrétées

#### b-1 Les protéines associées superficiellement

Une grande partie des protéines secrétées par l'épithélium épididymaire sont associées faiblement aux spermatozoïdes du fait de leur forte concentration dans la lumière épididymaire et des ponts électrostatiques qu'elles développent avec la membrane spermatique (Dacheux et al.,

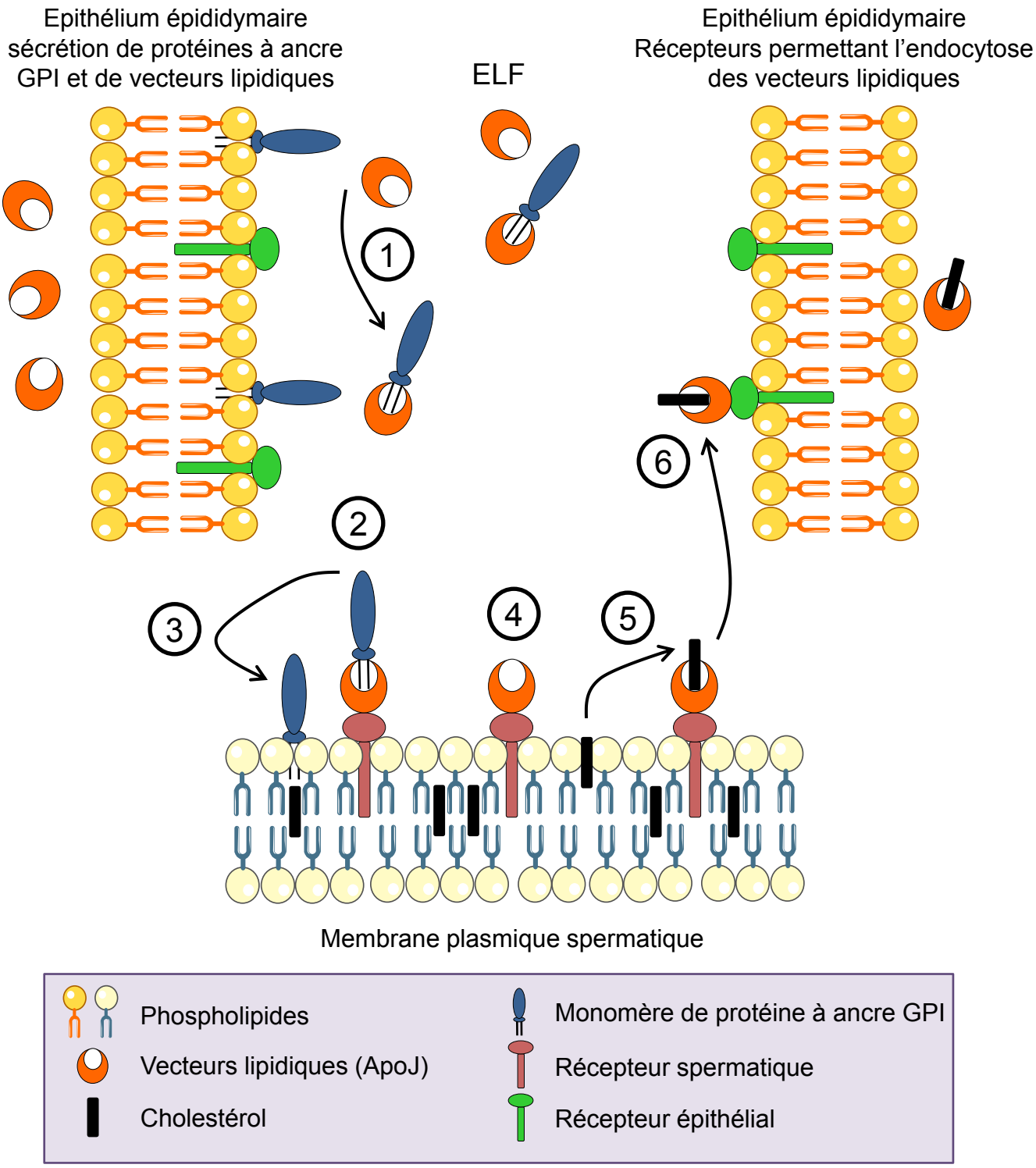
2003). Le rôle physiologique de la présence de ces protéines épididymaires sur le spermatozoïde est hypothétique puisqu'elles sont le plus souvent retrouvées en grande quantité dans le milieu environnant les gamètes. Ce rapprochement à la membrane pourrait faciliter leur activité comme pour la GPX5 ou la lactoferrine qui pourraient ainsi avoir des effets protecteurs plus importants contre les atteintes oxydantes.

Les protéines BSP (Binder of SPerm) sont secrétées par les vésicules séminales chez les ongulés et composent une grande part des protéines présentent dans le liquide séminal. Les BSP peuvent lier la membrane spermatique notamment *via* leurs interactions avec la choline des phospholipides (Plante and Manjunath, 2015a). Chez la souris et l'homme ces protéines sont secrétées par la partie proximale de l'épididyme. La protéine BSPH1 (Binder SPerm Homolog 1) murine semble notamment impliquée dans les modifications lipidiques qui ont lieu au cours de la capacitation (Plante and Manjunath, 2015b).

### b-2 Les protéines ancrées à la membrane

Les protéines ancrées à la membrane sont hydrophobes, qu'elles soient transmembranaires ou liées par ancre GPI, ce qui pose des questions quant à leur transfert de l'épididyme vers les spermatozoïdes. Il est aujourd'hui bien connu qu'un certain nombre de protéines sont transférées *via* les épididymosomes, sans toutefois que le mécanisme moléculaire régissant le transfert de la protéine de l'épididymosome vers le spermatozoïde soit connu (Gatti et al., 2004). Cependant une large quantité de protéines hydrophobes sont présentes dans le fluide épididymaire indépendamment des épididymosomes. Cela suggère un autre type de transport *via* des complexes protéiques solubles par exemple (Dacheux and Dacheux, 2014; Gatti et al., 2004).

L'équipe de Patricia Martin-DeLeon a permis de mieux comprendre ces mécanismes grâce à ses travaux sur la protéine modèle SPAM1 (*Sperm Adhesion Molecule 1*). Cette protéine est présente dans le fluide épididymaire (*epididymal luminal fluid* ELF) de plusieurs espèces dont l'homme et la souris et a été démontrée comme essentielle à la fécondation (pénétration du




**<u>Figure 18</u> : Modèle d'acquisition par le spermatozoïde de protéines à ancre GPI présentes dans le fluide épididymaire.**

1- Stabilisation des monomères protéiques à ancre GPI par des vecteurs lipidiques. 2- Transport des monomères jusqu'à la membrane plasmique spermatique et fixation des vecteurs à des récepteurs membranaires. 3- Transfert et insertion des protéines à ancre GPI dans la membrane plasmique spermatique. 4- Fixation de vecteurs lipidiques « vides » sur des récepteurs membranaires. 5- Transfert de cholestérol membranaire spermatique vers les vecteurs lipidiques. 6- Transport du cholestérol spermatique vers l'épithélium épididymaire. D'après *Martin DeLeon, 2015*.

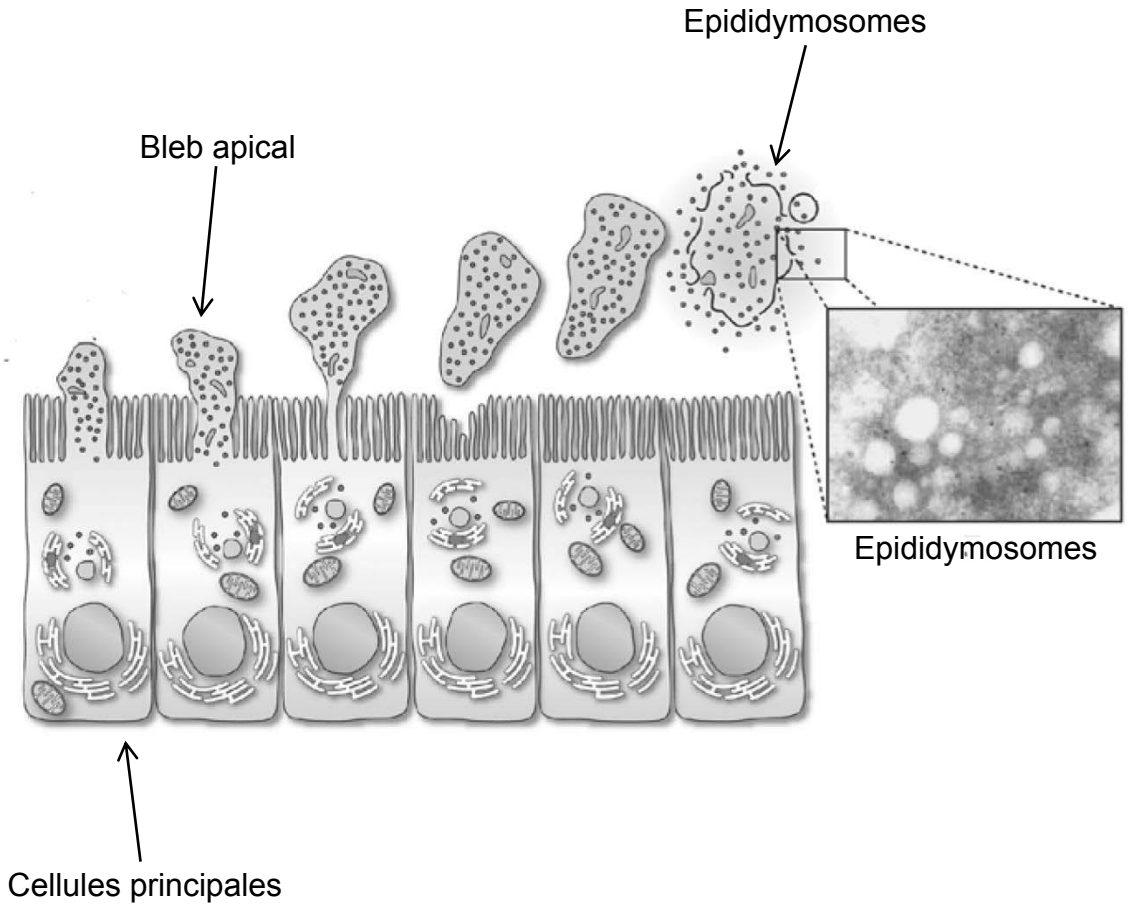
cumulus, liaison à la zone pellucide, réaction acrosomique - (Martin-DeLeon, 2006). SPAM1 se trouve à la fois dans la fraction épididymosome du ELF (40%) mais également dans la fraction non vésiculaire (60% - (Zhang and Martin-Deleon, 2003). Les deux fractions sont capables de la transférer aux spermatozoïdes, la fraction non vésiculaire le faisant avec plus d'efficacité (Griffiths et al., 2008). Comment SPAM1, une protéine à ancre GPI, peut-elle être transférée du ELF aux spermatozoïdes ? Il a été montré que SPAM1 se présentait sous forme de monomère de faible poids moléculaire et dans des complexes oligomériques de haut poids moléculaire. Les complexes oligomériques sont incapables de délivrer SPAM1 mais servent de source de monomères (Griffiths et al., 2009). Les monomères sont stabilisés en solution par des interactions hydrophobes entre l'ancre GPI de SPAM1 et des « vecteurs lipidiques » tels que l'apolipoprotéine J (ou clusterine). Les complexes ainsi formés semblent capables de s'amarrer aux radeaux lipidiques de la membrane plasmique spermatique et ainsi transférer SPAM1 qui, *via* des interactions hydrophobes avec son ancre GPI, se lie au feuillet externe de la bicouche lipidique spermatique (**Figure 18**). Des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires afin de mieux comprendre ces mécanismes et les acteurs impliqués.

Nous détaillerons plus précisément par la suite le transfert de protéines *via* les épididymosomes et les nouveaux rôles qui leur sont aujourd'hui attribués.

### c) Les épididymosomes

#### c-1 Mode de sécrétion des épididymosomes

L'équipe de Yanagimachi fut la première à mettre en évidence par microscopie électronique de petites vésicules dans le fluide épididymaire qui interagissaient avec les spermatozoïdes chez le hamster (Yanagimachi et al., 1985). Ces vésicules lipidiques, appelées plus tardivement épididymosomes, mesurent 50 à 500 nm de diamètre et sont secrétées selon un mode bien particulier (Sullivan et al., 2007). En effet la sécrétion apocrine, décrite initialement dans les glandes mammaires et sudoripares, est largement retrouvée dans le tractus génital mâle.




**<u>Figure 19</u> : Représentation schématique de la sécrétion apocrine par les cellules principales de l'épididyme.**

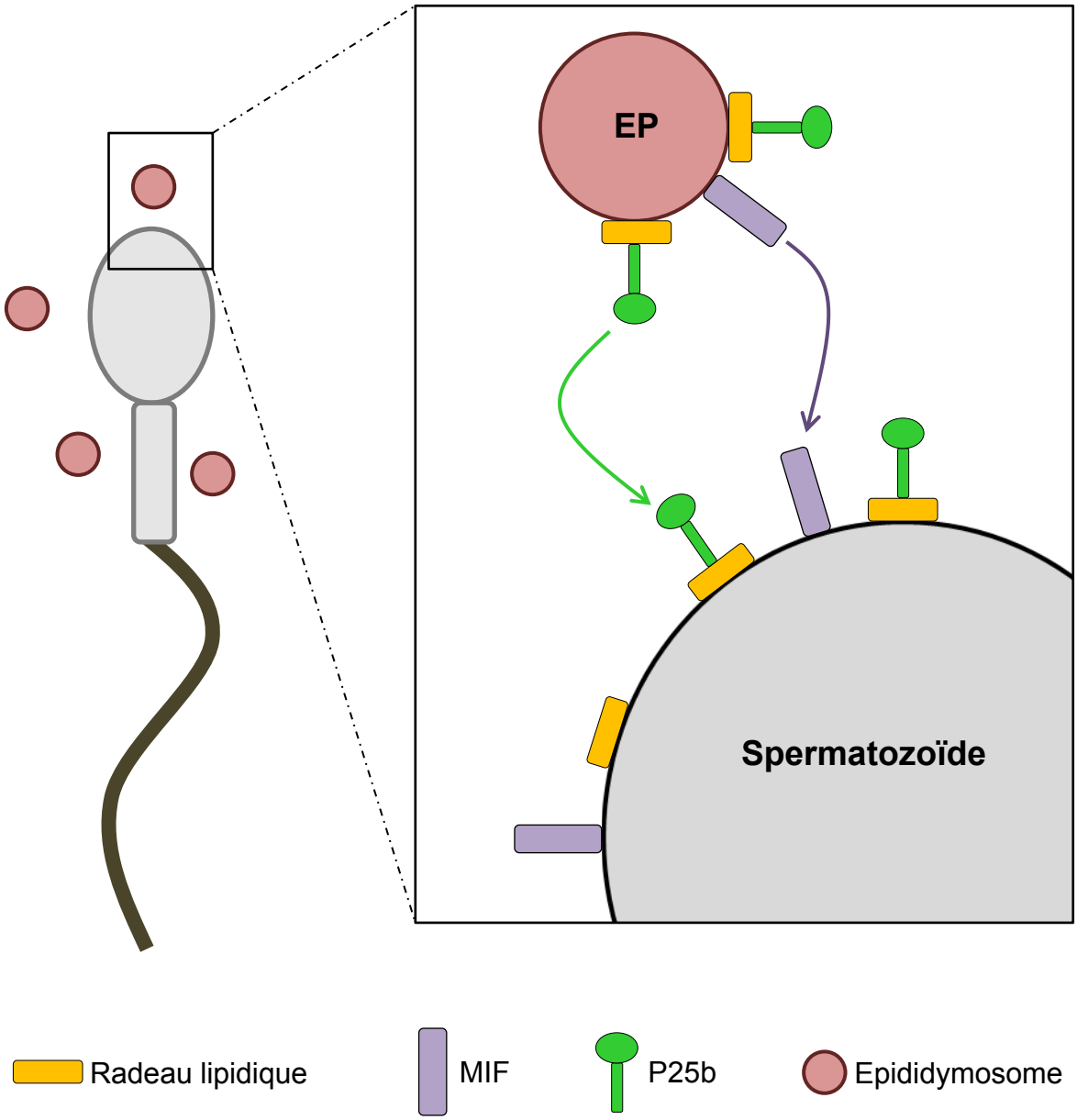
Les blebs contenant les épididymosomes se forment au pôle apical des cellules principales. Les blebs se détachent de l'épithélium épididymaire et relâchent leur contenu dans la lumière des tubules épididymaires. L'encart représente une photographie en microscopie électronique des épididymosomes. D'après *Sullivan et al., 2007*.

Ce type de sécrétion implique la formation de protrusions, ou « blebs », au pôle apical des cellules principales. Ces blebs contiennent peu d'organites : du réticulum endoplasmique, des ribosomes libres et les épididymosomes (Sullivan, 2015). Ils se détachent du pôle apical des cellules principales et relâchent leur contenu dans la lumière en se désintégrant (Aumüller et al., 1997) - **Figure 19**). Les épididymosomes peuvent alors jouer leur rôle dans la maturation des spermatozoïdes. La manière dont ces vésicules lipidiques sont assemblées avant leur entrée dans les blebs est toujours méconnue.

Chez la souris les épididymosomes sont principalement émis dans la tête proximale de l'épididyme puis dans la queue de l'organe. Ces vésicules sont caractérisées par un ratio cholestérol/phospholipides très élevé qui augmente entre les épididymosomes de la tête et de la queue de l'épididyme (Rejraji et al., 2006). La PC est le phospholipide majoritaire des épididymosomes de la tête de l'épididyme alors que dans ceux de la queue de l'épididyme c'est la SPM qui devient majoritaire (50% des phospholipides - (Rejraji et al., 2006).

### c-2 Epididymosomes et transfert de protéines

Le transfert de protéines entre les épididymosomes et les spermatozoïdes est aujourd'hui bien documenté même si de nombreux aspects restent en suspens. Le transfert de protéines est régionalisé de différentes manières. Tout d'abord la composition en protéines des épididymosomes diffère entre la tête et la queue de l'épididyme, ce qui entraîne une maturation séquentielle des gamètes (Frenette et al., 2006). De plus des expériences *in vitro* ont montré que la co-incubation de spermatozoïdes avec des épididymosomes de tête ou de queue d'épididyme entraînait préférentiellement le transfert de protéines présentes sur les épididymosomes issus de la queue de l'épididyme. Ceci suggère que ces deux populations de vésicules lipidiques n'interagissent pas de la même manière avec les gamètes (Frenette et al., 2006). Le transfert des protéines est dépendant du pH et de la température, avec un maximum d'efficacité à pH 6-6,5 qui est le pH physiologique du fluide intraluminal épididymaire (Frenette et al., 2002). Le zinc




**<u>Figure 20</u> : Représentation schématique du transfert sélectif des protéines des épididymosomes vers la tête spermatique.**

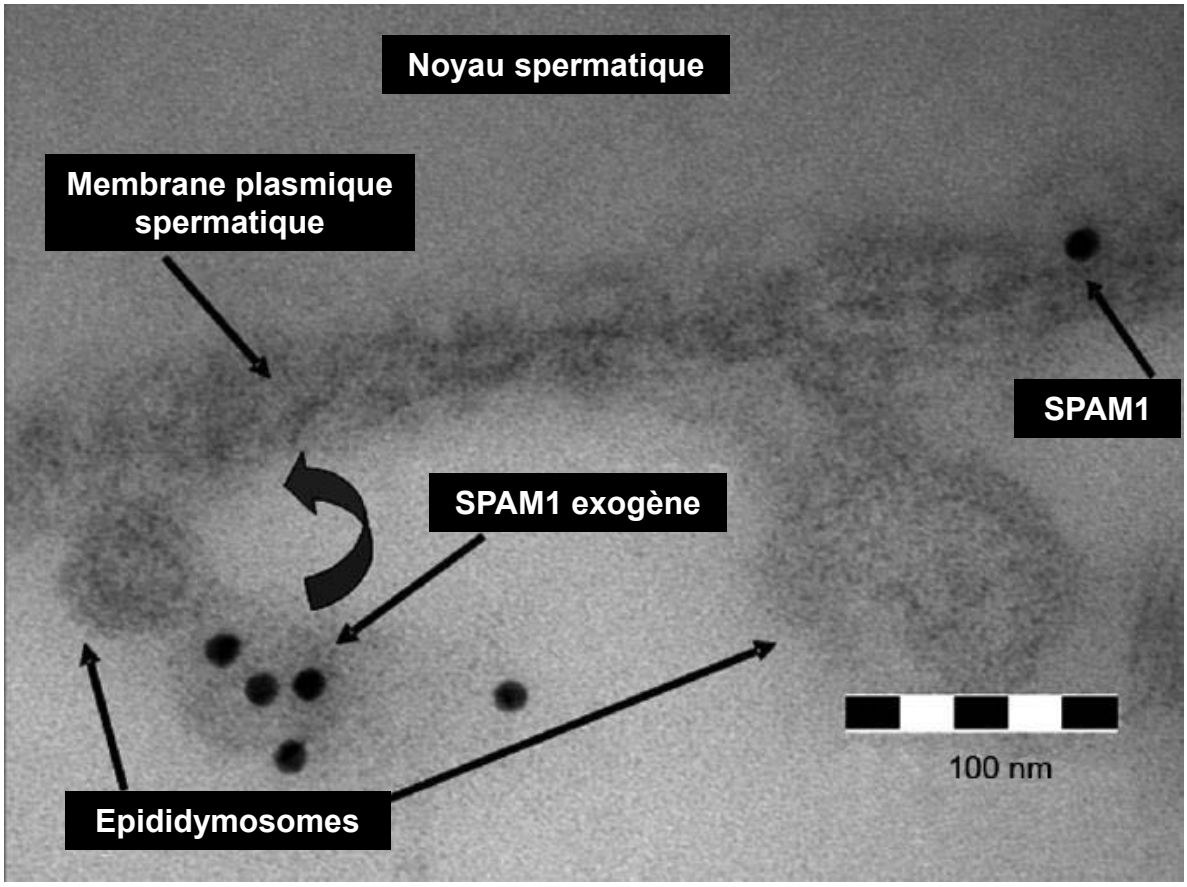
Le transfert des protéines des épididymosomes (EP) vers les spermatozoïdes est étroitement associé à la dynamique membranaire : les protéines sont sélectivement transférées entre les zones rafts des deux membranes (P25b, impliquée dans la reconnaissance de la zone pellucide de l'ovocyte chez le bovin) ou entre zones non rafts (comme MIF, une protéine impliquée dans la régulation de la mobilité spermatique). D'après *Sullivan et al., 2007*.

P25b : Protein of 25kDa in bovine, MIF : Macrophage migration Inhibitory Factor.

potentialise la quantité de protéines transférées ce qui est particulièrement intéressant, l'épididyme étant un tissu très riche en zinc (Mawson and Fischer, 1951).

La composition particulière en lipides des épididymosomes, haut ratio cholestérol/phospholipides et riche en SPM, est très proche de celle des radeaux lipidiques. Ces microdomaines sont connus pour être riches en protéines à ancre GPI (Rajendran and Simons, 2005). En effet, les épididymosomes sont très riches en radeaux lipidiques, dans lesquels certaines protéines sont retrouvées spécifiquement. Par exemple la protéine bovine P25b, déterminante pour la liaison à la zone pellucide (Parent et al., 1999), est retrouvée spécifiquement au niveau des radeaux lipidiques des épididymosomes. Cette position particulière va conduire au transfert régionalisé de cette protéine vers les radeaux lipidiques présents sur le gamète mâle, principalement au niveau de la membrane plasmique acrosomale (Girouard et al., 2009). A l'inverse, des protéines exclues de ces domaines particuliers dans les épididymosomes en seront également exclues sur le spermatozoïde. L'organisation de la composition lipidique membranaire des épididymosomes et des spermatozoïdes conditionne donc l'acquisition régionalisée de protéines, leur conférant une localisation appropriée à leur fonction (**Figure 20**).

Plus récemment des études ont montré que des protéines transmembranaires étaient également transférées *via* les épididymosomes, ce qui a posé la question de leur mode de transfert. Parmi celles-ci, PMCA4 (*Plasma Membrane Calcium-ATPase 4*), une pompe à efflux de calcium, a été largement étudiée. La quantité de cette protéine est augmentée de 5 fois dans les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme comparés à ceux de la tête chez la souris (Patel et al., 2013). Ce résultat est corrélé à une diminution de la concentration calcique intracellulaire de 2 à 6 fois. Le transfert de PMCA4 *via* les épididymosomes a été démontré *in vitro* (Patel et al., 2013). Une équipe a analysé ce transfert chez le bovin en étudiant les propriétés fusogènes des épididymosomes. En utilisant des épididymosomes marqués, cette équipe a clairement mis en évidence qu'une étape de fusion de membrane entre les épididymosomes et les spermatozoïdes était à l'origine du transfert de PMCA4 (Schwarz et al., 2013). Une certaine sous-population




**<u>Figure 21</u> : Photographie en microscopie électronique à transmission mettant en évidence l'amarrage des épididymosomes à la membrane plasmique spermatique.**

L'immunomarquage de SPAM1 à l'or permet de mettre en évidence sa présence dans les épididymosomes et son transfert à la membrane plasmique spermatique. La microscopie électronique à transmission permet de visualiser la fusion des épididymosomes avec la membrane plasmique du spermatozoïde. Issu de *Griffiths et al., 2008*.

d'épididymosomes possède les protéines CD9 et CD26, des tétraspanines connues pour être des marqueurs biochimiques des exosomes. Ce sont des molécules d'adhésion capables de générer des sites compétents pour la fusion de membranes (Théry et al., 2002). Les tétraspanines semblent activement participer au transfert de protéines car leur inactivation par l'utilisation d'un anticorps inhibe ce transfert *in vitro* entre épididymosomes et spermatozoïdes (Caballero et al., 2013).

Il semble aujourd'hui évident que les épididymosomes sont capables de fusionner leur membrane avec celle des spermatozoïdes pour permettre l'échange de protéines (transmembranaires par exemple - **Figure 21**). Cependant, la totalité des protéines qui composent les épididymosomes n'étant pas retrouvée dans la membrane spermatique, ce processus de fusion ne semble pas être total et ne concerne que certains sites spécifiques contenant les protéines à transférer. Ces sites potentiels pourraient être caractérisés par leur composition lipidique (radeaux lipidiques) ou leur contenu en certaines protéines (CD9-CD26). Les mécanismes précis de fusion ainsi que les acteurs mis en jeu nécessitent aujourd'hui de plus amples recherches.

### c-3 Autres rôles des épididymosomes

- La maturation lipidique

Du fait de leur forte concentration en cholestérol et des maturations lipidiques que subissent les spermatozoïdes au cours du transit épididymaire, les chercheurs émettent depuis longtemps l'hypothèse que les épididymosomes participent à cette maturation lipidique (Yanagimachi et al., 1985). Ces hypothèses ont souvent été remises en cause puisqu'aucune preuve directe n'était apportée. Une étude chez la souris a montré que la fluidité membranaire des épididymosomes et des spermatozoïdes évoluait en sens inverse au cours du transit épididymaire, suggérant un échange de lipides (Rejraji et al., 2006). Cependant, aucune donnée ne met clairement en évidence une corrélation dans les changements de classes de lipides. Plus récemment une étude chez le bovin a démontré *in vitro* une diminution du ratio cholestérol/PL après incubation de spermatozoïdes de tête d'épididyme avec des épididymosomes de tête ou de

queue d'épididyme (Schwarz et al., 2013). Cependant les modifications observées étaient plutôt en faveur d'une augmentation des PL plutôt que d'une diminution du cholestérol qui est normalement observée physiologiquement au cours du transit épididymaire. Il est actuellement difficile de trancher sur la question de l'implication des épididymosomes dans la maturation lipidique des gamètes et l'intervention d'autres mécanismes semble nécessaire.

- La protection des gamètes

La présence de protéines impliquées dans la protection des spermatozoïdes sur les épididymosomes est aujourd'hui bien décrite (GPX5, glutathion-S-transférase... - (Girouard et al., 2011). Des études ont montré qu'une certaine sous-population d'épididymosomes présentait une forte affinité pour les spermatozoïdes morts. Cette fraction de vésicules lipidiques contient la protéine ELSPBP1 qui est transférée tout au long du transit épididymaire aux spermatozoïdes morts (D'Amours et al., 2012). Il semble qu'ELSPBP1 et son partenaire BLVRA (*Biliverdin Reductase A*) agissent pour éliminer les EOR libérées par les spermatozoïdes morts et ainsi protéger les gamètes vivants. Cependant le mécanisme permettant l'identification des spermatozoïdes morts n'est pour l'instant pas connu.

- Le transfert de microARNs

Le modèle murin invalidé pour l'enzyme *Dicer1* dans l'épididyme a permis d'entrevoir l'importance des microARNs dans la physiologie de l'organe (Björkgren et al., 2012). Cette enzyme est responsable de la maturation des pré-microARNs en microARNs matures et son invalidation dans l'épididyme conduit à une dédifférenciation de l'organe. Une étude réalisée chez l'homme a montré que la vasectomie entraînait la perte dans le fluide séminal de microvésicules contenant des microARNs (miARNs), laissant supposer que l'épididyme pouvait en être à l'origine (Belleannée et al., 2013a). La poursuite de ces études a été réalisée chez le bovin et a permis de mettre en évidence que les épididymosomes transportaient effectivement différentes populations de miARNs avec des profils région-spécifiques (Belleannée et al., 2013b). D'autres auteurs ont également étudié les miARNs présents dans les spermatozoïdes et ont mis en

évidence une évolution du répertoire spermatique en miARNs au cours du transit épididymaire (Nixon et al., 2015). Enfin une étude très récente a permis d'apporter la preuve réelle d'une transmission de miARNs des épididymosomes vers les spermatozoïdes par des techniques de co-incubation *in vitro*. Là encore ce transfert ne semble pas se faire « au hasard », en effet tous les petits ARNs ne sont pas transférés et les spermatozoïdes morts n'acquièrent pas de miARNs (Reilly et al., 2016).

Les spermatozoïdes, en plus d'apporter le matériel génétique paternel, sont donc les vecteurs d'informations épigénétiques. Compte tenu du fait que les gamètes mâles ne transcrivent pas leurs gènes, il est probable que cette information sera utilisée par le zygote. Cet aspect a été mis en lumière dans des recherches récentes et innovantes. Une étude chez la souris a permis de montrer que des mâles soumis à un régime pauvre en protéines engendraient une descendance présentant des désordres métaboliques avec notamment une altération de la biosynthèse hépatique du cholestérol (Carone et al., 2010). Les spermatozoïdes de ces mâles présentent des niveaux élevés de fragments d'ARNt (tRFs) acquis *via* les épididymosomes au cours du transit épididymaire. Ces tRFs sont alors capables de réguler l'expression de gènes dans l'embryon entraînant le phénotype observé dans la descendance (Sharma et al., 2016). Une étude réalisée par un autre groupe a montré que des mâles nourris avec un régime enrichi en graisses (*high-fat diet*) engendraient une descendance présentant également des désordres métaboliques tels que l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline. Là encore les spermatozoïdes présentaient une altération de leurs profils de tRFs. La mise en cause de ces petits ARNs a été confirmée puisque l'injection d'une tête de spermatozoïde ou uniquement des tRFs purifiés dans des ovocytes ou des embryons suffisait à déclencher le phénotype chez la descendance (Chen et al., 2016). Les auteurs de cette publication ne discutent cependant pas du site d'acquisition de ces tRFs.

Les études sur la transmission transgénérationnelle de maladies acquises sont en plein essor et il est désormais évident que la maturation épididymaire des gamètes intervient dans ce processus.

A l'issue du transit épididymaire, le spermatozoïde a évolué sur de nombreux aspects, comme nous avons pu le décrire, afin d'acquérir ses propriétés fécondantes. Cependant, sa maturation ne s'arrête pas dans l'épididyme puisque de nombreux changements vont avoir encore lieu après éjaculation dans le tractus génital femelle. Ces principales modifications sont regroupées sous le terme de capacitation.

## II- La capacitation

### A-Définition générale

La capacitation est un ensemble de modifications biochimiques et fonctionnelles que va subir le spermatozoïde dans les voies génitales femelles. Ces modifications sont un prérequis indispensable à la fécondation.

La capacitation est une des grandes découvertes du 20ème siècle puisqu'elle a permis le développement de la fécondation *in vitro* (FIV), qui offre aujourd'hui une solution aux couples, de plus en plus nombreux, qui souffrent d'infertilité. Elle fut découverte indépendamment par deux scientifiques, Chang et Austin, qui avaient observé que les spermatozoïdes devaient séjourner un certain temps dans le tractus génital femelle pour pouvoir féconder un ovocyte (Austin, 1951; Chang, 1951). Ces observations impliquaient que les gamètes mâles subissaient des « modifications » dans les voies femelles pour être capables d'engendrer un embryon : le terme capacitation fut inventé 1 an plus tard (Austin, 1952). Au fil des recherches, les composants nécessaires à la réalisation de la capacitation *in vitro* ont été découverts et forment un milieu finalement assez simple contenant des électrolytes (par exemple : $Na^+$, $K^+$, $Cl^-$, $HCO_3^-$, $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$ et $PO_4^{3-}$), des métabolites énergétiques (comme le glucose, le pyruvate et le lactate) et un accepteur de cholestérol, le plus souvent de l'albumine sérique. Le spermatozoïde étant

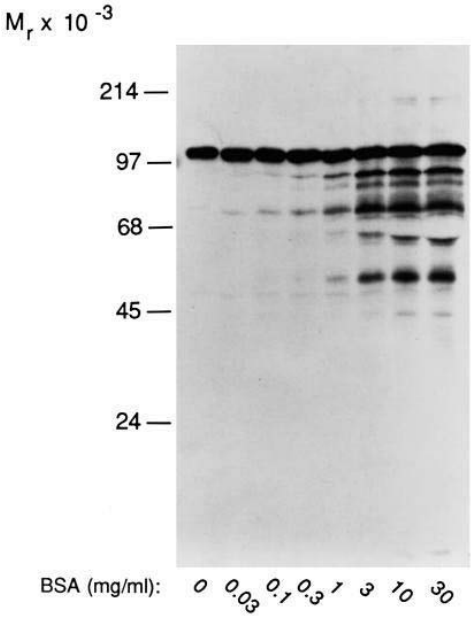
transcriptionnellement et traductionnellement inactif, les mécanismes mis en jeu vont principalement entraîner des modifications de la composition membranaire et de la concentration intracellulaire de certains ions, aboutissant au déclenchement de voies de signalisation et donc à la modification post-traductionnelle de protéines. Bien que cela ait été assez controversé durant de nombreuses années, il est généralement admis que la réaction acrosomique et l'hyperactivation ne font pas partie intégrante de la capacitation mais que la capacitation prépare à ces deux étapes (Gervasi and Visconti, 2016).

Les modifications engendrées au cours de la capacitation vont entraîner la mobilisation de nombreux acteurs et l'activation de voies de signalisation permettant au spermatozoïde de répondre à son environnement et de se préparer à la fécondation.

## B-Acteurs et flux ioniques

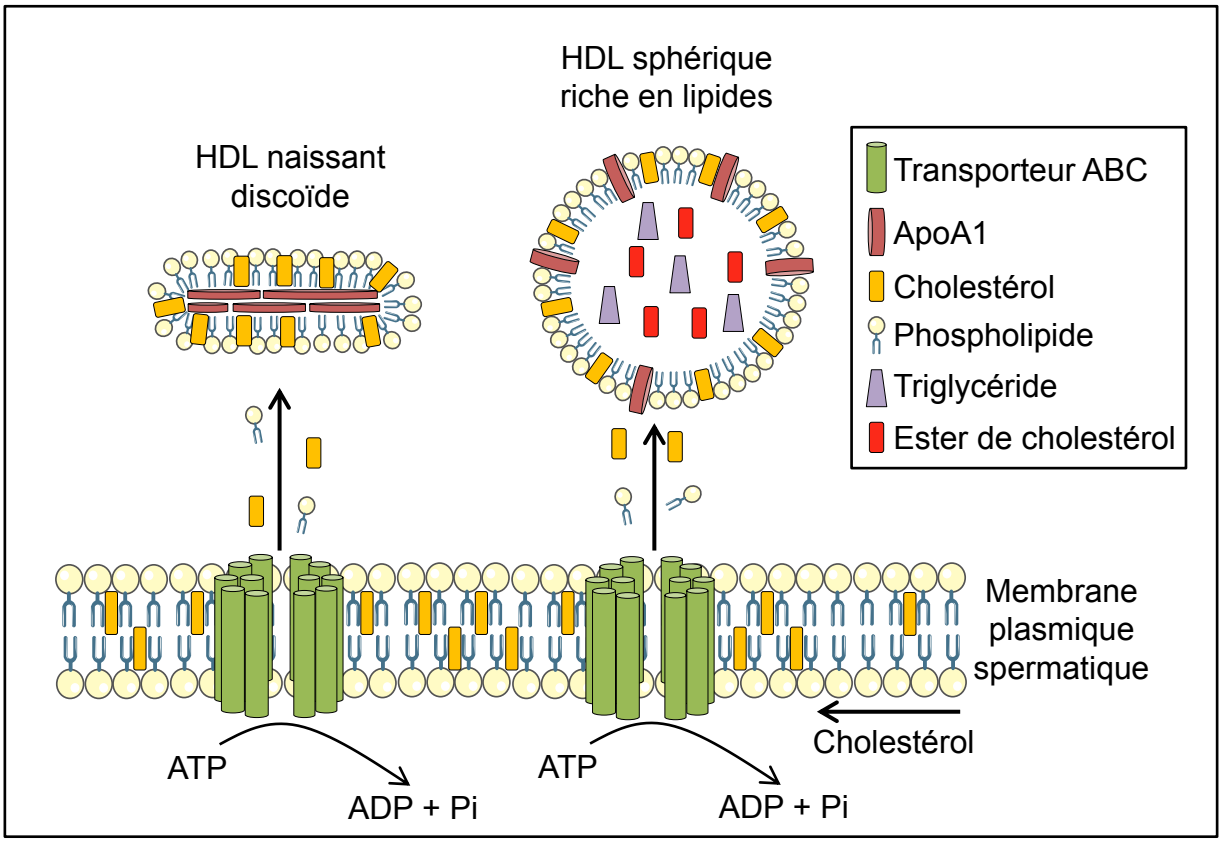
La capacitation est un processus extrêmement complexe faisant intervenir des acteurs de natures différentes. Malgré les nombreuses recherches de ces dernières années, beaucoup de zones d'ombre persistent, principalement dues à la difficulté d'étudier un processus très dynamique sur une cellule unique et à l'impossibilité de cultiver ce type cellulaire. De plus les approches biologiques classiques sont limitées puisque le spermatozoïde, de par son incapacité à transcrire son ADN, n'est pas une cellule commune.

Pour décrire la capacitation de manière simple, on peut tout d'abord dire que ce processus est hautement dépendant de la composition lipidique membranaire du spermatozoïde, puisqu'un des évènements initiateurs est un efflux de stérols. La fluidité et la perméabilité membranaires se trouvent alors augmentées, entraînant la mise en place de flux ioniques (principalement de calcium et bicarbonate) de part et d'autre de la membrane. D'autres types de canaux (notamment des canaux potassium) vont également être activés et conduire à modifier le pH intracellulaire




**<u>Figure 22</u> : Effet de la concentration en BSA dans le milieu capacitant sur la tyrosine phosphorylation.**

Les spermatozoïdes sont incubés durant 90 min dans un milieu capacitant contenant des concentrations croissantes de BSA. La concentration en BSA est corrélée aux niveaux de tyrosines phosphorylées. BSA : Bovine Serum Albumin. Issu de *Visconti et al., 1995*.




**<u>Figure 23</u> : Modélisation du transport inverse du cholestérol de la membrane plasmique spermatique vers les HDL.**

Les transporteurs ABC (ATP binding cassette) peuvent transporter le cholestérol libre vers des transporteurs protéiques tels que les HDL (high density lipoprotein), qui sont abondants dans le tractus génital femelle. L'apolipoprotéine A1 (ApoA1) forme des dimères qui stabilisent les HDL discoïdes naissants. Les HDL matures emmagasinent des triglycérides et des esters de cholestérol. Ce modèle représente également la possibilité qu'après export du cholestérol des régions rafts où se trouvent les transporteurs ABC, les régions non rafts viennent combler le déficit en cholestérol. D'après *Gadella and Boerke, 2016*.

($pH_i$), ainsi que le potentiel de membrane. Il s'ensuit alors l'activation de voies de signalisation intracellulaire dont la plus documentée est celle faisant intervenir l'adénylate cyclase soluble sAC, conduisant à l'activation de la protéine kinase A (PKA). De nombreux substrats seront alors phosphorylés au niveau de leur résidus sérine/thréonine et des cascades de phosphorylations conduiront à l'un des marqueurs les plus utilisés de la capacitation : la tyrosine phosphorylation. Au final le spermatozoïde capacité sera capable de développer une hyperactivation flagellaire, et les nombreuses modifications chimiques qu'il aura subies le prépareront à la réaction acrosomique et à la fécondation.

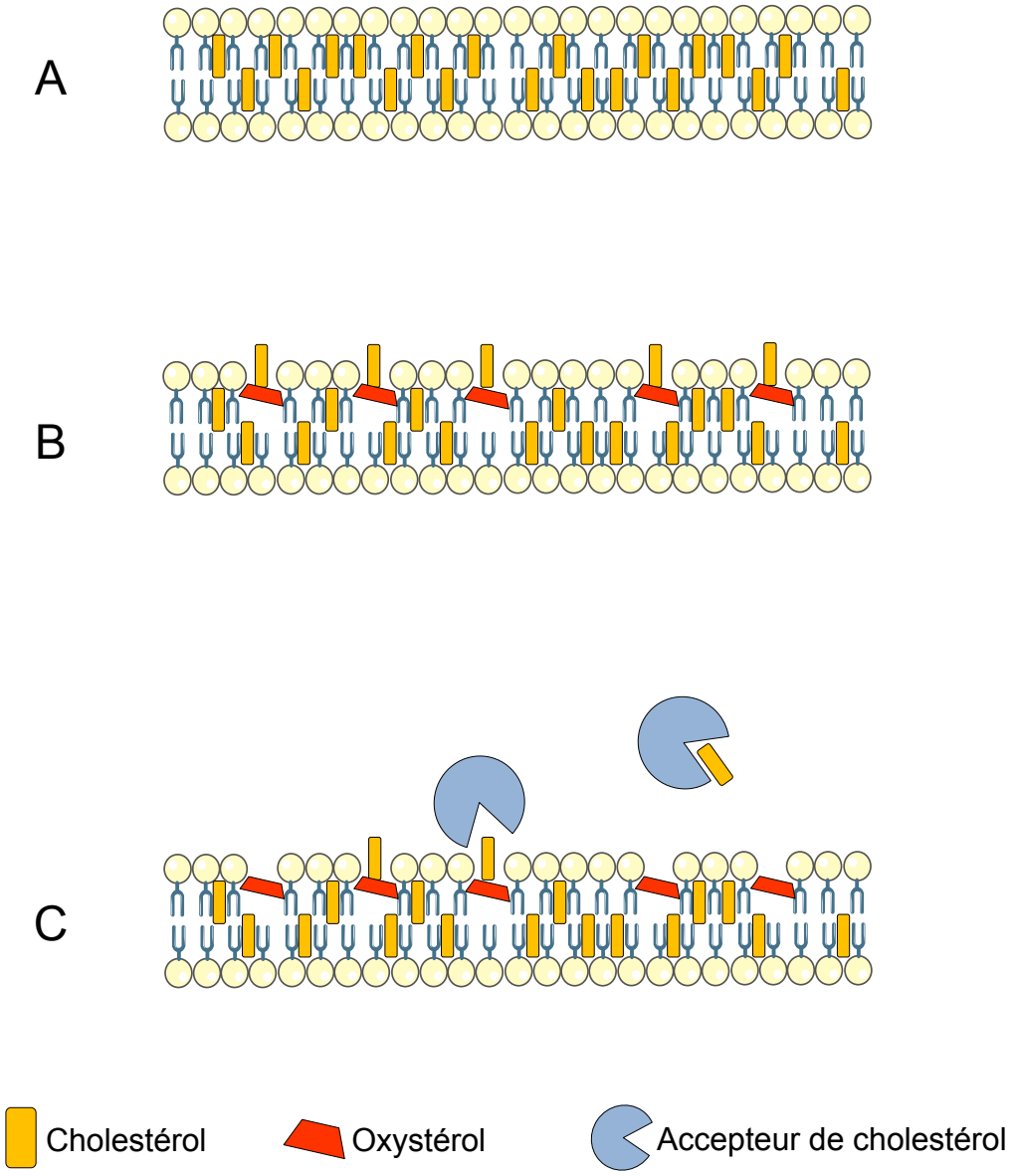
Cette vision simple de la capacitation est chaque jour « malmenée » par les nombreuses recherches en cours sur ce processus et les découvertes de l'implication de toujours plus d'acteurs.

### *1- Les principaux acteurs de la capacitation*

Nous détaillerons ici quelques acteurs clés de la capacitation. Cette dernière est en grande partie dépendante de la régulation de la concentration de nombreux ions. La régulation de ces flux ioniques sera détaillée en partie II-B-2.

#### a) Le cholestérol

La composition membranaire en cholestérol est en étroite relation avec la capacitation. En effet, dans les voies génitales femelles, le gamète mâle est au contact de molécules acceptant le cholestérol comme l'albumine ou les HDL (Ehrenwald et al., 1990; Vignon et al., 1991). *In vitro*, la BSA (*bovine serum albumin*) est utilisée comme accepteur du cholestérol, c'est donc un élément indispensable des milieux capacitants. En effet une étude chez la souris a notamment montré que les niveaux de tyrosine phosphorylées (marqueur terminal de la capacitation) étaient directement corrélés à la concentration en BSA dans le milieu capacitant (**Figure 22** - (Visconti et al., 1995a). Quelques années plus tard, la même équipe a démontré que la BSA agissait bien comme un accepteur de stérols car son ajout dans le milieu capacitant entraînait une diminution du




**<u>Figure 24</u> : Modèle de l'efflux de cholestérol médié par les oxystérols.**

A- Membrane rigide riche en cholestérol. B- Quand les oxystérols se forment ils poussent partiellement le cholestérol hors de la membrane. En effet, les oxystérols prennent une position parallèle aux les têtes polaires des phospholipides. C- Le cholestérol est alors plus accessible pour les accepteurs de cholestérol comme l'albumine. D'après *Gadella and Boerke, 2016*.

desmostérol et du cholestérol spermatiques et une augmentation de ces derniers dans le milieu (Visconti et al., 1999a). Cependant le fait que le cholestérol, une molécule hautement hydrophobe, puisse sortir passivement de la membrane plasmique vers des accepteurs de cholestérol reste controversé (Leahy and Gadella, 2015). Des auteurs émettent l'hypothèse qu'un transport inverse du cholestérol existe aussi sur le spermatozoïde (**Figure 23** - (Gadella and Boerke, 2016). Ces hypothèses sont renforcées par les modèles transgéniques invalidés pour les transporteurs ABC (ABCA1-ABCG1 - (Aiello et al., 2003; Selva et al., 2004; Tarling and Edwards, 2012; Tarling et al., 2010) qui présentent des défauts de fertilité. Cependant, aucune expérience n'a permis de mettre en évidence l'existence du transport inverse du cholestérol sur le gamète mâle.

De plus des recherches ont montré que l'efflux de cholestérol ne s'effectuait pas de manière homogène sur le spermatozoïde. Les régions non rafts étaient spécifiquement déplétées en cholestérol tandis que celui-ci restait en quantité constante dans les radeaux lipidiques (van Gestel et al., 2005; Shadan et al., 2004). Cependant, l'hypothèse selon laquelle le cholestérol serait extrudé de manière homogène sur toute la membrane et que le cholestérol des régions non rafts viendrait ensuite combler la perte dans les radeaux lipidiques ne peut être exclue (**Figure 23**). Quoi qu'il en soit cette réduction du cholestérol entraîne la coalescence des radeaux lipidiques au niveau de la partie antérieure de la tête spermatique. Ainsi, l'efflux de cholestérol favorise le rapprochement de protéines membranaires enrichies dans ces radeaux lipidiques, permettant leur localisation adéquate pour le déclenchement de voies de signalisation intracellulaire et la fécondation.

Des données récentes ont également mis en évidence le rôle des oxystérols dans l'efflux de stérols au cours de la capacitation (**Figure 24**). En effet, le processus de capacitation, en générant des EOR, induit l'oxydation d'une faible proportion du cholestérol membranaire et la présence d'oxystérols au niveau spermatique a été décrite chez le bovin (Brouwers et al., 2011), le

porc et la souris (Boerke et al., 2013). Cette production d'oxystérols semble importante pour la capacitation puisque l'utilisation d'antioxydants, tels que les vitamines E ou A, diminue l'efflux de stérols et altère la fécondation *in vitro* (Aitken, 2011; Boerke et al., 2013). Les oxystérols sont connus pour promouvoir la fluidité membranaire (Olkkonen and Hynynen, 2009) et augmenter la disponibilité du cholestérol dans des systèmes artificiels de type liposomes (Bielska et al., 2014). Leur présence pourrait donc favoriser l'efflux de stérols au cours de la capacitation.

#### b) L'adénylate cyclase

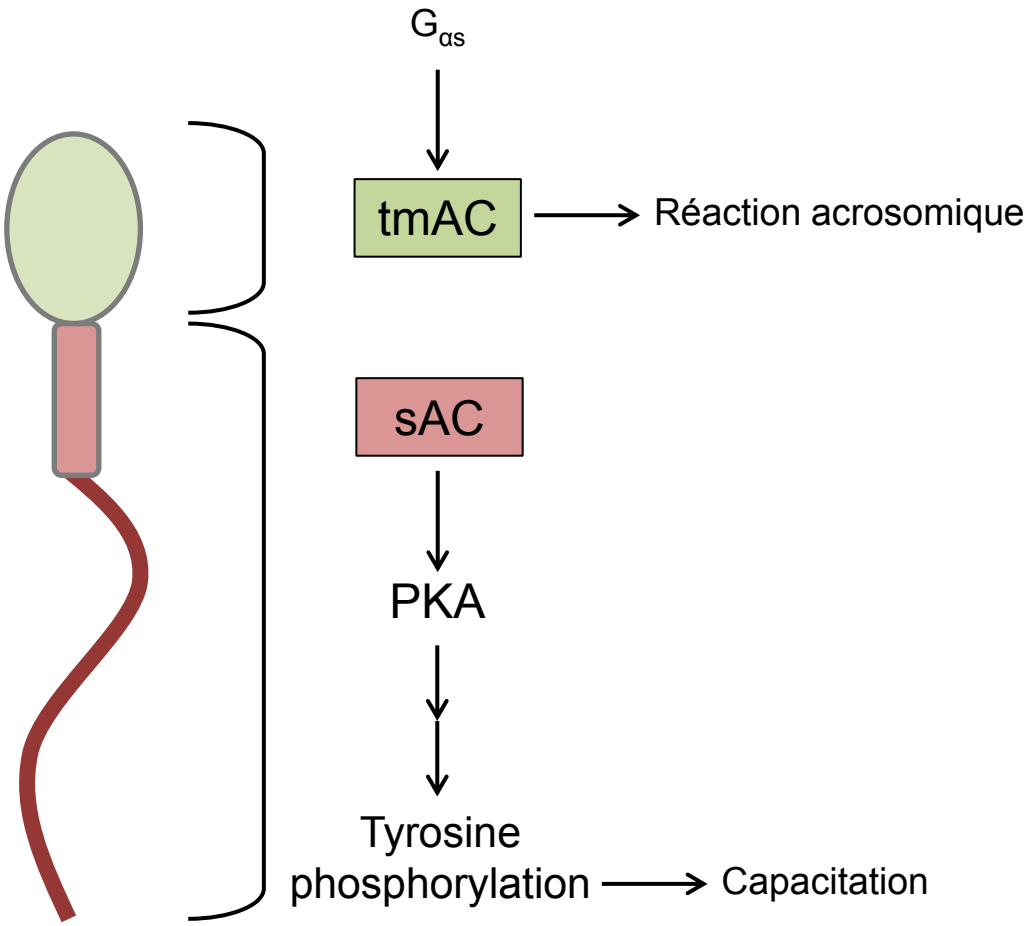
Le rôle prépondérant de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) dans la physiologie spermatique et en particulier la capacitation, est connu depuis de nombreuses années. L'AMPc ou ses cibles interviennent dans le remodelage lipidique membranaire (Gadella and Harrison, 2000), l'hyperpolarisation de la membrane plasmique (Demarco et al., 2003), l'augmentation du pH (Wang et al., 2007) et du calcium intracellulaires (Tateno et al., 2013) et l'augmentation de la tyrosine phosphorylation des protéines au cours de la capacitation (Visconti et al., 1995b). Son action dans la réalisation de la réaction acrosomique est également bien documentée (Branham et al., 2006; Breitbart and Spungin, 1997).

Un des premiers évènements visibles lors de l'induction de la capacitation est l'augmentation rapide et importante de l'AMPc intracellulaire. Ces niveaux élevés reviennent rapidement à la normale *via* l'action de phosphodiestérases et de transporteurs (Battistone et al., 2013) - voir section b-3). Chez les vertébrés, l'AMPc est synthétisée par deux types d'adénylate cyclases : une famille ubiquiste d'adénylate cyclase transmembranaire (tmACs) composée de 9 membres (Adcy1-9) et une adénylate cyclase soluble (sAC ou SACY) codée par un gène unique (Adcy10) originellement trouvé comme spécifique du testicule et du spermatozoïde (Braun and Dods, 1975), mais identifié depuis dans d'autres types cellulaires (pour revue : (Tresguerres et al., 2011)).

### b-1) L'adénylate cyclase soluble

A l'inverse des adénylate cyclases transmembranaires, sAC est insensible aux protéines G hétérodimériques et à la forskoline mais est régulée par le calcium et le bicarbonate au cours de la capacitation (voir la régulation de ces flux ioniques - (Chen et al., 2000; Garbers et al., 1982; Jaiswal and Conti, 2003; Litvin et al., 2003). Le domaine catalytique de sAC est très conservé et présente des similitudes avec celui de l'adénylate cyclase de cyanobactéries, elle aussi dépendante du bicarbonate (Chen et al., 2000). Le bicarbonate stimule le Vmax de l'enzyme en favorisant le réarrangement conformationnel de son site actif (Litvin et al., 2003). sAC est également un senseur de calcium puisque ce dernier augmente l'affinité de l'enzyme pour son substrat l'ATP (Zippin et al., 2013). Enfin bien que l'enzyme soit initialement détectée dans la fraction soluble testiculaire, l'activité adénylate cyclase dépendante du bicarbonate dans le spermatozoïde mature est associée à la membrane (Visconti et al., 1990), sans que l'on sache quelle est la nature de cette association ni comment sAC est relocalisée.

Afin de caractériser l'importance de sAC dans la physiologie spermatique, un modèle de souris transgéniques invalidées pour *Adcy10* a été développé. Ces souris sont complètement stériles avec une perte totale de mobilité spermatique et une incapacité à féconder *in vitro*, mais ne montrent aucune altération testiculaire ou de spermatogénèse (Esposito et al., 2004). Bien que l'ajout d'analogue d'AMPc dans le milieu capacitant restaure la mobilité spermatique, l'hyperactivation n'a en revanche pas lieu et les spermatozoïdes présentent des anomalies morphologiques et demeurent incapables de féconder un ovocyte (Hess et al., 2005). Ces résultats pourraient indiquer un rôle de sAC durant la spermatogénèse ou la maturation épididymaire. L'utilisation d'inhibiteurs a permis de caractériser la fonction de sAC dans un contexte sauvage. Le KH7 (inhibiteur d'adénylate cyclase soluble) bloque l'augmentation de l'AMPc au cours de la capacitation et inhibe la tyrosine phosphorylation et la mobilité (Hess et al., 2005). L'ensemble de ces résultats confirme le rôle majeur de sAC dans l'initiation de la capacitation et les évènements qui y sont associés.

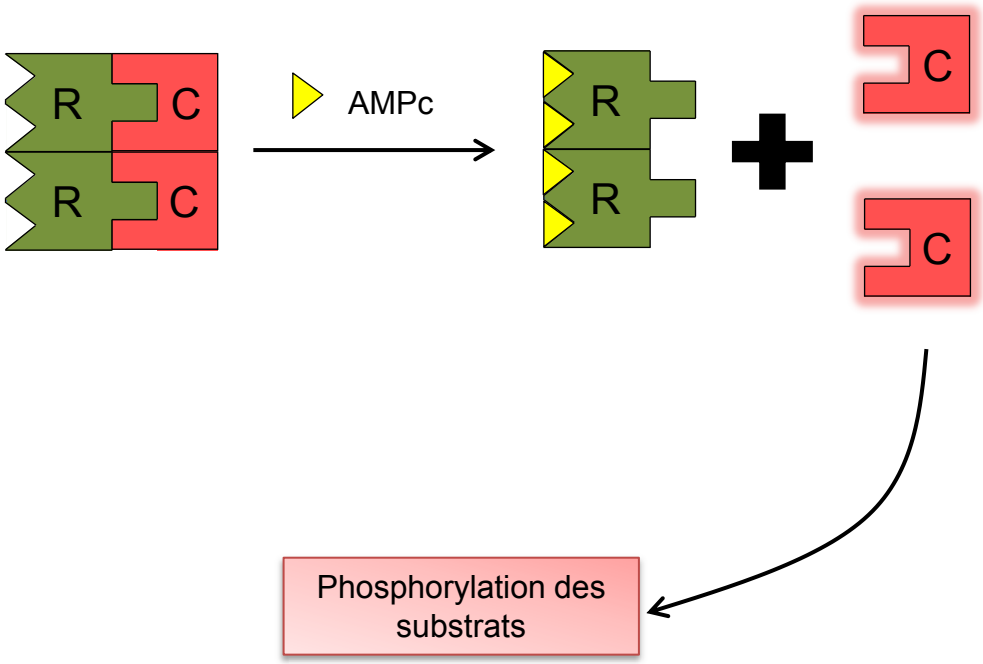



**<u>Figure 25</u> : Modèle de distribution spatiale de l'AMPc dans le spermatozoïde.**

Les $G_{\alpha s}$ sont présentes dans la tête et activent les tmACs qui produisent alors de l'AMPc pouvant être impliquée dans la réaction acrosomique. Au niveau du flagelle, sAC est responsable de la production d'AMPc permettant l'activation de la PKA et donc le déclenchement de la voie de signalisation de la capacitation. tmAC : adénylate cyclase transmembranaire, sAC : adénylate cyclase soluble. D'après *Wertheimer et al., 2013*.

### b-2) Les adénylate cyclases transmembranaires

La fonction et l'existence même d'adénylate cyclases transmembranaires dans le spermatozoïde sont depuis longtemps controversées malgré de nombreuses études à ce sujet. Des recherches mettent en évidence leur présence (Fraser and Dudley, 1999; Livera et al., 2005; Wertheimer et al., 2013), tandis que d'autres l'infirment (Brenker et al., 2012; Cheng and Boettcher, 1979; Forte et al., 1983; Rojas and Bruzzone, 1992). Les modèles murins invalidés pour les tmACs *Adcy1*, *5*, *6* et *8* sont fertiles. Les souris invalidées pour *Adcy7* présentent une mortalité post-natale ne permettant pas d'évaluer leur fertilité (Duan et al., 2010) et les modèles invalidés pour *Adcy2* et *9* ne sont aujourd'hui pas disponibles. Les souris knock-out pour *Adcy3* sont subfertiles mais leur infertilité pourrait être due à un défaut de développement spermatique (Livera et al., 2005) et/ou à une altération du comportement de reproduction (Wang et al., 2006). Les tmACs sont activées par la forskoline et la majorité des études réalisées ne montrent pas d'augmentation de l'AMPc après incubation avec cette molécule. Ceci suggère l'absence de ces enzymes au sein du spermatozoïde. Cependant, il est possible que les effets de la forskoline soient masqués par les niveaux endogènes élevés d'AMPc synthétisés par sAC de manière indépendante de la forskoline. Une étude récente a permis de clarifier ces différentes données. En effet, l'utilisation de la forskoline dans un contexte invalidé pour *Adcy10* (sAC) a permis de mettre en évidence une augmentation des niveaux d'AMPc (Wertheimer et al., 2013). Les tmACs étant activés par les protéines G, la présence de $G_{\alpha s}$ au niveau de l'acrosome étaye l'hypothèse de la présence d'une tmAC à cet endroit, hypothèse qui est renforcée par l'augmentation des réactions acrosomiques et de la concentration calcique en présence de forskoline sur des spermatozoïdes capacités (Wertheimer et al., 2013). Ainsi, la synthèse et les voies de signalisation dépendantes de l'AMPc seraient compartimentalisées, avec la présence d'une tmAC au niveau de la tête jouant un rôle dans la réaction acrosomique et de sAC au niveau flagellaire participant au déclenchement des voies de signalisation de la (**Figure 25**).




**<u>Figure 26</u> : Mode d'activation de la PKA.**

A l'état basal, les sous-unités régulatrices (R) sont liées aux sous-unités catalytiques (C), ce qui inhibe leur activité. La fixation d'AMPc aux sous-unités régulatrices conduit au relargage des sous-unités catalytiques qui peuvent alors phosphoryler leurs substrats.

### b-3) Régulation de la concentration d'AMPc

Comme nous l'avons dit précédemment, les niveaux d'AMPc augmentent fortement mais transitoirement après induction de la capacitation. Ces niveaux sont régulés par les enzymes phosphodiestérases (PDE). Il existe 11 familles de PDE chez les mammifères et les PDE 1, 4, 6, 8, 10 et 11 sont présentes sur les gamètes mâles. Chez l'homme l'inhibition de PDE4 favorise la mobilité spermatique sans affecter la réaction acrosomique, tandis que l'inhibition de PDE1 stimule sélectivement la réaction acrosomique (Fisch et al., 1998), alors que dans les deux cas une augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc est observée (Baxendale and Fraser, 2005). Ces résultats indiquent une nouvelle fois que la concentration en AMPc est finement régulée de manière régionalisée. Dans cette optique, les PDE pourraient jouer le rôle de barrière selon leur localisation subcellulaire en créant des microdomaines pour limiter la diffusion de l'AMPc.

La cible la mieux caractérisée de l'AMPc est la protéine kinase A (PKA), une enzyme présentant un rôle central dans le processus de capacitation.

### c) La protéine kinase A

La protéine kinase A est un hétérotétramère composé de deux sous-unités catalytiques (C) qui contiennent le site actif de l'enzyme, et de deux sous-unités régulatrices (R) bloquant l'activité de la PKA lorsqu'elles sont liées aux sous-unités (C). La fixation de l'AMPc aux sous-unités (R) induit le relargage des sous-unités (C) qui deviennent ainsi actives (**Figure 26**). Chez les mammifères, il existe 4 gènes codant les sous-unités (R), (*RIa*, *RIβ*, *RIIa*, *RIIβ*) et 5 gènes codant les sous-unités (C), (*PRKACA*, *PRKACB*, *PRKACG*, *PRKX*, *PRKY*) donnant les isoformes Cα (2 variants), Cβ (10 variants), Cγ, PRKX et PRKY (les fonctions de Cγ, PRKX et PRKY ne sont pas connues - (Søberg et al., 2013).

Durant la spermatogénèse seules les formes RIα, RIIα, Cα1, Cα2 et Cγ sont produites. RIα est exprimée à tous les stades des cellules germinales tandis que l'expression de RIIα est restreinte aux stades tardifs, pouvant indiquer un rôle de cette forme dans les fonctions

spermatiques. L'expression de Cα1 décroît dans les spermatocytes méiotiques pour être complètement remplacée par le variant d'épissage Cα2 dont l'expression est restreinte au spermatozoïde (Burton and McKnight, 2007)

### c-1) Activation et rôle de la PKA au cours de la capacitation

Différentes études ont démontré que l'activation de la PKA avait lieu moins d'une minute après l'exposition des spermatozoïdes au bicarbonate et conduisait à la sérine/thréonine phosphorylation de nombreux substrats. Le rôle du bicarbonate dans cet effet suggère fortement que sAC est à l'origine de cette activation *via* la production d'AMPc au niveau flagellaire (Battistone et al., 2013; Harrison, 2004). L'utilisation de molécules inhibant l'activité de la PKA a permis de mettre en évidence son rôle majeur dans la capacitation. Les inhibiteurs H-89 ou Rp-cAMPS bloque l'augmentation de la tyrosine phosphorylation associée à la capacitation (Visconti et al., 1995b). Les modèles murins ont également apporté de précieuses informations sur le rôle de la PKA. Les souris invalidées complètement pour le gène *Ca* sont infertiles mais présentent d'autres altérations empêchant d'évaluer efficacement le phénotype de reproduction (Skålhegg et al., 2002). L'invalidation spécifique du variant *Ca2* a permis de pallier ce défaut. Ces souris présentent un phénotype uniquement reproducteur et leur stérilité est reliée à des défauts de mobilité et de tyrosine phosphorylation (Nolan et al., 2004), témoignant de l'importance de la PKA dans le processus de capacitation.

### c-2) Régulation de l'activité PKA

La PKA a de multiples substrats au sein de la cellule, son activité doit donc être dirigée car tous les substrats ne sont pas systématiquement phosphorylés. Les protéines AKAPs (*A Kinase Anchoring Proteins*) sont une famille de protéines qui ont la capacité de lier les sous-unités (R) de la PKA, permettant le confinement de son activité à des localisations subcellulaires précises (Carnegie et al., 2009). Les protéines AKAP3 (Carr et al., 2001) et AKAP4 (Carrera et al., 1994) sont spécifiques du spermatozoïde, présentes sur le flagelle et sont phosphorylées au cours

de la capacitation. Les souris invalidées pour *Akap4* sont infertiles et présentent des défauts morphologiques au niveau du flagelle ainsi qu'une diminution de la mobilité progressive (Miki et al., 2002).

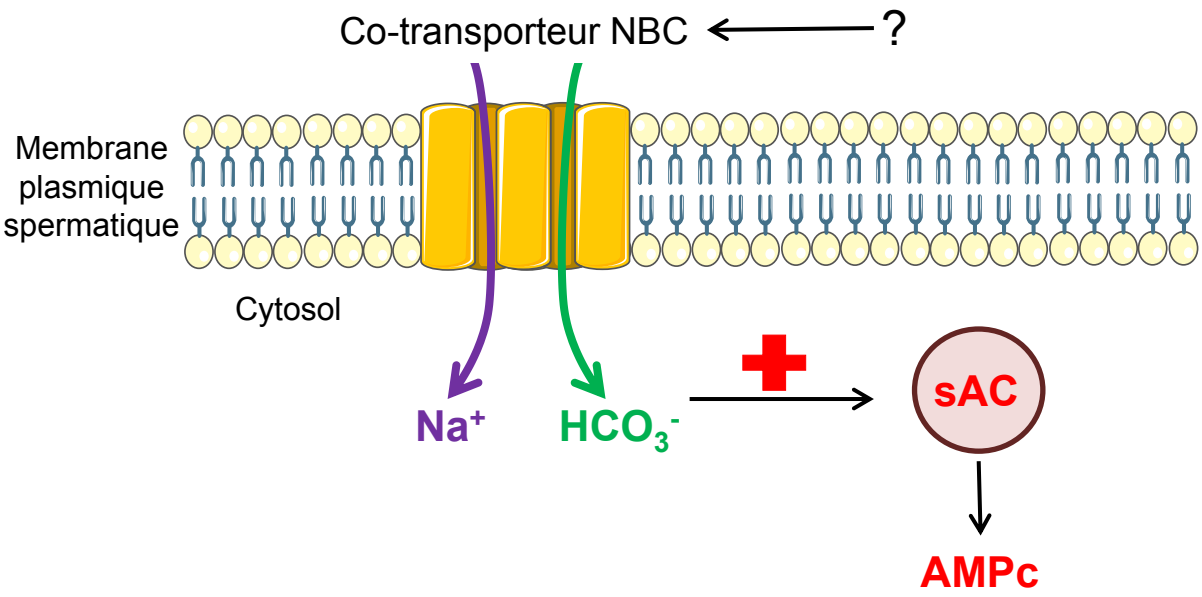
Les spermatozoïdes sont incapables de synthétiser de nouvelles protéines. L'activation de voies de signalisation se fait donc quasi exclusivement *via* des modifications post-traductionnelles comme celles induites par la PKA. L'activation de ces enzymes nécessite néanmoins des signaux extérieurs permettant au spermatozoïde de déclencher ces voies de signalisation. Lors de l'éjaculation, le spermatozoïde va rencontrer un milieu présentant une composition ionique très différente de celle du fluide épididymaire dans lequel il était stocké. Ces concentrations ioniques et les flux qui en résultent vont constituer un signal majeur de déclenchement de la capacitation.

### *2- Les flux ioniques*

Ces flux vont concerner différentes espèces ioniques et font intervenir de multiples canaux.

#### a) Le bicarbonate

L'utilisation du bicarbonate ($HCO_3^-$) dans les milieux de culture est devenue quasi universelle grâce au pouvoir tampon qu'il confère lors des incubations sous $CO_2$. Son importance dans la capacitation a été clairement identifiée depuis de nombreuses années, puisque son remplacement par de l'HEPES dans le milieu capacitant ne permet pas d'assurer la capacitation et la fécondation (Lee and Storey, 1986), sans que le rôle précis du bicarbonate ne soit identifié. Quelques années plus tôt, une équipe de recherche avait démontré le rôle du bicarbonate dans l'acquisition de la mobilité *via* l'augmentation de la synthèse d'AMPc (Okamura and Sugita, 1983; Okamura et al., 1985), bien qu'à ce moment l'adénylate cyclase soluble sAC responsable de cette augmentation n'était pas encore découverte (Buck et al., 1999). L'activation directe de sAC par le bicarbonate a été mise en évidence plus tard (Chen et al., 2000).




**<u>Figure 27</u> : Modèle de fonctionnement du transporteur NBC au cours de la capacitation.**

Le co-transporteur NBC permet l'entrée de sodium et de bicarbonate dans le spermatozoïde (stœchiométrie de 1:2 ou 1:3), ce qui pourrait participer à l'activation de sAC entraînant la production d'AMPc. Les évènements conduisant à l'activation de NBC ne sont pas connus, bien que l'efflux de cholestérol pourrait y participer. D'après *Demarco et al., 2003*. NBC : sodium bicarbonate co-transporteur, sAC : adénylate cyclase soluble.

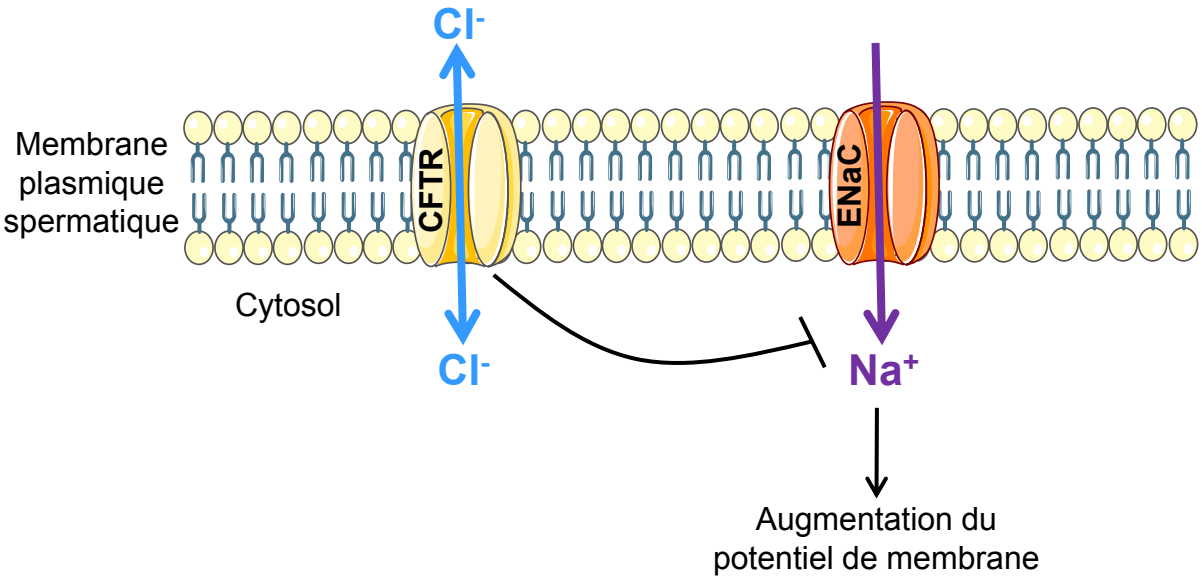
La majorité des études évoquant les flux de bicarbonate se concentrent sur les modifications de pH engendrées par ces flux. Comme nous l'avons précisé précédemment, le bicarbonate a des effets directs sur l'activation de l'adénylate cyclase et l'étude de ses flux ne peut se résumer à une étude des variations de pH qui sont induites par le changement de concentration de nombreux ions au cours de la capacitation. Cependant les mécanismes par lesquels le bicarbonate est transporté dans le spermatozoïde au cours de la capacitation ne sont toujours pas réellement établis aujourd'hui et semblent faire intervenir plusieurs canaux avec des différences inter-espèces.

### a-1) Le co-transporteur sodium/bicarbonate NBC

La présence du co-transporteur NBC1 était connue depuis longtemps sur les spermatozoïdes de rat (Jensen et al., 1999). Une étude réalisée chez la souris a montré l'importance du sodium ($Na^+$) dans les flux de bicarbonate démontrant également la présence d'un co-transporteur $Na^+/HCO_3^-$ dans les spermatozoïdes murins (Demarco et al., 2003). Cependant, peu d'études ont été réalisées sur ce transporteur et les mécanismes conduisant à son activation et à sa régulation au cours de la capacitation ne sont pas connus. Il semble que NBC1 soit responsable de l'augmentation rapide de bicarbonate en début de capacitation, à l'origine de l'activation de sAC (**Figure 27**). Cependant, son activité n'est pas suffisante pour maintenir les niveaux élevés de bicarbonate au cours de la capacitation, ce qui nécessite donc l'intervention d'autres transporteurs.

### a-2) Les échangeurs chlore/bicarbonate

Plus récemment d'autres équipes ont identifié l'importance du chlore ($Cl^-$) au cours du processus de capacitation et des évènements associés, suggérant sa possible implication dans les flux de bicarbonate. Deux équipes ont mis en évidence la présence du canal chlore CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) sur les spermatozoïdes humains et murins et son implication dans les évènements de capacitation associés à l'entrée de bicarbonate (Hernández-

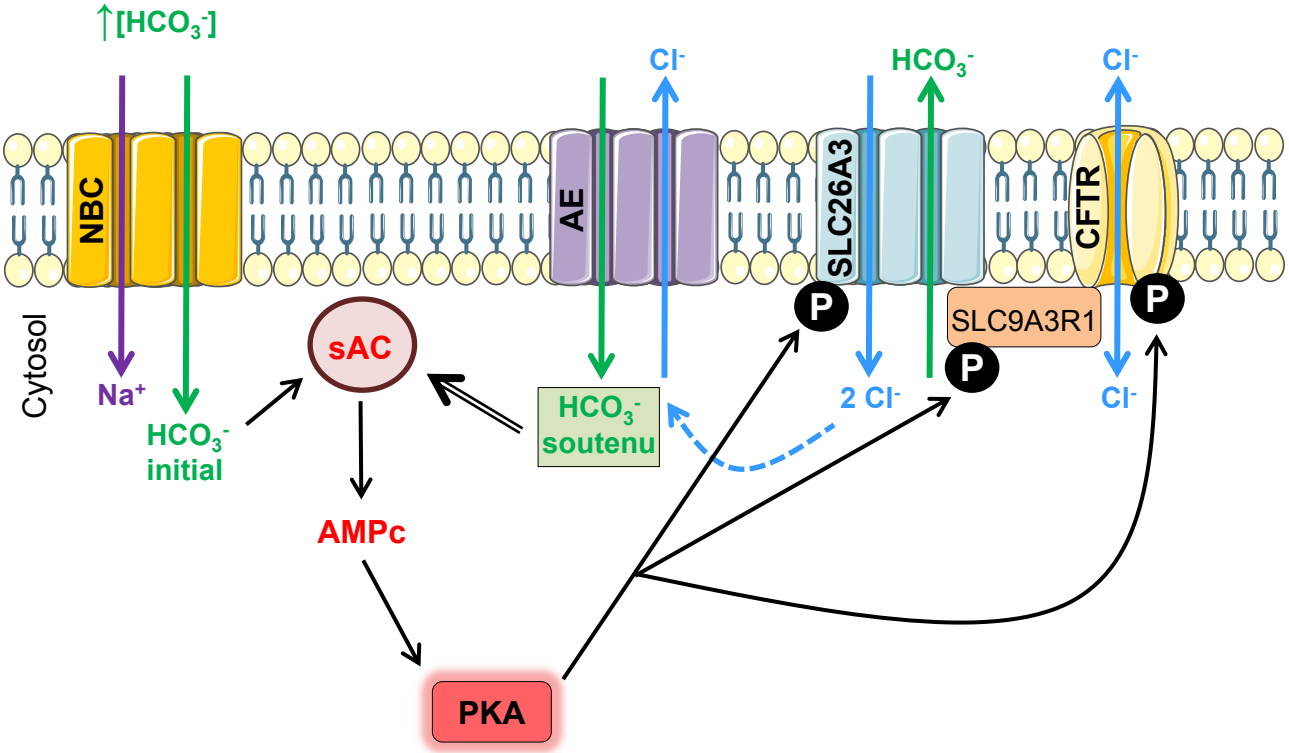



**<u>Figure 28</u> : Modèle de régulation de ENaC par CFTR au cours de la capacitation.**

L'activation de CFTR au cours de la capacitation conduit à l'inhibition de ENaC ce qui favorise l'augmentation du potentiel de membrane. D'après *Hernández-González et al., 2007*. CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, ENaC : Epithelial $Na^+$ Channel.

González et al., 2007; Xu et al., 2007). Ce canal est connu dans d'autres types cellulaires comme étant capable de transporter le bicarbonate (Kim and Steward, 2009; Tang et al., 2009). Cependant, l'implication directe de CFTR dans les flux de bicarbonate ou leur régulation dans le spermatozoïde n'a pu être démontrée. CFTR favoriserait également l'hyperpolarisation membranaire en inhibant ENaC (*Epithelial* $Na^+$ *Channel*), un canal sodique impliqué dans la dépolarisation du potentiel de membrane (voir II-B-b5 - (Hernández-González et al., 2007) - **Figure 28**). Bien que l'existence d'échangeurs de chlore et de bicarbonate dans les spermatozoïdes matures ait été démontrée depuis de nombreuses années, leur identité est longtemps resté méconnue (Zeng et al., 1996). Les études de plusieurs équipes ont permis de mettre en évidence l'implication des canaux SLC26A (*SoLute Carrier*, échangeur $Cl^-/HCO_3^-$) dans ces flux ioniques. Des travaux chez le cochon d'inde ont déterminé la présence de SLC26A3 sur le gamète mâle. L'inhibition de ce canal altère la capacitation, démontrant son rôle dans ce processus (Chen et al., 2009). Les auteurs émettent l'hypothèse d'une relation étroite entre CFTR et SLC26A3, CFTR fournissant une voie de recyclage du chlore assurant ainsi le fonctionnement de SLC26A3. Cependant ces deux canaux n'étant pas localisés au même endroit sur le spermatozoïde, une réelle interaction entre ces protéines semblait difficile.

Une étude des spermatozoïdes murins a au contraire mis en évidence une localisation commune de SLC26A3, CFTR et SLC9A3R1 (un facteur régulateur) au niveau de la pièce intermédiaire (Chávez et al., 2012), démontrant même leur interaction physique. Ces résultats semblent indiquer que ces canaux ioniques sont regroupés en un gros complexe agissant sur la régulation des flux de chlore et de bicarbonate. Les auteurs proposent alors un modèle de régulation de ces flux. Dans les voies génitales femelles, le spermatozoïde rencontre des niveaux élevés de bicarbonate, entraînant une augmentation initiale d'$HCO_3^-$ intracellulaire *via* les NBC. L'adénylate cyclase est alors activée et les niveaux d'AMPc augmentés, entraînant l'activation de la PKA. Le complexe SLC26A3/CFTR est alors stimulé par phosphorylation et entraîne l'entrée de $Cl^-$ dans le gamète. Cette augmentation de chlore intracellulaire soutient l'entrée de bicarbonate




**<u>Figure 29</u> : Modèle représentant les mouvements de chlore et de bicarbonate au cours de la capacitation.**

L'augmentation de la concentration externe en $HCO_3^-$ entraîne une élévation initiale de $[HCO_3^-]_i$ *via* NBC provoquant une activation de sAC et une augmentation de l'AMPc conduisant à activer la PKA. La PKA phosphoryle ses cibles et active le complexe CFTR-SLC26A3-SLC9A3R1. Ce complexe transporte le $Cl^-$ dans le spermatozoïde et l'augmentation de $[Cl^-]_i$ fournit une force motrice pour soutenir l'entrée de $HCO_3^-$ *via* un échangeur d'anion. La $[HCO_3^-]_i$ élevée maintient alors l'activation de sAC nécessaire à la capacitation. D'après *Chávez et al., 2012*. NBC : sodium bicarbonate co-transporteur, sAC : adénylate cyclase soluble, PKA : protéine kinase A, AE : anion exchanger, CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, SLC26A3 : Solute Carrier A3.

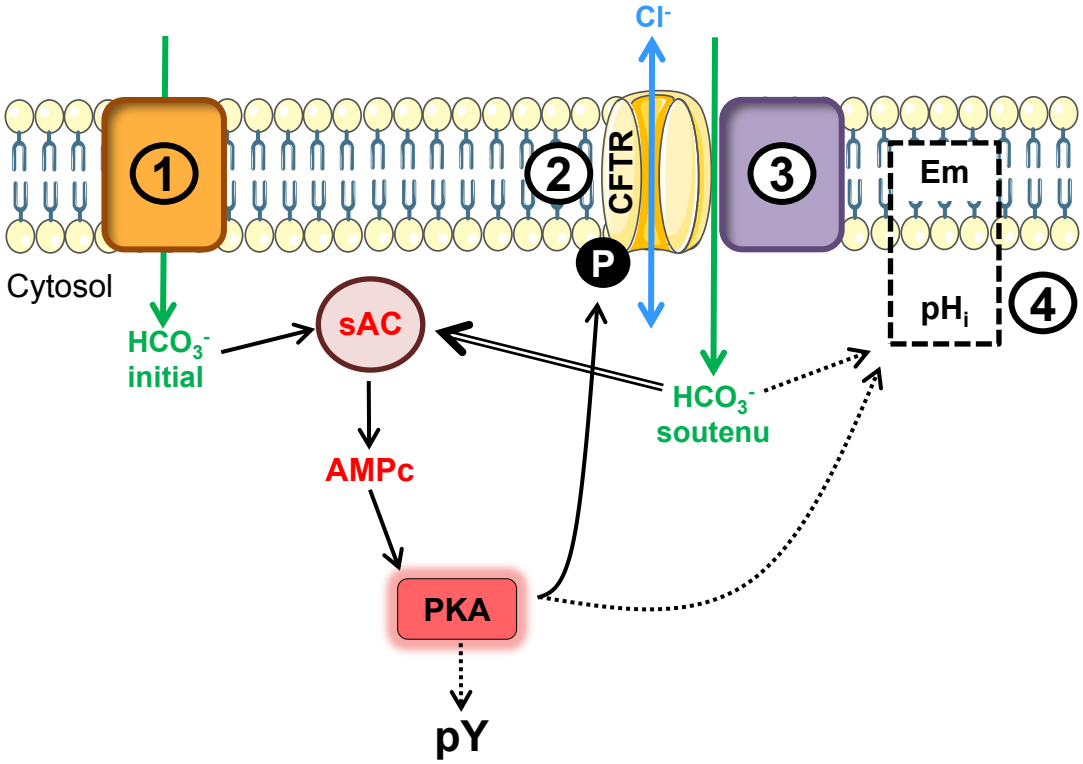
*via* un échangeur $Cl^-$/ $HCO_3^-$ maintenant des niveaux élevés d'AMPc nécessaires à la capacitation. Là encore, CFTR ne semble donc pas directement impliqué dans le transport d' $HCO_3^-$ (**Figure 29**).

Le même type d'interaction a également été mis en évidence entre CFTR et SLC26A8 (ou TAT1 pour *Testis Anion Transporter 1*) sur le spermatozoïde murin (Rode et al., 2012).

Peu d'études concernent les flux de bicarbonate dans le spermatozoïde humain mais des spécificités inter-espèces semblent exister puisque NBC n'est pas responsable de la première augmentation du bicarbonate (le transporteur n'est pas identifié). CFTR est également requis pour déclencher les évènements de capacitation associés au bicarbonate chez l'homme, bien que là encore il ne semble pas directement responsable de ces flux, mais travaillerait en coopération avec les SLC26 (Puga Molina et al., 2016). Une boucle de régulation se forme au cours de la capacitation entre la PKA et CFTR puisque ce dernier est nécessaire à l'activation de la PKA. Cette dernière phosphoryle ensuite CFTR pour soutenir son activité (**Figure 30**). CFTR a donc un rôle primordial pour la fertilité et en particulier chez l'homme. Chez l'homme, les mutations de CFTR qui diminuent ou abolissent son activité entraînent la mucoviscidose et 97% des patients masculins sont infertiles en raison d'une absence congénitale bilatérale des canaux déférents. De plus, il existe une incidence élevée des mutations de CFTR chez les hommes infertiles, indiquant sa participation dans d'autres évènements relatifs à la fécondation comme la capacitation (Schulz et al., 2006).

### a-3) Anhydrase carbonique

En plus des transporteurs ioniques décrits précédemment, les cellules sont également dépendantes des anhydrases carboniques (CA) pour réguler leur $pH_i$. Ces enzymes sont ubiquistes et présentes dans tous les êtres vivants. Leur principale fonction est de catalyser la réaction réversible d'hydratation du dioxyde de carbone pour conduire à la production de bicarbonate ($CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$). Malgré l'importance de cette enzyme dans tous les types cellulaires et son implication dans la production de bicarbonate, son rôle dans la



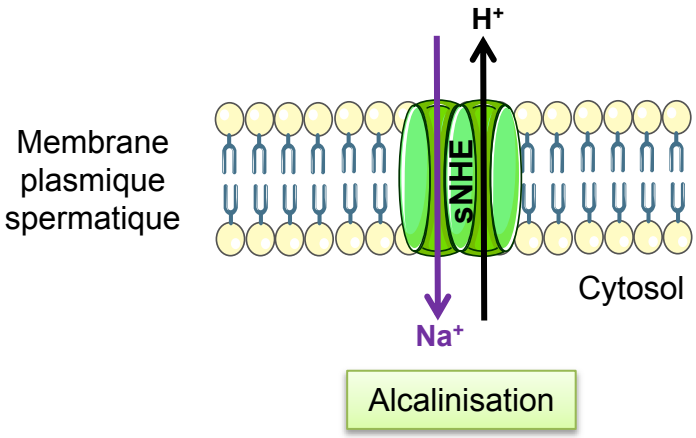

**<u>Figure 30</u> : Modèle présentant la participation de CFTR à la voie de signalisation de la capacitation chez l'homme.**

Chez l'homme, un flux rapide et transitoire d'$HCO_3^-$ par un canal inconnu permet de stimuler sAC et d'augmenter les concentrations intracellulaires d'AMPc (1). L'augmentation de l'activité de la PKA conduit à la phosphorylation et donc l'activation de CFTR (2). L'$HCO_3^-$ peut alors être transporté soit directement par CFTR lui-même soit indirectement en fournissant une voie de recyclage du $Cl^-$ pour des co-transporteurs $Cl^-/HCO_3^-$ associés à CFTR (3). La modulation du potentiel de membrane par CFTR peut être expliquée par son influence sur le transport d'$HCO_3^-$ ou par son association avec d'autres transporteurs comme ENaC (4). Comme le pHi, le potentiel de membrane et l'activité de CFTR dépendent de la PKA, les auteurs proposent une boucle de régulation entre la PKA et CFTR dans les spermatozoïdes humains. D'après *Puga Molina et al., 2016*. sAC : adénylate cyclase soluble, PKA : protéine kinase A, CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, pY : tyrosine phosphorylation, Em : potentiel de membrane.

capacitation est très peu étudié. Des études ont montré que les spermatozoïdes humains et murins augmentaient la fréquence de leurs battements flagellaires en présence de $CO_2$ et que cet effet était inhibé en présence d'éthoxyzolamide, un inhibiteur spécifique des CAs (Mannowetz et al., 2012; Wandernoth et al., 2010). Les formes CAII et CAIV sont présentes dans le gamète mâle, CAII est intracellulaire et acquise dans le testicule tandis que CAIV est extracellulaire (liée à la membrane par une ancre GPI) et son acquisition se fait au cours du transit dans le corps de l'épididyme (Ekstedt et al., 2004). Cependant, bien que leur inhibition ou leur invalidation chez la souris diminue la réponse au $CO_2$ précédemment décrite, elle ne conduit pas à un phénotype d'infertilité. Récemment, le modèle murin invalidé pour les deux CAs (II et IV) a permis de montrer l'importance des anhydrases carboniques dans la physiologie spermatique (Wandernoth et al., 2015). Les spermatozoïdes de ces souris sont peu mobiles, ce qui compromet la fertilité *in vivo*. Cependant ni le pHi ni la tyrosine phosphorylation ne sont altérés au cours de la capacitation dans ce modèle. Ces enzymes participent donc au développement de la mobilité spermatique mais leurs rôles précis dans la capacitation et la régulation des concentrations en bicarbonate restent à démontrer.

#### b) Alcalinisation et hyperpolarisation membranaire

Au cours de son voyage vers l'ovocyte, le spermatozoïde va rencontrer un environnement avec une composition ionique très différente de la sienne et du fluide épididymaire qu'il vient de quitter. Le gamète doit alors réguler finement les échanges ioniques de part et d'autre de sa membrane. Au cours de la capacitation, le pH intracellulaire du spermatozoïde augmente et entraîne une alcalinisation de son milieu intracellulaire. Ce mécanisme a été rapporté chez plusieurs espèces de mammifères (Babcock et al., 1983; Nakanishi et al., 2001; Vredenburgh-Wilberg and Parrish, 1995; Zeng et al., 1996), et est essentiel puisqu'il participe à l'activation des voies de signalisation intracellulaires mises en place au cours du processus de capacitation et prépare à la réaction acrosomique. De plus, au cours de la capacitation le potentiel de membrane du gamète est également modifié puisqu'on observe une hyperpolarisation membranaire. Ce




**<u>Figure 31</u> : Schématisation du transporteur sNHE.**

Le transporteur sNHE réalise l'échange d'un $Na^+$ et d'un $H^+$ favorisant l'alcalinisation du milieu intracellulaire. sNHE : sperm $Na^+/H^+$ exchanger.

changement du potentiel membranaire sera nécessaire pour le déclenchement de la réaction acrosomique (Arnoult et al., 1999; Zeng et al., 1995).

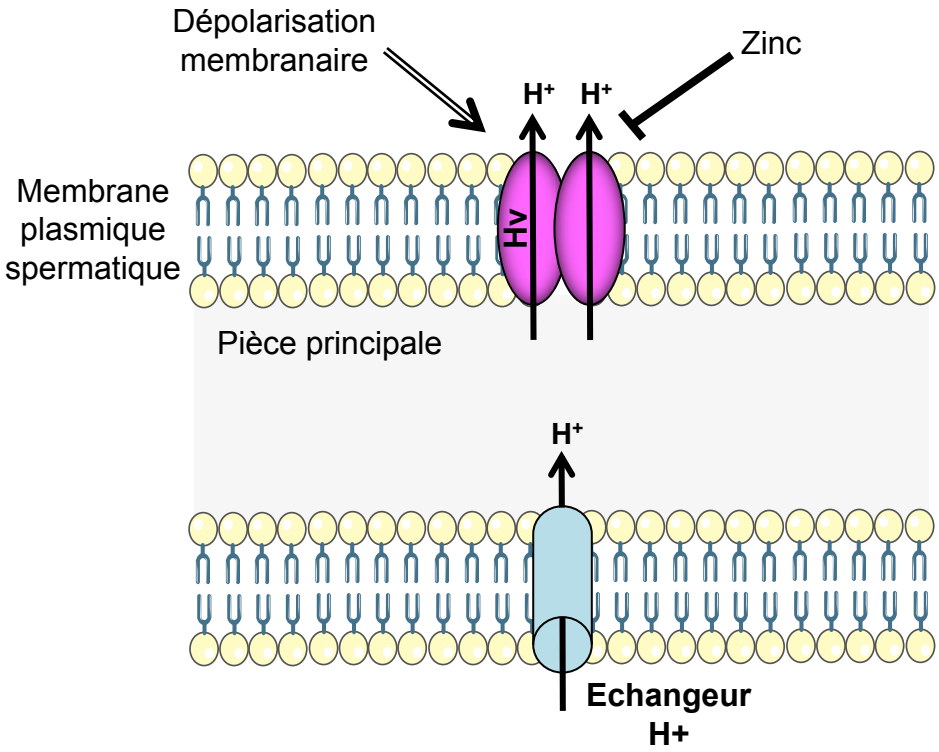
### b-1) Les échangeurs $Na^+/H^+$ (NHEs)

Les échangeurs $Na^+/H^+$ (NHEs) catalysent l'échange d'un proton pour un sodium (**Figure 31**). Chez les mammifères, la famille de gènes SLC9 code pour 13 *Nhe* dont 4 sont présents dans le spermatozoïde : NHE1 (SLC9A1), NHE5 (SLC9A5 - (Garcia and Meizel, 1999; Woo et al., 2002), une forme spécifique du spermatozoïde sNHE (SLC9C1 - (Wang et al., 2003) et NHA1, une forme spécifique du testicule (*$Na^+/H^+$ Antiporter* - SLC9B1- (Liu et al., 2010).

sNHE est essentiel pour le bon fonctionnement du spermatozoïde puisque son élimination entraîne une infertilité chez la souris, due à un sévère défaut de mobilité (Wang et al., 2003). L'alcalinisation intracellulaire *via* l'ajout de $NH_4Cl$ permet de partiellement compenser les défauts de mobilité, indiquant le rôle de sNHE dans les modifications de pH. De plus, il semble que sNHE et sAC soient en association étroite, sNHE possédant un domaine prédit de liaison aux nucléotides cycliques.

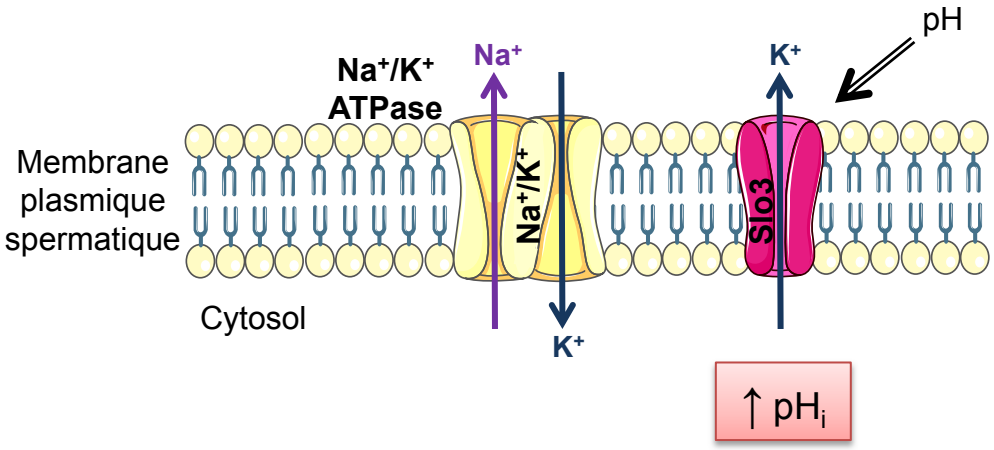
### b-2) Le canal $H^+$ voltage dépendant (Hv)

Le canal Hv est formé d'un homodimère où chaque sous-unité forme un pore perméable aux protons. Ce canal est activé par dépolarisation membranaire et par le gradient de protons de part et d'autre de la membrane (Ramsey et al., 2006). De plus, le zinc est connu pour inhiber son activité, lui conférant un rôle de facteur décapacitant dans le fluide séminal humain où les concentrations en zinc sont élevées (Aonuma et al., 1981). La dilution du liquide séminal dans les sécrétions du tractus génital femelle potentialiserait donc son activité (**Figure 32**). Enfin, Hv est fortement activé au cours de la capacitation *in vitro*, suggérant qu'il pourrait être phosphorylé au cours de ce processus (Lishko et al., 2010). Cette hypothèse est renforcée par le fait que la phosphorylation est le premier mécanisme de régulation de Hv dans d'autres tissus (Musset et al., 2010). Contrairement aux spermatozoïdes humains, les gamètes murins montrent un très faible




**<u>Figure 32</u> : Schématisation du canal $H^+$ voltage dépendant.**

Les protons s'accumulent dans le flagelle du spermatozoïde *via* un échangeur de protons, l'hydrolyse de l'ATP et la glycolyse. La sortie rapide des protons est permise par les canaux Hv voltage dépendant présents sur la pièce principale des spermatozoïdes humains. D'après *Lishko et al., 2012*.




**<u>Figure 33</u> : Schématisation de la pompe $Na^+/K^+$ ATPase et du canal Slo3.**

La pompe Na+/K+ ATPase et le canal potassique Slo3 participent à l'alcalinisation du milieu intracellulaire du spermatozoïde. Ces deux acteurs sont essentiels au bon déroulement de la capacitation. D'après *Jin and Yang., 2016*. Slo3 : Slowpoke homolog 3.

courant $H^+$ (Lishko et al., 2010), indiquant certainement que les spermatozoïdes humains et murins ne régulent pas leur pHi de la même manière ce qui pourrait expliquer pourquoi les souris invalidées pour *Hv1* sont fertiles (Ramsey et al., 2009).

### b-3) Le canal $K^+$ SLO3

Le potentiel de membrane d'une cellule est déterminé par la répartition asymétrique des ions $K^+$ de part et d'autres de la membrane. Le potentiel chimique des ions potassium est en faveur d'une sortie de ces ions, l'intérieur de la cellule est donc chargé négativement au voisinage de la membrane créant un potentiel de membrane négatif. Si la sortie des ions K+ est favorisée le potentiel de membrane devient alors de plus en plus négatif entraînant une hyperpolarisation membranaire. Dans les spermatozoïdes, le canal responsable de la sortie des ions potassium est le canal SLO3 (*Slowpoke homolog 3*). Ce canal, sensible au pH, a tout d'abord été décrit chez la souris (**Figure 33** - (Schreiber et al., 1998). L'activité de ce canal est essentielle pour la capacitation comme en témoignent le phénotype des souris invalidées pour *Slo3*. Ces souris sont infertiles, ne développent pas d'hyperpolarisation membranaire au cours de la capacitation et présentent une diminution des réactions acrosomiques. La mobilité est altérée et les spermatozoïdes présentent des anomalies morphologiques, en particulier lors d'un challenge en milieu hypotonique (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011). Chez l'homme, les courants potassiques semblent assurés par deux canaux SLO3 et SLO1 (López-González et al., 2014; Sánchez-Carranza et al., 2015).

### b-4) L'échangeur $Na^+/K^+$-ATPase

Les canaux $K^+$ décrit précédemment engendrent la fuite de potassium à l'origine de l'hyperpolarisation membranaire. Afin que les différences de concentrations ioniques de part et d'autres de la membrane soient maintenues pour garantir l'hyperpolarisation, l'existence de mécanismes permettant l'entrée du potassium dans la cellule est nécessaire. C'est le rôle des échangeurs $Na^+/K^+$-ATPase qui permettent l'entrée de potassium dans la cellule en échange de sodium. Bien qu'une activité $Na^+/K^+$-ATPase ait été identifiée depuis longtemps au sein du

gamète mâle (Uesugi and Yamazoe, 1966), l'existence d'une sous-unité spécifique du spermatozoïde n'a été mise en évidence que plus tard : la $Na^+/K^+$-ATPase α4 (**Figure 33** - (Shamraj and Lingrel, 1994). L'inhibition sélective de cette isoforme par l'ouabaïne a montré l'importance de cette protéine pour la mobilité spermatique (Jimenez et al., 2010; Sanchez et al., 2006; Woo et al., 2000), sans que son rôle précis dans ces mécanismes ne soit identifié. Les souris transgéniques invalidées pour le gène *Atp1a4* codant pour l'isoforme α4 ont permis de mettre en évidence la fonction essentielle de cet échangeur dans la fertilité, l'hyperactivation flagellaire et l'hyperpolarisation membranaire au cours de la capacitation (Jimenez et al., 2011). Il est intéressant de noter que son activité est augmentée au cours de la capacitation (Jimenez et al., 2012).

### b-5) ENaC

Alors que certains flux ioniques sont responsables de l'hyperpolarisation membranaire au cours de la capacitation, d'autres maintiennent au contraire la membrane dépolarisée en dehors de l'activation du spermatozoïde. C'est le cas des transporteurs de sodium ENaCs (*Epithelial* $Na^+$ *Channels*), canaux hétérotrimériques formés par la combinaison de 4 sous-unités α, β, γ ou δ (Alvarez de la Rosa et al., 2000). Des auteurs ont en effet montré qu'en absence de calcium, les spermatozoïdes subissaient une forte dépolarisation du potentiel de membrane. Cette dépolarisation est inhibée en absence de sodium indiquant le rôle de ce dernier dans le maintien de l'état dépolarisé (González-Martínez, 2003). Plusieurs indications ont amené les auteurs à suspecter le rôle des ENaCs dans ce phénomène (blocage par de l'amiloride ou activation par acidification du milieu extérieur). En effet ENaC-α et ENaC-δ ont été identifiés chez la souris sur la pièce intermédiaire et la partie antérieure de la tête spermatique respectivement (Hernández-González et al., 2006). La présence de seulement deux sous-unités présentant une localisation distincte pourrait suggérer qu'ENaC est sous forme homodimérique dans le spermatozoïde et que la régulation des flux de sodium est régionalisée. L'incubation de spermatozoïdes dans un milieu qui supporte la capacitation inhibe la dépolarisation induite par le sodium. Ce résultat

indique qu'ENaC est inhibé au cours de la capacitation et que cette inhibition participe à l'hyperpolarisation membranaire (Escoffier et al., 2012). Les analogues d'AMPc étant capables d'inhiber le courant sodium dépolarisant, il est possible que la voie de l'AMPc soit impliquée dans la régulation d'ENaC. En effet, il a été démontré que l'activation de CFTR au cours de la capacitation conduisait à l'inhibition d'ENaC, une donnée renforcée par le fait que ces deux canaux sont capables d'interagir dans d'autres types cellulaires (Greger et al., 2001; Guggino and Stanton, 2006). L'hyperpolarisation au cours de la capacitation est donc à la fois causée par l'activation de canaux responsables de l'hyperpolarisation et par l'inhibition de canaux impliqués dans la dépolarisation.

### c) Le calcium

Dans tous les types cellulaires, le calcium joue des rôles essentiels comme second messager en contrôlant de multiples processus cellulaires. Au niveau spermatique, cet ion a un rôle central dans la régulation de la mobilité et de la réaction acrosomique. Ainsi, avec l'accepteur de cholestérol et le bicarbonate, le calcium est le troisième élément absolument essentiel au déclenchement de la capacitation. Bien que la majorité des milieux capacitants contiennent en moyenne 2 mM de calcium, 100 à 200 µM sont suffisants pour capaciter un spermatozoïde murin (Fraser, 1987).

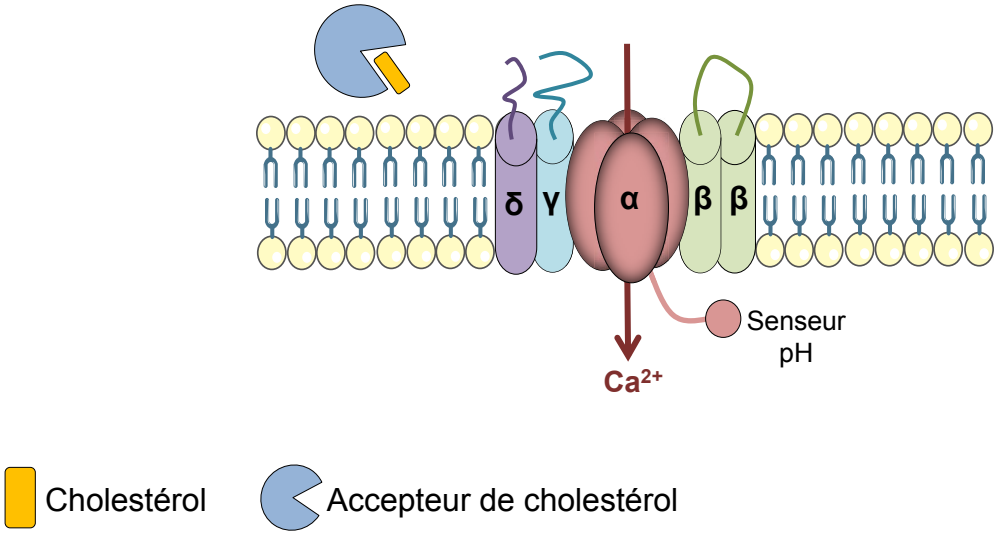
#### c-1) Les canaux calciques voltage-dépendants $Ca_v$

Avant 2001, les canaux pressentis pour être responsables des flux calciques au cours de la capacitation étaient les canaux $Ca_v$ (ou VDCC *Voltage-Dependent Calcium Channel*). Les sous-unités de ces canaux sont codées par au moins 10 gènes, et les transcrits et protéines de plusieurs types de $Ca_v$ ont été détectés au niveau spermatique chez la souris (Darszon et al., 2006). Des études électrophysiologiques avaient révélé la présence fonctionnelle de $Ca_v3$ sur les cellules germinales humaines et murines (Arnoult et al., 1996; Liévano et al., 1996; Publicover and Barratt, 1999) et sur les spermatozoïdes testiculaires murins (Martínez-López et al., 2009). Cependant les souris

invalidées pour $Ca_v2.2$ (Beuckmann et al., 2003), $Ca_v3.1$ ou $Ca_v3.2$ (Choi et al., 2007; Stamboulian et al., 2004) sont fertiles, et bien qu'un courant $Ca_v3$ ait été mesuré dans le spermatozoïde testiculaire, aucun courant n'est détectable dans le spermatozoïde épididymaire murin (Ren and Xia, 2010). Ces canaux pourraient donc ne pas être actifs dans le spermatozoïde mature, ou présenter de trop fortes redondances rendant difficile leur étude par invalidation. Cependant, les études de patch clamp sont réalisées dans des conditions non physiologiques ce qui pourrait empêcher la détection de certains courants. Les spermatozoïdes des souris invalidées pour $Ca_v2.3$ présentent une mobilité aberrante, une perturbation des flux calcique au niveau de la tête et une altération du déclenchement de la réaction acrosomique (Cohen et al., 2014; Sakata et al., 2002). Le fonctionnement de ce canal semble dépendant de son interaction avec les GM1 permise par les réarrangements lipidiques qui ont lieu au cours de la capacitation. $Ca_v2.3$ serait responsable d'un courant transitoire de calcium permettant l'amorçage de la réaction acrosomique (Cohen et al., 2014).

### c-2) Le canal anionique voltage-dépendant VDAC2

VDAC2 (*Voltage-Dependent Anion Channel*), identifiée au départ dans les mitochondries des cellules eucaryotes (Schein et al., 1976), est une protéine capable de former des pores dans une bicouche lipidique (Xu et al., 1999). Ce canal est acquis dans le testicule au stade de spermatide (Hinsch et al., 2001). Son implication dans la fertilité mâle a été démontrée de nombreuses fois (Liu et al., 2011; Paradowska et al., 2006; Petit et al., 2013; Triphan et al., 2008) sans toutefois lui attribuer un rôle précis. Des études réalisées sur des mitochondries de foie de rat ont permis de démontrer que VDAC2 était capable de transporter le calcium (Gincel et al., 2001). VDAC2 est également présent au niveau du flagelle et de la région acrosomique (Hinsch et al., 2004; Triphan et al., 2008). Une étude sur spermatozoïde a permis de montrer son implication dans les flux de calcium au cours de la capacitation (Kwon et al., 2013). Dans cette étude, le blocage de VDAC2 entraîne une diminution de la mobilité, de la tyrosine phosphorylation et du taux de réactions acrosomiques et de fécondation *in vitro*, mettant en évidence l'importance de ce canal pour la



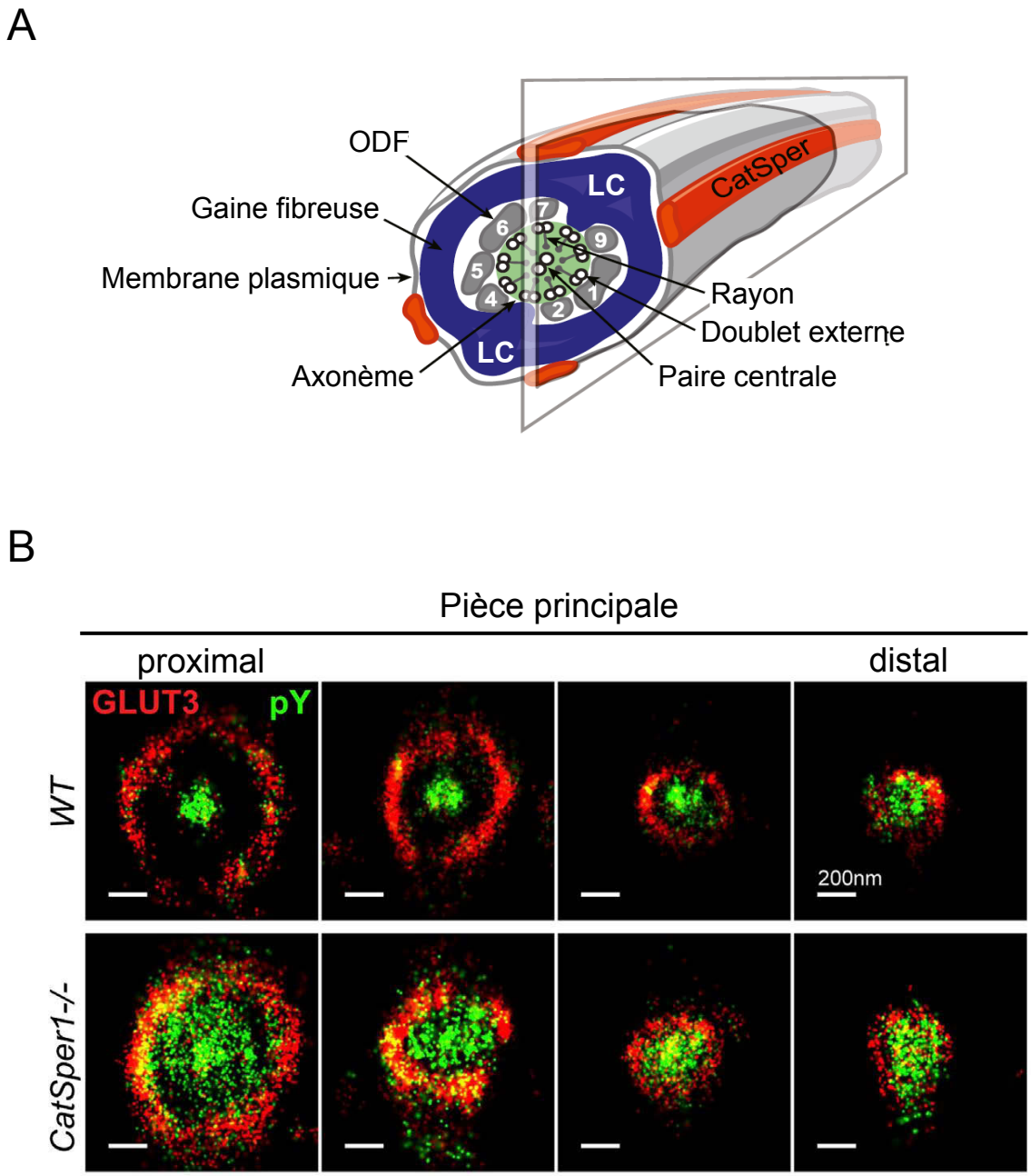

**<u>Figure 34</u> : Schématisation du canal CatSper.**

Le canal CatSper est composé de 4 sous-unités α et de trois sous-unités auxilliaires β, γ, δ. L'activité de CatSper est fortement dépendante du pH et pourrait également être dépendante de la composition lipidique de la membrane. D'après *Lishko et al., 2012*. CatSper : Cation channel of Spermatozoa.

fertilité. Cependant le rôle exact de VDAC2 dans les flux calciques ainsi que les mécanismes conduisant à sa régulation restent confus. Ce canal est également capable d'interagir avec ZP2 et 3 et pourrait donc être impliqué dans la liaison à la zone pellucide lors de la fécondation (Petit et al., 2013). Cette fonction est probablement plus en lien avec sa localisation acrosomique. VDAC2 semble donc être une « moonlighting » protéine présentant différentes fonctions probablement dépendantes de sa localisation cellulaire (Petit et al., 2014). Enfin, 30% des auto-anticorps dirigés contre les spermatozoïdes ciblent VDAC2, démontrant son implication dans des cas d'infertilité chez l'homme (Paradowska et al., 2006). VDAC2 est largement connu pour être tyrosine phosphorylé au cours de la capacitation chez l'homme (Ficarro et al., 2003), le buffle (Jagan Mohanarao and Atreja, 2012) et la souris (Arcelay et al., 2008). Bien que le rôle de cette tyrosine phosphorylation ne soit pas connu à ce jour, ces résultats sous-entendent l'implication de VDAC2 dans le processus de capacitation.

### c-3) Le canal CatSper

La découverte du canal CatSper (*Cation channel of Spermatozoa*) en 2001, canal spécifique du spermatozoïde et situé sur le flagelle, a révolutionné l'étude des flux calciques spermatiques (Ren et al., 2001). Ce canal est composé de 4 sous-unités α produites par 4 gènes distincts : *Catsper1*, *Catsper2*, *Catsper3* et *Catsper4* et de trois sous-unités auxiliaires CatSperβ, CatSperγ et CatSperδ dont le rôle précis est inconnu (**Figure 34** - (Chung et al., 2011; Ren and Xia, 2010). Les souris invalidées pour l'une des sous-unités α (Qi et al., 2007) ou pour la sous-unité auxiliaire δ (Chung et al., 2011) sont infertiles car incapables de développer une mobilité hyperactive. De plus, en l'absence de CatSper1 aucune des autres sous-unités n'est détectable dans le spermatozoïde, indiquant que toutes les sous-unités sont nécessaires pour l'assemblage correct du canal. L'absence de l'une d'entre elles pourrait ainsi conduire à la dégradation des autres protéines composant le complexe (Carlson et al., 2005; Chung et al., 2011; Liu et al., 2007; Wang et al., 2009). Enfin chez l'homme, des mutations de ce canal entraînent également une infertilité (Hildebrand et al., 2010).



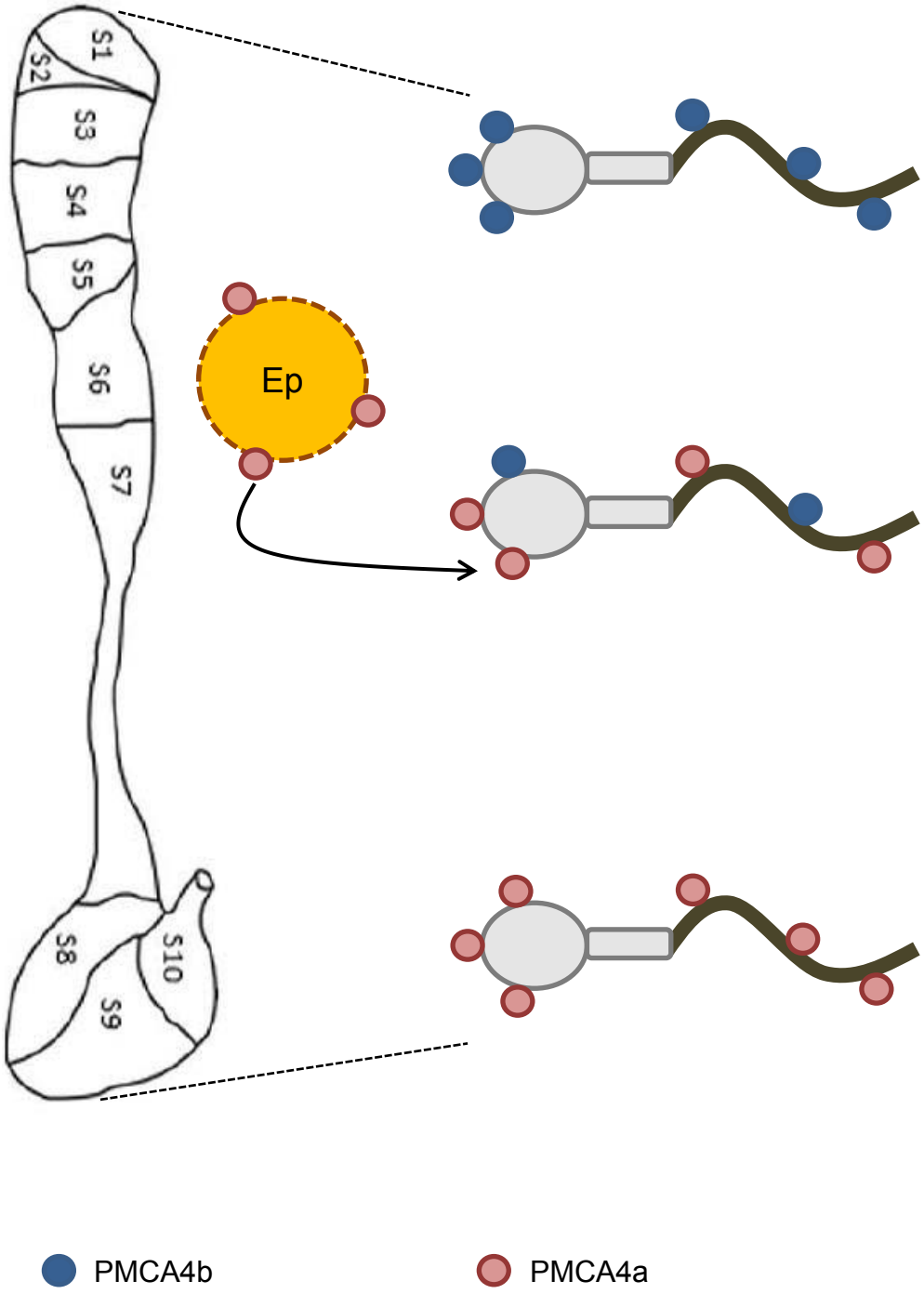

**<u>Figure 35</u> : L'organisation de CatSper sur le flagelle confine la tyrosine phosphorylation à l'axonème.**

A - Représentation de l'arrangement linéaire de CatSper le long de la pièce principale. Les domaines CatSper parcourent de chaque côté les colonnes longitudinales du flagelle.

B - L'absence de CatSper conduit à une désorganisation totale de la tyrosine phosphorylation qui n'est plus restreinte à l'axonème. La tyrosine phosphorylation est en vert et le marquage GLUT3 en rouge permet de visualiser la membrane plasmique. Issu de *Chang et al., 2014*. LC : Colonnes longitudinales, ODF : Outer Dense Fiber, WT : Wild Type, pY : tyrosine phosphorylation, GLUT3 : Glucose Transporter 3.

L'activité de CatSper est faiblement dépendante du voltage et fortement dépendante du $pH_i$ (Kirichok et al., 2006). L'alcalinisation, lors du déclenchement de la capacitation, est donc essentielle à son activation. L'albumine entraîne également un influx de calcium dépendant de CatSper dans le spermatozoïde murin (Xia and Ren, 2009), indiquant que l'ouverture du canal pourrait être dépendante de la composition lipidique de la membrane plasmique. Le canal CatSper humain est également dépendant de l'alcalinisation mais nécessite un voltage beaucoup plus élevé que celui de la souris (Kirichok et al., 2006). De plus, chez l'homme, la progestérone est capable d'induire une robuste activation de CatSper (ce qui n'est pas le cas chez la souris - (Lishko et al., 2011). La progestérone active CatSper en diminuant fortement le voltage nécessaire à sa stimulation, le ramenant à des valeurs plus « physiologiques ». La progestérone pourrait se lier à l'une des sous-unités du complexe pour induire son activité mais aucun site de liaison n'a été découvert à ce jour (Lishko et al., 2011). Tout comme la progestérone, les prostaglandines sont également capables d'activer le canal CatSper humain mais pas murin. Le canal CatSper est biochimiquement le canal calcique le plus complexe. Les différences de régulation inter-espèces ne sont donc pas étonnantes et associées à une faible homologie de séquences entre orthologues (Cai and Clapham, 2008).

Une élégante étude utilisant la microscopie par fluorescence à haute résolution a permis de mettre en évidence la complexité de l'organisation structurale des protéines impliquées dans la signalisation calcique (Chung et al., 2014). Les canaux CatSper forment un arrangement en trois dimensions structurant de véritables domaines de signalisation calcique (**Figure 35 A**). De manière étonnante, ces techniques de microscopie ont révélé une délocalisation des tyrosine phosphorylations au cours de la capacitation en contexte d'invalidation de *CatSper1*, indiquant un lien fonctionnel entre ces deux voies majeures de signalisation (**Figure 35 B**). De plus, les souris invalidées pour CatSper1 présentent une augmentation importante de la tyrosine phosphorylation. Ce résultat est ambigu puisque les modèles présentant une capacitation anormale sont souvent caractérisés par une diminution de la tyrosine phosphorylation, qui est le




**<u>Figure 36</u> : Représentation schématique du changement de variants de PMCA4 au cours du transit épididymaire.**

Au cours du transit épididymaire le variant PMCA4b est remplacé par le variant PMCA4a apporté par les épididymosomes. D'après *Patel et al., 2013*.

marqueur biochimique le plus utilisé pour évaluer ce processus. Plus tard, FER fut identifiée comme étant la kinase à l'origine de la tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation (Alvau et al., 2016). Cette kinase présentant elle-même une altération de sa tyrosine phosphorylation dans les souris *Catsper1*$^{-/-}$, une dérégulation de sa fonction pourrait aussi être à l'origine de la tyrosine phosphorylation aberrante chez ces souris. Le calcium semble donc avoir un rôle complexe dans la régulation de la tyrosine phosphorylation.

### c-4) La pompe à calcium PMCA4

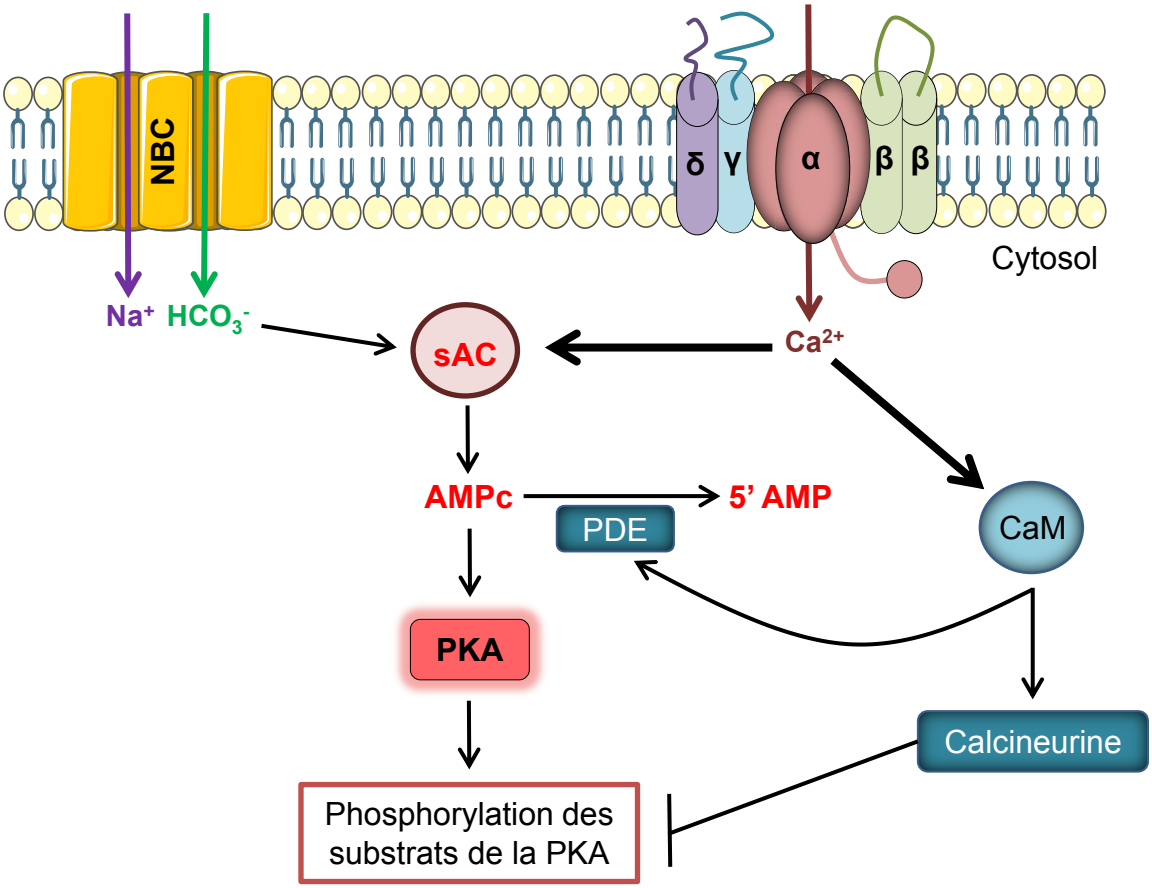
Nous avons détaillé jusqu'ici l'implication de canaux ioniques dans l'entrée de calcium au cours de la capacitation. Afin de maintenir des niveaux intracellulaires raisonnables de ce second messager, la présence de canaux favorisant son efflux est également primordiale. Les pompes PMCA (*Plasma Membrane Calcium-transporting ATPase*) constituent le premier système d'expulsion spécifique du calcium dans les cellules eucaryotes. Il existe 4 isoformes de PMCA (1 à 4) codées par 4 gènes, et chaque isoforme présente plusieurs épissages possibles (Strehler and Zacharias, 2001). La spécificité d'expression tissulaire de ces variants suggère fortement des fonctions physiologiques spécifiques. L'étude des souris transgéniques invalidées pour *Pmca4* a démontré l'importance de cette isoforme dans la fertilité mâle (Schuh et al., 2004). PMCA4 est présente au niveau de l'acrosome et de la pièce principale, une localisation cohérente avec son rôle de régulateur des flux calciques. L'invalidation de PMCA4 entraîne de sévères défauts de mobilité spermatique et la concentration calcique intracellulaire spermatique après capacitation est deux fois plus élevée que la normale. L'acquisition de cette protéine est complexe. En effet chez le bovin, le variant PMCA4b est mis en place dans le testicule puis est remplacé au cours du transit épididymaire par le variant 4a qui présente une activité basale plus importante (**Figure 36** - (Patel et al., 2013). Chez la souris, les deux variants sont retrouvés au niveau testiculaire mais PMCA4a est de nouveau transféré au spermatozoïde au cours du transit épididymaire *via* les épididymosomes (Patel et al., 2013). Enfin, une étude réalisée *in vitro* sur des protéines PMCA4 issues de la levure, a permis de mettre en évidence que l'activation de cette pompe était

dépendante de la composition en lipides de la membrane plasmique (Mangialavori et al., 2012). Ces résultats pourraient être intéressants compte tenu des forts remaniements lipidiques qui ont lieu au cours de la capacitation.

### c-5) Rôle biphasique du calcium

La régulation des voies de signalisation dépendantes du calcium au cours de la capacitation est complexe. En effet l'absence de calcium dans le milieu capacitant ne permet pas de déclencher la capacitation, entraînant une inhibition de la tyrosine phosphorylation (Visconti et al., 1995a). Les modèles murins invalidés pour CatSper, bien qu'incapables de développer une hyperactivation, présentent toutefois une hyper tyrosine phosphorylation (Carlson et al., 2005; Chung et al., 2014; Wennemuth et al., 2003).

Une étude récente a permis d'éclairer ces résultats ambigus en utilisant des milieux capacitants dépourvus de $Ca^{2+}$ et contenant de l'EGTA (Navarrete et al., 2015). L'EGTA permet de chélater les traces résiduelles de calcium présentes dans les milieux d'incubation (Marín-Briggiler et al., 2005) et fournit donc un milieu capacitant réellement dépourvu de calcium. Avec l'utilisation de ce milieu capacitant, les spermatozoïdes présentent une tyrosine phosphorylation importante, similaire à celle observée dans les modèles invalidés pour CatSper. Cette augmentation de la tyrosine phosphorylation en milieu dépourvu de calcium reste dépendante de la présence du bicarbonate, de l'activation de l'adénylate cyclase et de la PKA, des résultats similaires à ceux observés dans les KO CatSper. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que le calcium (directement ou indirectement) était également à l'origine de l'activation d'enzymes régulant négativement la tyrosine phosphorylation. L'utilisation d'un inhibiteur de calmoduline mimant les effets de l'EGTA, a indiqué que le calcium médiait son activité de manière indirecte *via* l'activation de la calmoduline (CaM). Très peu de cibles de la CaM sont connues au sein du spermatozoïde mature. Parmi celles-ci, la phosphodiestérase 1 (PDE1 - (Baxendale and Fraser, 2005) et la calcineurine (Tash et al., 1988) sont impliquées dans les phénotypes observés. L'entrée




**<u>Figure 37</u> : Rôle biphasique du calcium dans la capacitation.**

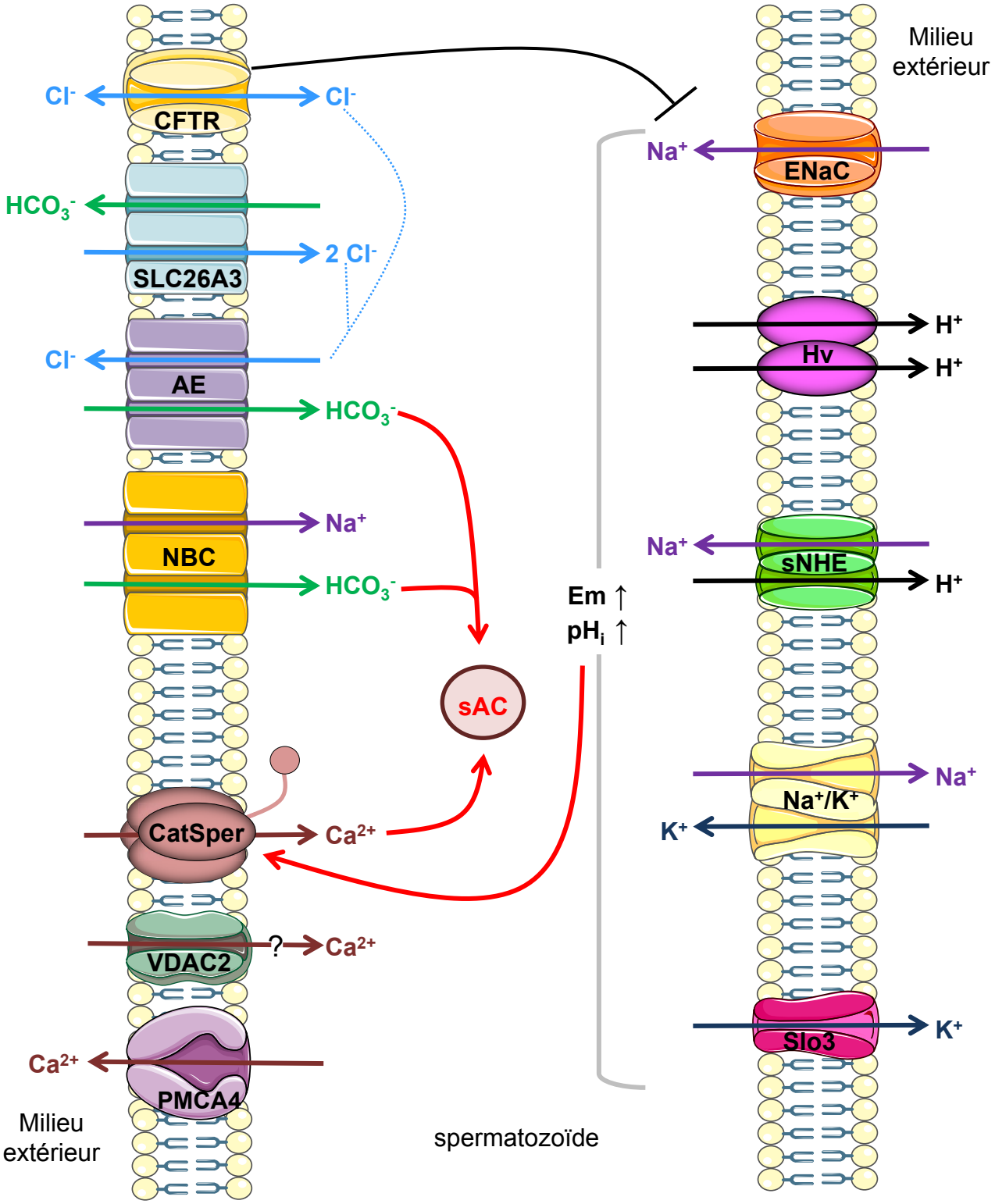
Au cours de la capacitation, l'entrée de calcium et de bicarbonate active sAC, ce qui active la PKA et déclenche au final la tyrosine phosphorylation. Le calcium est également capable d'activer la calmoduline, elle-même à l'origine de l'activation de la phosphodiestérase 1 qui dégrade l'AMPc et de la calcineurine, une phosphatase. Au cours de la capacitation, le calcium a donc à la fois un rôle activateur puisqu'il stimule sAC mais également un rôle inhibiteur puisqu'il conduit à la dégradation de l'AMPc et à la déphosphorylation des substrats de la PKA. En l'absence totale de calcium (invalidation de CatSper), sAC et donc la PKA restent stimulables par le bicarbonate. En revanche, l'effet inhibiteur du calcium étant perdu, l'AMPc s'accumule et les cibles de la PKA restent phosphorylées, ce qui conduit à une augmentation anormale de la capacitation. D'après *Navarrete et al., 2015*. NBC : sodium bicarbonate co-transporteur, sAC : adénylate cyclase soluble, PKA : protéine kinase A, PDE : phosphodiestérase, CaM : Calmoduline.

de calcium au cours de la capacitation active donc la calmoduline, elle-même capable d'activer PDE1, responsable de la dégradation de l'AMPc. La CaM active également la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase responsable de la déphosphorylation des substrats de la PKA (**Figure 37**). Au cours de la capacitation, l'entrée de calcium par les canaux CatSper a donc un effet activateur direct, puisqu'il stimule sAC, ainsi qu'un effet inhibiteur indirect *via* la stimulation de la calmoduline. Ces résultats sont cohérents avec d'autres recherches qui ont montré que CatSper crée de véritables plaques de signalisation calcique spatialement organisées dans lesquelles sont retrouvées sAC et la calcineurine (Chung et al., 2014). La combinaison d'effets négatifs et positifs du calcium met en lumière l'importance de cet ion dans la physiologie spermatique ainsi que l'intérêt de réguler finement sa concentration intracellulaire. Bien que la tyrosine phosphorylation soit possible en l'absence de calcium, les spermatozoïdes restent incapables de développer une mobilité hyperactive et de féconder un ovocyte. Ces résultats indiquent qu'en plus de la tyrosine phosphorylation, l'acquisition des capacités à féconder requiert d'autres évènements, en aval de la PKA, eux-mêmes dépendants d'une robuste élévation de la concentration calcique intracellulaire.

La capacitation est ainsi un processus nécessitant une régulation complexe des flux ioniques nécessaires au déclenchement des voies de signalisation (**Figure 38**).

### C- Les voies de signalisation de la capacitation

L'ensemble des acteurs précédemment décrits sont des déclencheurs ou font partie intégrante des voies de signalisation activées au cours de la capacitation. Même si aujourd'hui plusieurs voies semblent intervenir et s'entrecroiser, la plus importante et la plus décrite est celle faisant intervenir l'AMPc et la PKA.




**<u>Figure 38</u> : Les flux ioniques au cours de la capacitation.**

L'activation de différents canaux conduit à augmenter le $pH_i$ et le potentiel de membrane ce qui permet l'activation des canaux CatSper. Calcium et bicarbonate activent sAC, elle-même responsable du déclenchement des principales voies de signalisation de la capacitation. CatSper : Cation channel of Spermatozoa, NBC : sodium bicarbonate co-transporteur, sAC : adénylate cyclase soluble, Slo3 : Slowpoke homolog 3, sNHE : sperm $Na^+/H^+$ exchanger, CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, SLC26A3 : Solute Carrier A3, AE : Anion exchanger, ENaC : Epithelial $Na^+$ Channel, VDAC2 : Voltage-Dependent Anion Channel, PMCA4 : Plasma Membrane Calcium-transporting ATPase, $Na^+/K^+$ : $Na^+/K^+$ ATPase, Hv : $H^+$ Voltage dependent.

### *1-Voie de signalisation AMPc/PKA*

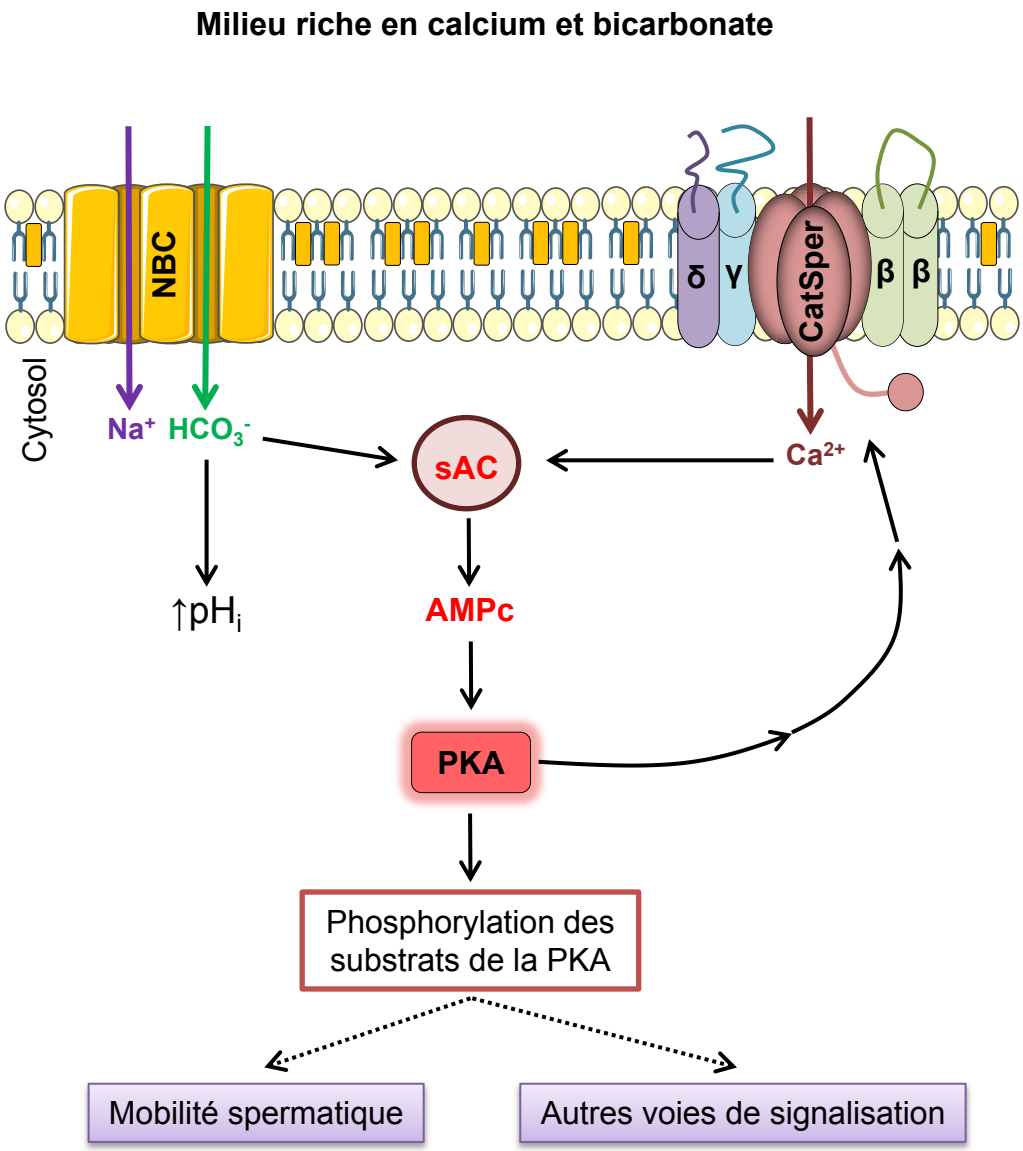
Cette voie est divisée en deux temps, avec tout d'abord des évènements qui ont lieu très rapidement, puis la mise en place d'évènements plus lents.

#### a) Les évènements rapides de la voie AMPc/PKA

Lors de son stockage dans la queue de l'épididyme le spermatozoïde est parfaitement immobile, bien qu'il consomme des taux importants d'oxygène. Cette immobilité est conservée grâce à la composition particulière du fluide épididymaire (Carr et al., 1985; Usselman and Cone, 1983). Le premier événement qui a lieu après relargage du spermatozoïde hors de l'épididyme est la mise en place d'un battement flagellaire vigoureux. En effet le spermatozoïde rencontre un milieu présentant une composition ionique particulière : riche en bicarbonate et en calcium. Le co-transporteur NBC va permettre la première entrée de bicarbonate dans le gamète (Demarco et al., 2003). L'influx calcique semble généré au moins en partie par les canaux CatSper, mais l'intervention de plusieurs canaux calciques ne peut être exclue. Le bicarbonate agit *via* l'augmentation du pH intracellulaire, mais aussi de concert avec le calcium, *via* l'activation direct de sAC (Visconti, 2009). Les niveaux d'AMPc augmentent alors rapidement (60 secondes), induisant l'activation de la PKA qui phosphoryle ensuite de nombreuses cibles (90 secondes - (Salicioni et al., 2007), et conduit au développement de la mobilité spermatique. Les protéines phosphorylées permettent le déclenchement d'autres voies de signalisation et soutiennent aussi la voie AMPc/PKA afin que son activation perdure et conduise vers les évènements plus lents (**Figure 39**).

#### b) Les évènements lents de la voie AMPc/PKA

Ces évènements vont conduire *in fine* à la tyrosine phosphorylation de nombreuses protéines spermatiques, le marqueur biochimique de capacitation le plus utilisé à ce jour. Comme pour l'initiation de la capacitation décrite ci-dessus, ces évènements vont également nécessiter l'entrée importante dans le gamète mâle de bicarbonate et de calcium mais également la présence



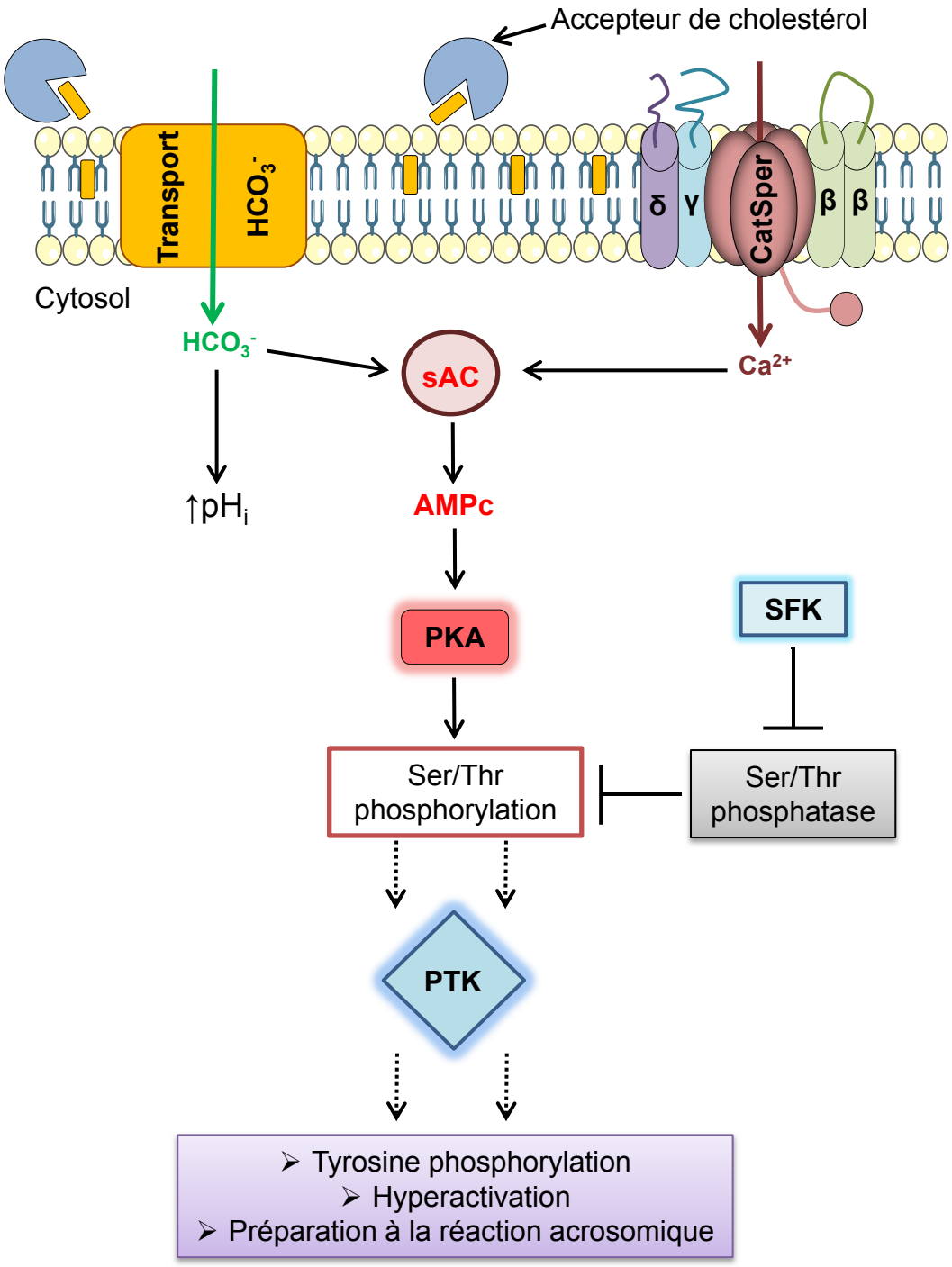

Cholestérol

**<u>Figure 39</u> : Les évènements rapides associés à la capacitation.**

A l'éjaculation le spermatozoïde rencontre un milieu riche en calcium et en bicarbonate déclenchant un vigoureux battement flagellaire. L'entrée de calcium et de bicarbonate, médiée par CatSper et NBC respectivement, conduit à la stimulation de sAC. L'AMPc produite permet l'activation de la PKA qui phosphoryle ses substrats permettant le déclenchement de la mobilité spermatique et l'activation d'autres voies de signalisation. D'après *Visconti, 2009*. CatSper : Cation channel of Spermatozoa, NBC : sodium bicarbonate co-transporteur, sAC : adénylate cyclase soluble, PKA : Protéine Kinase A.

d'un accepteur de cholestérol. L'efflux de cholestérol, en déstabilisant la membrane, augmente sa fluidité et permet le rapprochement de protéines dans la bicouche lipidique, favorisant ainsi les flux ioniques (Visconti et al., 1999a). Ces flux ioniques vont provoquer une hyperpolarisation membranaire et une augmentation du pHi (voir précédemment les transporteurs impliqués - (Nishigaki et al., 2014), nécessaires à l'activation des canaux CatSper (Kirichok et al., 2006). Les réarrangements lipidiques de la membrane plasmique pourraient également favoriser l'activation des canaux $Ca_v2.3$, à l'origine de l'entrée de calcium transitoire nécessaire au déclenchement de la réaction acrosomique (Cohen et al., 2014). Les fortes concentrations en bicarbonate (voir les canaux décrits précédemment) et en calcium vont maintenir l'activation de sAC et les niveaux d'AMPc (Visconti et al., 2011). La PKA reste donc active et poursuit la phosphorylation de ses protéines cibles. CFTR fait partie de celles-ci et son activation va à la fois permettre de soutenir les niveaux de bicarbonate mais également d'inhiber l'activité de ENaC et ainsi maintenir l'hyperpolarisation membranaire (Greger et al., 2001). Comme décrit précédemment, l'augmentation des niveaux d'AMPc est transitoire, ceux-ci revenant rapidement à la normale grâce à l'action des PDEs activées par la calmoduline (elle-même activée par le calcium, voir II-B-2-c5 - (Navarrete et al., 2015). Cependant, la phosphorylation des substrats de la PKA est maintenue *via* l'inhibition des sérine/thréonine phosphatases. En effet, il a été démontré que la tyrosine kinase Src (membre de la famille de kinase SFK) est capable d'inhiber l'activité de phosphatases telles que PP1γ2, PP2A et PP2B (Battistone et al., 2013; Krapf et al., 2010; Signorelli et al., 2013) au cours de la capacitation. Les effets de la PKA sont donc maintenus sur le long terme (**Figure 40**).

La cascade de signalisation dépendante de la PKA conduit à l'activation de tyrosine kinases et donc à la tyrosine phosphorylation de nombreuses protéines (Visconti et al., 1995a, 1995b). L'identité et le rôle des tyrosine kinases et des protéines tyrosine phosphorylées seront détaillés dans la partie suivante (II-C). Au final la capacitation conduit au développement d'une




**<u>Figure 40</u> : Les évènements lents associés à la capacitation.**

Après un certain temps d'incubation *in vivo* ou *in vitro*, les évènements lents de la capacitation se mettent en place. Ces évenements sont également dépendants des flux de bicarbonate et de calcium. L'action de la PKA est maintenue par les kinases de la famille SFK qui inhibent les Ser/Thr phosphatases responsables de la déphosphorylation des cibles de la PKA. Les tyrosine kinases sont alors activées et conduisent à la tyrosine phosphorylation de nombreuses protéines spermatiques. Le gamète développe alors une hyperactivation flagellaire et se prépare à la réaction acrosomique. D'après *Visconti, 2009* et *Signorelli et al., 2013*. CatSper : Cation channel of Spermatozoa, sAC : adénylate cyclase soluble, PKA : Protéine Kinase A, Ser/Thr : Sérine/Thréonine, SFK : SRC Family Kinase, PTK : Phospho-Tyrosine Kinase.

mobilité particulière appelée hyperactivation, caractérisée par un battement flagellaire asymétrique et de forte amplitude.

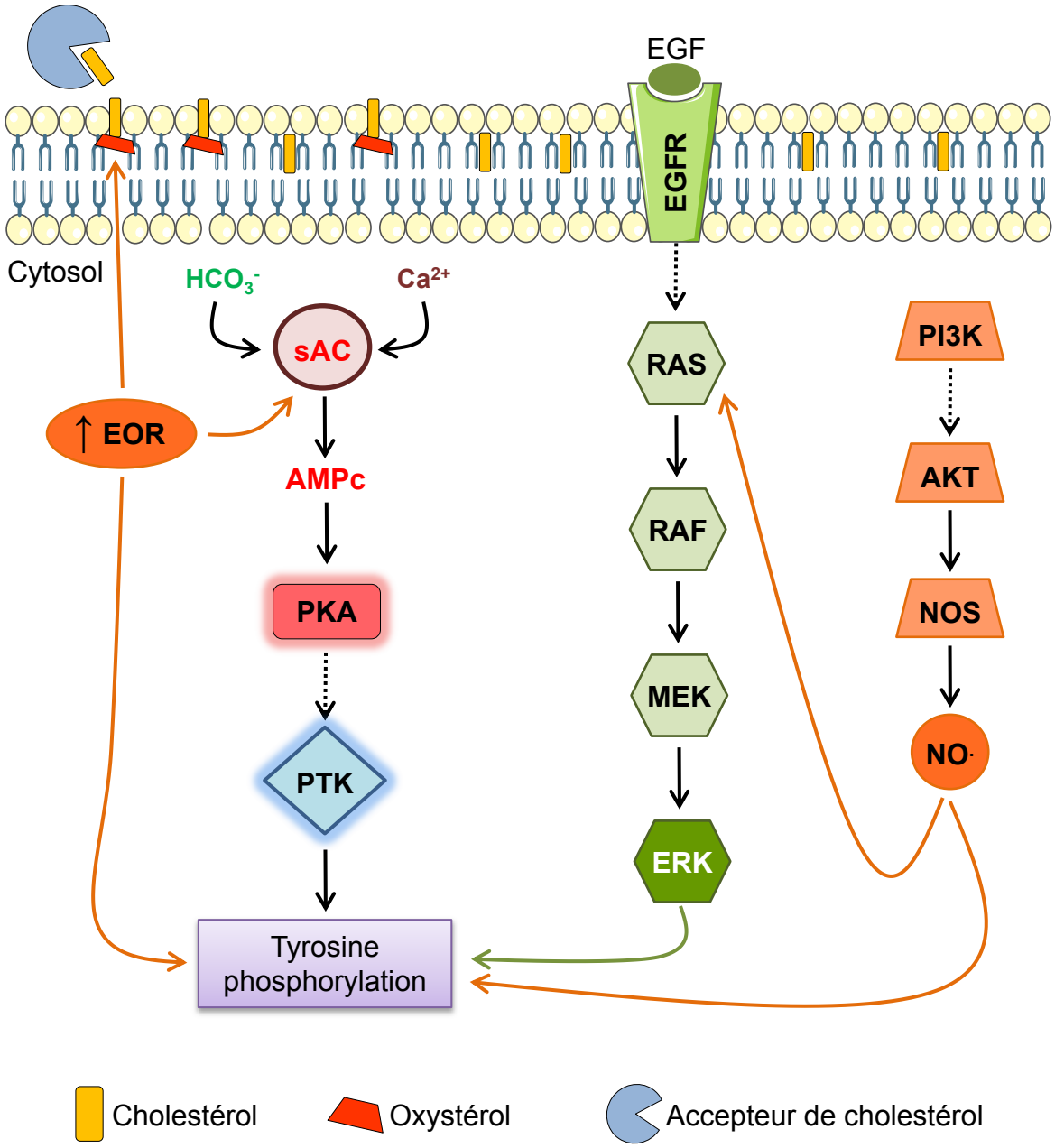
La voie AMPc/PKA est la voie majoritaire et la plus étudiée de la capacitation. Cependant, d'autres voies, que nous allons évoquer brièvement, se mettent en place au cours de ce processus.

### *2- La voie ERK*

La voie ERK (*Extracellular-Regulated Kinase*) semble également jouer un rôle au cours de la capacitation. L'activation de cette voie se fait principalement *via* des signaux extracellulaires tels que la liaison de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) à son récepteur tyrosine kinase EGFR. Cette cascade de signalisation débute par l'activation de Ras (*Rat sarcoma*) conduisant à la phosphorylation et à l'activation séquentielle de Raf (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*), MEK (*Mitogen-activated protein kinase kinase*) et finalement ERK1 et ERK 2 qui sont tyrosine et thréonine phosphorylées par MEK (Kolch, 2000). Plusieurs études ont démontré le rôle de la voie ERK dans la tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation et des inhibiteurs de cette voie sont capables d'altérer le bon déroulement de la capacitation (Awda and Buhr, 2010; Breitbart and Etkovitz, 2011; de Lamirande and Gagnon, 2002; Luna et al., 2012; Nixon et al., 2010). Cette voie pourrait être particulièrement active en fécondation *in vivo* compte tenu du nombre de ligands pouvant l'activer et l'abondance de ces derniers dans les voies génitales femelles. Les mécanismes précis reliant ERK à la tyrosine phosphorylation ne sont cependant pas très bien décryptés aujourd'hui (**Figure 41**).

### *3- Les EOR*

Les espèces oxygénées réactives ne représentent pas réellement une voie de signalisation mais sont impliquées dans la capacitation à différents niveaux. De nombreuses études ont démontré que l'inhibition des EOR empêchait la capacitation et la réaction acrosomique chez de nombreuses espèces incluant la souris (Herrero et al., 1997; Viggiano et al., 1996), l'homme




**<u>Figure 41</u> : Modèle de régulation de la capacitation par la voie ERK et les EOR.**

L'activation de la voie ERK par le récepteur de l'EGF favorise la tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation sans que les mécanismes précis soient connus. Les EOR pourraient être capables d'activer directement sAC et peuvent également activer la voie ERK. Enfin les EOR favorisent la production d'oxystérols, ce qui pourrait faciliter l'efflux de stérols membranaires. D'après *Jin and Yang., 2016* et *O'Flaherty et al., 2006*. sAC : adénylate cyclase soluble, PKA : Protéine Kinase A, PTK : Phospho-Tyrosine Kinase, EOR : Espèces oxygénées réactives, EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor, RAS : Rat Sarcoma, RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase, ERK : Extracellular-Regulated Kinase, PI3K : Phosphoinositide 3 kinase, AKT : Protéine kinase B, NOS : Nitric Oxide Synthase, NO : Nitric Oxide.

(O'Flaherty et al., 2006a) et le bovin (O'Flaherty et al., 2006b). Les spermatozoïdes de ces espèces possèdent des isoformes de NOS (Nitric Oxide Synthase) et la production de NO (oxyde nitrique) est augmentée de 7 fois au cours de la capacitation chez l'homme (Belén Herrero et al., 2000). D'autres EOR pourraient également jouer un rôle au cours de la capacitation comme l'$H_2O_2$ (peroxyde d'hydrogène) ou l'$O_2^{-}$ (anion superoxyde - (Griveau et al., 1994; de Lamirande et al., 1998).

Différents rôles sont attribués aux EOR au cours de la capacitation. Tout d'abord, comme nous avons pu le voir précédemment, elles sont responsables de la transformation d'une partie du cholestérol membranaire en oxystérols au cours de la capacitation. Les oxystérols favoriseraient alors l'efflux de stérols de la membrane spermatique et participeraient à l'initiation de la capacitation (Boerke et al., 2013; Brouwers et al., 2011). De manière cohérente il a été montré que le pic maximum d'$O_2^{-}$ survient dans les 15 minutes après le début de la capacitation. Son recyclage par la SOD (SuperOxyde Dismutase) 30 ou 60 minutes après le début de la capacitation n'inhibe pas celle-ci indiquant que l'action des EOR a lieu très tôt dans le processus (de Lamirande et al., 1998).

De nombreuses recherches ont également démontré que l'activation de la capacitation par les EOR était associée à l'augmentation de l'AMPc et des tyrosine phosphorylations (Jagan Mohanarao and Atreja, 2012; Leclerc et al., 1997; O'Flaherty et al., 2006a; Roy and Atreja, 2008). L'adénylate cyclase pourrait être une cible des EOR comme ce fut démontré dans d'autres types cellulaires (Persad et al., 1997). Une étude indique notamment que la concentration en NO est capable de moduler la concentration intracellulaire en AMPc et ce, de manière indépendante des PDE (Belén Herrero et al., 2000). Enfin les EOR sont également capables d'activer la signalisation ERK décrite précédemment, témoignant d'un croisement entre ces différentes voies (**Figure 41** - (O'Flaherty et al., 2006c).

### *4- La voie des endocannabinoïdes*

A l'inverse des voies citées précédemment, la voie des endocannabinoïdes aurait plutôt un effet inhibiteur sur la capacitation. Les endocannabinoïdes sont des dérivés d'acide gras endogènes capables de lier les récepteurs CNR1 et 2 (Cannabinoid Receptor). Les spermatozoïdes possèdent CNR1 et il a été démontré que l'activation de cette voie avait des effets inhibiteurs sur la mobilité, la capacitation et la réaction acrosomique (Cobellis et al., 2006; Maccarrone et al., 2005; Rossato et al., 2005; Schuel et al., 1994, 2002a). Il semble que l'activation du système endocannabinoïde permette de garder le spermatozoïde dans un état quiescent (Schuel et al., 2002b). Les concentrations décroissantes des endocannabinoïdes dans le tractus génital femelle permettraient de stopper l'activation de cette voie et ainsi lever l'inhibition sur les paramètres cités précédemment.

La capacitation fait donc intervenir de nombreux acteurs, nécessite une régulation très fine des différents flux ioniques, et conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation. Bien que l'effort soutenu des recherches sur la capacitation ces dernières années ait permis de mieux comprendre les mécanismes mis en place, beaucoup de paramètres restent à éclaircir, notamment en ce qui concerne la tyrosine phosphorylation. La majorité des voies de signalisation mises en place au cours de la capacitation conduisent à la tyrosine phosphorylation de nombreuses protéines présentes sur le gamète, ce qui en fait un marqueur terminal largement utilisé dans la littérature.

## D- La tyrosine phosphorylation : marqueur terminal de la capacitation

La tyrosine phosphorylation associée à la capacitation a été démontrée dans de nombreuses espèces telles que le hamster (Visconti et al., 1999b), le chat (Pukazhenthi et al., 1998), le porc (Kalab et al., 1998; Tardif et al., 2001), le bovin (Galantino-Homer et al., 1997), le cheval (Pommer et al., 2003), le singe (Mahony and Gwathmey, 1999), les marsupiaux (Sidhu et al., 2004), la souris (Visconti et al., 1995b), le lapin (Saez Lancellotti et al., 2010) et l'homme (Leclerc et al., 1996). Toutes ces études démontrent que la tyrosine phosphorylation des protéines est une voie de régulation importante dans la modulation des évènements associés à la capacitation. Les composants essentiels à la capacitation (calcium, bicarbonate, accepteur de cholestérol) sont nécessaires pour aboutir à une tyrosine phosphorylation correcte et il a été largement démontré que la tyrosine phosphorylation dépendait de la PKA (de manière indirecte puisque la PKA est une sérine/thréonine kinase - (Naz and Rajesh, 2004). Malgré les études intensives sur cette thématique, l'identité de la ou des tyrosine kinases responsables de ces phosphorylations reste imprécise.

### *1- Les tyrosine kinases au cours de la capacitation*

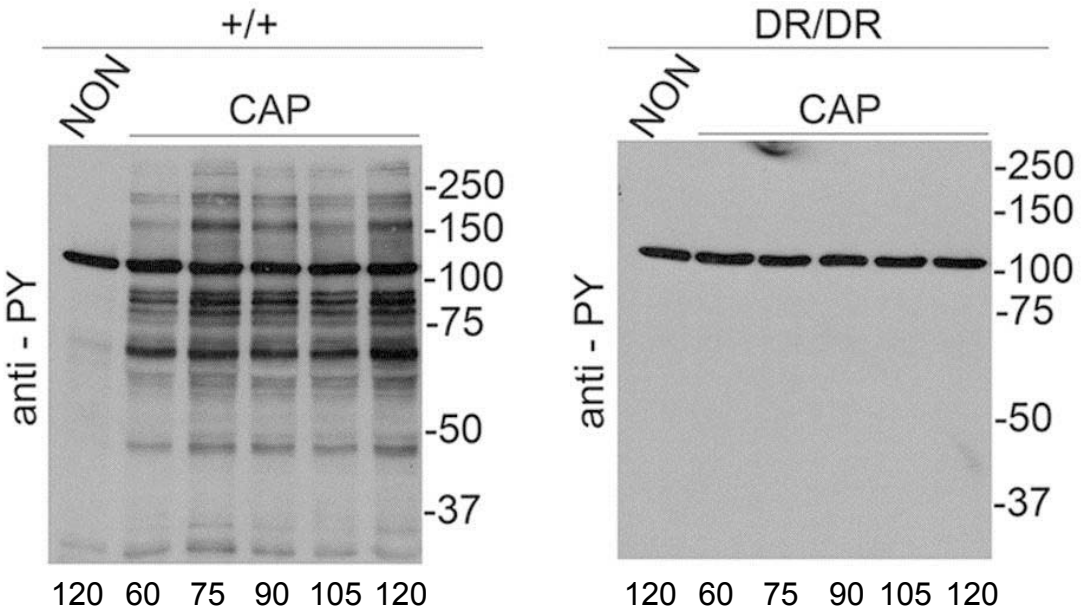
Les tyrosine kinases sont divisées en deux groupes : les récepteurs tyrosine kinases (RTK) et les protéines tyrosine kinases non-récepteurs (PTK). Les RTKs sont des protéines transmembranaires possédant un domaine de liaison au ligand extracellulaire et un domaine tyrosine kinase intracellulaire. La fixation du ligand entraîne l'activation du RTK qui s'auto-phosphoryle et/ou phosphoryle des cibles intracellulaires. Les PTK sont localisées au niveau du cytoplasme, du noyau ou sont ancrées au feuillet interne de la membrane plasmique. Ces deux types de tyrosine kinases sont présents dans le gamète mâle.

### a) Les récepteurs tyrosine kinases

La localisation de la phospholipase C-γ (PLCγ) à la membrane plasmique du gamète murin, son activation dépendante de la tyrosine phosphorylation ainsi que l'activité de la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) dans le spermatozoïde humain indiquent indirectement la présence de RTKs. La présence de plusieurs RTKs a effectivement été démontrée. EGFR est présent chez la souris, le lapin, le rat, le bovin et l'homme (Lax et al., 1994; Naz and Ahmad, 1992). Il semble que ce récepteur ait pour but principal d'activer la voie ERK décrite précédemment et impliquée dans la tyrosine phosphorylation. Cependant, l'inhibition de ce récepteur n'altère pas la capacitation, indiquant qu'il existe probablement des mécanismes compensatoires (la voie ERK pouvant être activée d'une autre manière) et/ou que les tyrosine phosphorylations induites par EGFR sont mineures dans ce processus (Naz and Ahmad, 1992). Le récepteur à l'IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*) IGF1R, a également été détecté sur le spermatozoïde murin (Naz and Padman, 1999) et humain (Wang et al., 2015). L'étude chez l'homme a notamment démontré qu'un certain nombre de cibles tyrosine phosphorylées au cours de la capacitation l'étaient *via* IGF1R. L'inhibition de ce récepteur diminue la tyrosine phosphorylation et la mobilité hyperactive, soulignant le rôle d'IGF1R dans la capacitation chez l'homme.

### b) Les protéines tyrosine kinases

De nombreuses PTKs sont présentes dans les spermatozoïdes (Naz and Rajesh, 2004; Signorelli et al., 2012). Cependant, l'étude de leur fonction est rendue difficile par l'absence d'inhibiteurs réellement spécifiques. Ainsi la kinase SRC fut un temps considérée comme directement à l'origine de la tyrosine phosphorylation (TP) au cours de la capacitation car son inhibition par le SU6656 entraînait la perte des TP (Baker et al., 2006). Cependant une autre étude a démontré que cet inhibiteur agissait également sur la PKA (Krapf et al., 2010). Des recherches plus poussées ont permis de mettre en évidence un rôle plutôt indirect de SRC concernant les




**<u>Figure 42</u> : Altération de la tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation chez les souris invalidées pour la tyrosine kinase FER.**

Mise en évidence de la tyrosine phosphorylation de protéines spermatiques en western-blot. Les souris invalidées pour la tyrosine kinase FER (DR/DR) présentent une absence complète de tyrosine phosphorylation après incubation en milieu capacitant (seule l'hexokinase reste tyrosine phosphorylée). Les chiffres sous les figures représentent les temps d'incubation en minutes. Issu de *Alvau et al., 2016*. NON : milieu non capacitant, CAP : milieu capacitant, anti-PY : anticorps anti-phosphotyrosine, +/+ : souris sauvages.

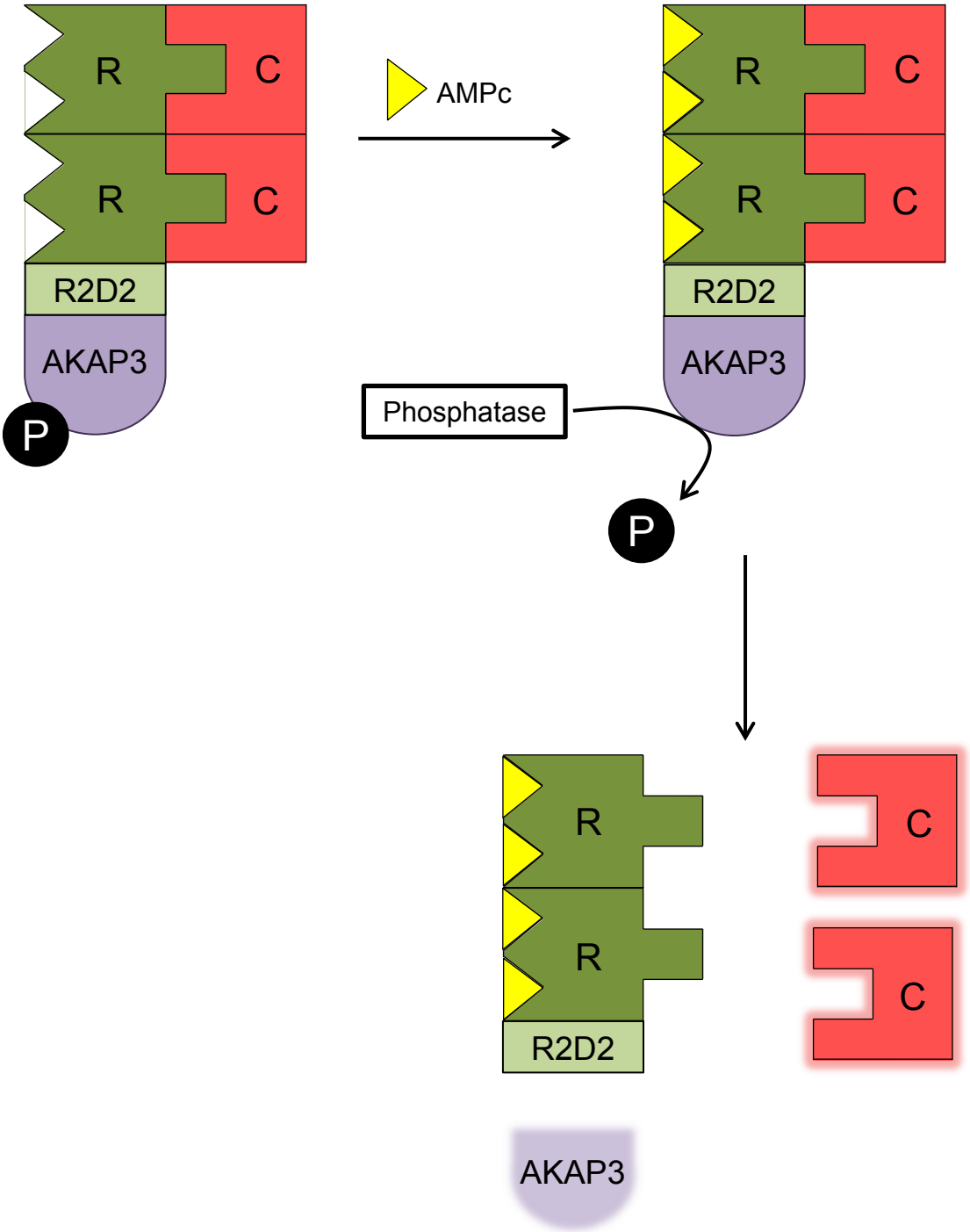
TP, *via* l'inhibition des sérine/thréonine phosphatases au cours de la capacitation (Krapf et al., 2010; Stival et al., 2015).

Plus récemment une étude basée sur l'invalidation génique de tyrosine kinase chez la souris a fortement fait progresser les connaissances sur le sujet (Alvau et al., 2016). Des études précédentes, basées sur un inhibiteur (PF-431396), impliquaient les tyrosine kinases FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et PYK2 (*Proline-rich tyrosine Kinase 2*) dans la TP associée à la capacitation (Battistone et al., 2014; González-Fernández et al., 2013). Cependant les souris *Pyk2*$^{-/-}$ présentent une capacitation et une TP normales, démontrant la non spécificité de l'inhibiteur. La poursuite de l'étude a permis de démontrer que cet inhibiteur agissait également sur la tyrosine kinase FER, une protéine déjà identifiée comme étant tyrosine phosphorylée au cours de la capacitation (Chung et al., 2014). De plus l'invalidation de FER chez la souris abolit totalement la TP associée à la capacitation (**Figure 42**). Cette étude a donc permis d'identifier la PTK responsable de la TP. De manière tout à fait inattendue, les souris invalidées pour FER sont fertiles *in vivo* (Alvau et al., 2016). Bien que dans ce modèle la fécondation *in vitro* soit largement compromise, ces derniers résultats interrogent quant au rôle des TP dans la fertilité mâle. Les auteurs n'excluent pas un rôle compensatoire du tractus génital femelle et ces résultats mettent en évidence les limites de l'étude *in vitro* de la capacitation.

### *2- Identité et rôle des protéines tyrosine phosphorylées*

Depuis 20 ans, de très nombreuses études utilisent la TP comme marqueur biochimique de la capacitation. Cependant peu de ces protéines sont identifiées et l'effet de la tyrosine phosphorylation sur leur activité au cours de la capacitation est encore plus méconnu.

Des protéines de structure, des canaux ioniques, des enzymes métaboliques et anti-oxydantes ainsi que des protéines ayant plutôt une fonction de chaperonne sont retrouvées. Nous allons détailler quelques-unes d'entre elles.




**<u>Figure 43</u> : Modèle de régulation de AKAP3 par tyrosine phosphorylation.**

La tyrosine phosphorylation de AKAP3 augmente sa liaison aux sous-unités régulatrices de la PKA et protège AKAP3 de la dégradation. Lorsque l'AMPc se fixe à la PKA, AKAP3 est déphosphorylée par une phosphatase inconnue. AKAP3 se détache alors de la PKA ce qui entraîne sa dégradation. D'après *Vizel et al., 2015*. R : sous-unités régulatrices de la PKA, C : sous-unités catalytiques de la PKA, AKAP : A-Kinase Anchor Protein.

### a) Les protéines de structure tyrosine phosphorylées

Plusieurs protéines structurales du flagelle, axonémales ou périaxonémales, sont tyrosine phosphorylées au cours de la capacitation, comme par exemple les protéines ODF (*Outer Dense Fiber*) ou la FSIP2 (*Fibrous Sheath-Interacting Protein 2* - (Chung et al., 2014). D'autres protéines sont associées à ces structures du flagelle et jouent un rôle dans la signalisation et la mobilité. C'est le cas des protéines AKAPs (*A-Kinase Anchor Protein* - (Carrera et al., 1996; Ficarro et al., 2003) et de la protéine CABYR (*Calcium Binding tyrosine phosphorylation Regulated* - (Naaby-Hansen et al., 2002).

Les protéines AKAPs sont capables de former des complexes multi-protéiques permettant de définir une régionalisation subcellulaire pour une voie de signalisation donnée et de l'intégrer à d'autres voies de signalisation dans la cellule. Elles possèdent un domaine R2D2 capable de lier les sous-unités régulatrices de la PKA (PKAR - (Carnegie et al., 2009). Les AKAPs sont très importantes pour la fertilité (principalement AKAP3 et 4) puisqu'elles interviennent dans la mobilité et la réaction acrosomique. La TP d'AKAP3 renforce sa liaison à ses protéines cibles comme PKAR (Luconi et al., 2004). Dans le même temps, il a été démontré qu'AKAP3 est dégradée au cours de la capacitation (Hillman et al., 2013). Plus récemment un modèle a été proposé pour tenter d'expliquer ces données complexes. AKAP3 tyrosine phosphorylée serait fixée à PKAR, ce qui empêcherait sa dégradation. L'activation importante de la PKA par l'AMPc permettrait l'action d'une phosphatase inconnue qui viendrait alors déphosphoryler AKAP3. Celle-ci se détacherait de PKAR et AKAP3, ainsi libre, serait dégradée (Vizel et al., 2015). Ce système complexe est probablement très dynamique ce qui explique la difficulté de son étude (**Figure 43**).

La protéine CABYR est associée à la gaine fibreuse et capable de lier les protéines AKAPs. Elle est également phosphorylée sur des résidus tyrosine au cours de la capacitation (Naaby-Hansen et al., 2002). Cependant aucune étude n'a permis de mettre en évidence le rôle de cette protéine et de sa phosphorylation dans la capacitation. Une étude récente a néanmoins

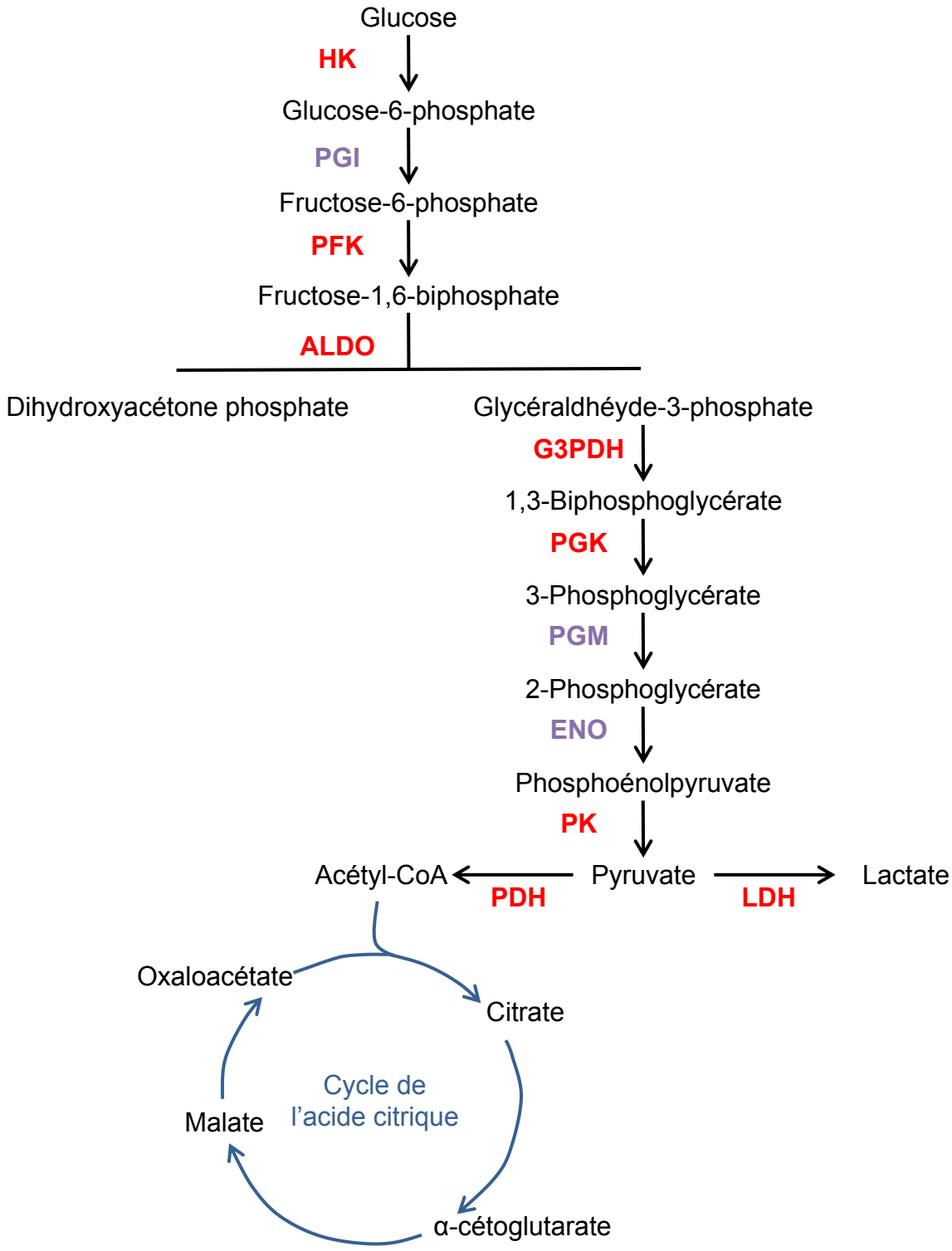
démontré que CABYR était essentielle pour la formation et la structuration de la gaine fibreuse au cours de la spermiogénèse (Young et al., 2016).

### b) Les protéines chaperonnes tyrosine phosphorylées

Parmi ces protéines, VCP (*Valosine-Containing Protein*) encore appelée p93-p97 (selon les espèces) ou TERA (*Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase*) a été retrouvée tyrosine phosphorylée au cours de la capacitation chez l'homme (Ficarro et al., 2003) et le porc (Geussova et al., 2002). Cette protéine appartient à la famille des AAA (*ATPase Associated with various cellular Activities*). Elle est connue pour intervenir dans des processus de fusion (Urbé et al., 1998), dans l'assemblage et le désassemblage de complexes protéiques et dans l'adressage de protéines au protéasome (Kerns et al., 2016). Il a été démontré *in vitro* que sa TP est requise pour les évènements de fusion membranaire auxquels elle participe (Lavoie et al., 2000). Dans certains types cellulaires, sa TP régule sa distribution subcellulaire (Madeo et al., 1998). Dans le spermatozoïde humain, VCP est localisée au niveau de la pièce connectrice et la phosphorylation de résidus tyrosine au cours de la capacitation entraîne sa relocalisation au niveau de la tête antérieure (Ficarro et al., 2003). La localisation de VCP chez le porc est un peu différente mais elle semble également relocalisée suite à sa TP (Geussova et al., 2002). Les auteurs suggèrent que la localisation de VCP au niveau de l'acrosome pourrait avoir un rôle dans les processus de fusion membranaire associés à la réaction acrosomique (Ficarro et al., 2003) et dans la régulation de l'activité du protéasome au cours de la capacitation (Kerns et al., 2016). De plus il a été montré que la quantité de cette protéine est diminuée chez les hommes souffrant d'asthénozoospermie, illustrant l'importance de VCP dans la fertilité (Capkova et al., 2015).

### c) Les canaux ioniques tyrosine phosphorylés

VDAC2 est le canal ionique régulièrement identifié parmi les protéines tyrosine phosphorylées au cours de la capacitation (Arcelay et al., 2008; Ficarro et al., 2003; Jagan Mohanarao and Atreja, 2012). VDAC2 est localisé au niveau de la pièce intermédiaire et de




**<u>Figure 44</u> : La glycolyse et le cycle de l'acide citrique.**

Durant la glycolyse, le glucose est oxydé en pyruvate avec un gain net de deux ATP. Le pyruvate produit sert alors de substrat pour le cycle de l'acide citrique. Les enzymes notées en rouge sont des enzymes produites par des gènes ou des variants d'épissage spécifiques du spermatozoïde. Les enzymes notées en violet sont des formes atypiques retrouvées dans les cellules spermatiques. D'après *Visconti., 2012* et *Nakamura et al., 2013*. HK : Hexokinase, PGI : Phosphoglucose isomérase, PFK : Phosphofructokinase, ALDO : Aldolase, G3PDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, PGK : Phosphoglycérate kinase, PGM : Phosphoglucomutase, ENO: Enolase, PK : Pyruvate kinase, PDH : Pyruvate déshydrogénase, LDH : Lactate déshydrogénase.

l'acrosome mais la localisation de la forme tyrosine phosphorylée est inconnue (Arcelay et al., 2008; Triphan et al., 2008). Comme nous l'avons déjà détaillé précédemment, VDAC2 pourrait être impliqué dans plusieurs mécanismes de la physiologie spermatique (II-B-2-c2), mais le rôle de sa TP au cours de la capacitation n'est toujours pas clairement identifié.

#### d) Les enzymes métaboliques tyrosine phosphorylées

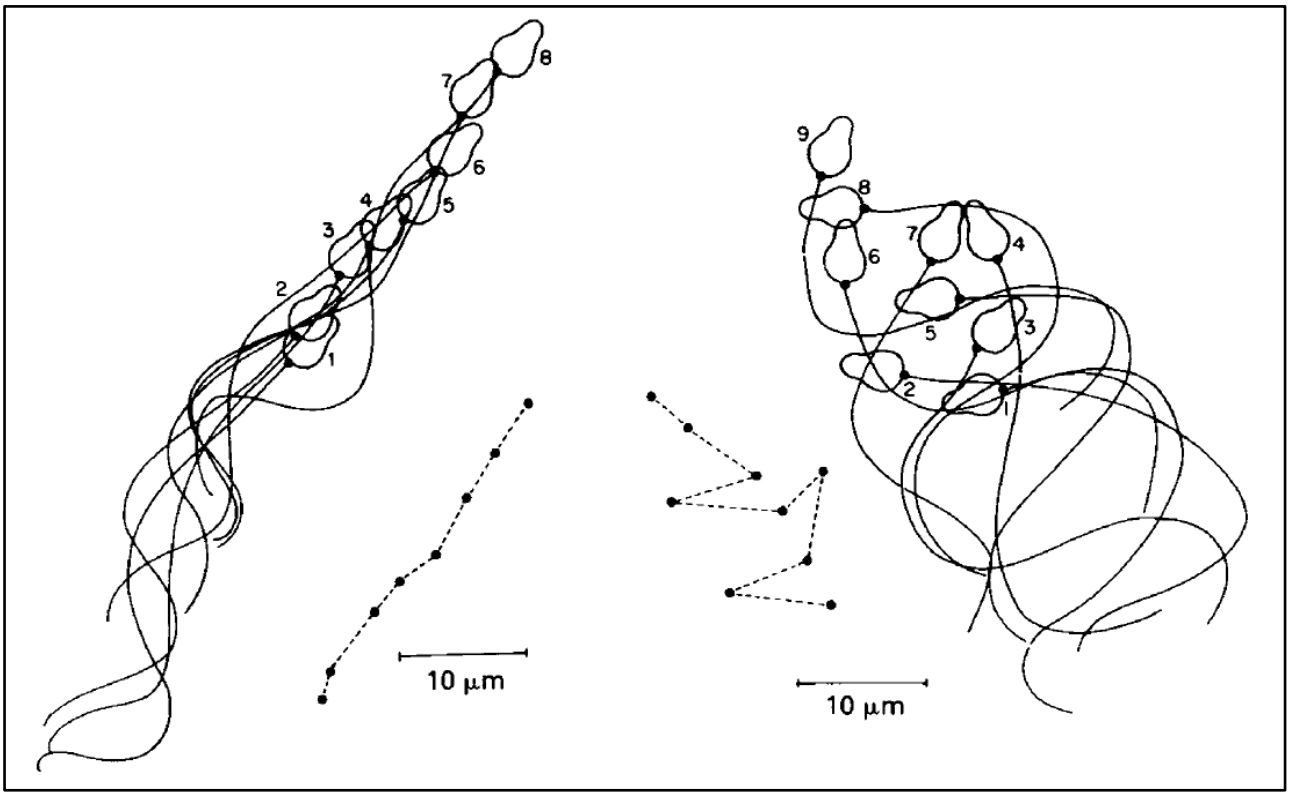
Le métabolisme énergétique du gamète mâle est complexe et particulier (Visconti, 2012). Le spermatozoïde est capable d'utiliser de multiples substrats pour soutenir son activité à travers deux voies majeures : la phosphorylation oxydative et la glycolyse. La glycolyse, uniquement présente au niveau du flagelle, est la voie majeure permettant de supporter la TP et l'hyperactivation (**Figure 44** - (Goodson et al., 2012). C'est pourquoi de nombreuses protéines impliquées dans ce métabolisme énergétique sont présentes dans la gaine fibreuse du flagelle, comme l'aldolase (Fructose-1,6-biphosphate aldolase). Cette famille de gènes contient 3 membres somatiques (*AldoA*, *AldoB* et *AldoC*). Il existe en plus deux variants d'épissage de *AldoA* qui sont spécifiques du testicule, ainsi que deux gènes sans introns (*Aldoart1* et *Aldoart2*), également spécifiques du testicules et probablement apparus par rétrotransposition (Vemuganti et al., 2007). Arcelay a identifié des phosphorylations de résidus tyrosine sur ALDOART1 et 2 au cours de la capacitation chez la souris (Arcelay et al., 2008). La présence de l'aldolase a été détectée dans la pièce principale (Krisfalusi et al., 2006; Vemuganti et al., 2007), mais également au niveau de l'acrosome (Arcelay et al., 2008), suggérant l'implication de la glycolyse dans la réaction acrosomique. Cependant le dosage de l'activité enzymatique de l'aldolase au cours de la capacitation n'a pas permis de mettre en évidence une modification de cette activité après TP. Néanmoins cette TP pourrait modifier l'accessibilité de l'enzyme à son substrat, un paramètre qui ne serait pas détecté *in vitro* (Arcelay et al., 2008).

Plusieurs études ont démontré la TP de différentes sous-unités du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) au cours de la capacitation (Arcelay et al., 2008; Ficarro et al., 2003;

Kumar et al., 1996) . Ce complexe permet la conversion du pyruvate en acétyl-CoA durant l'oxydation aérobie du glucose (**Figure 44**). La forme spécifique du testicule, PDHα2, subit une TP au cours de la capacitation chez le hamster. De plus cette protéine présente une localisation extra-mitochondriale non canonique dans le gamète mâle puisqu'elle est localisée dans la pièce principale du spermatozoïde de hamster et dans la région postérieure de la tête du spermatozoïde humain (Kumar et al., 1996). Chez le hamster, PDHα est associée à la gaine fibreuse dans la pièce principale et son activité est augmentée tout au long de la capacitation et corrélée à sa TP et à l'hyperactivation. Chez la souris et l'homme, PDHβ est tyrosine phosphorylée au cours de la capacitation (Arcelay et al., 2008; Ficarro et al., 2003). Chez la souris, sa localisation est là encore particulière, puisqu'en plus d'être présente dans la pièce intermédiaire, elle est aussi retrouvée dans la pièce principale et la région acrosomique. Ces enzymes essentielles à la bioénergétique du spermatozoïde possèdent des localisations particulières en accord avec leur rôle dans la mobilité, confirmant la régionalisation des voies métaboliques dans le gamète mâle.

#### e) Les enzymes anti-oxydantes tyrosine phosphorylées

Les glutathion-S-transférases (GST) sont nécessaires au maintien de l'intégrité spermatique, elles permettent de maintenir la balance oxydative et assurent la détoxication (Gopalakrishnan and Shaha, 1998). Plusieurs études ont mis en évidence que les GST étaient tyrosine phosphorylées au cours de la capacitation : GST μ5 chez la souris (Arcelay et al., 2008) et le hamster (Kota et al., 2009) et GST μ3 chez l'homme (Ficarro et al., 2003) et le buffle (Jagan Mohanarao and Atreja, 2011, 2012). Ces enzymes permettraient d'éliminer une partie des EOR produites au cours de la capacitation. Comme nous l'avons précisé précédemment les EOR sont nécessaires à la capacitation. Cependant, leur forte concentration est délétère puisqu'elles entraînent une peroxydation lipidique dommageable pour la mobilité et une oxydation de l'ADN spermatique. Leur quantité doit donc être régulée. Une étude chez le buffle a permis de démontrer que GST μ3 était relocalisée au cours de la capacitation, passant d'une localisation homogène sur la pièce intermédiaire et le flagelle à une localisation fortement enrichie sur les




**<u>Figure 45</u> : Schématisation de la trajectoire d'un spermatozoïde humain avant et après hyperactivation.**

Avant hyperactivation le spermatozoïde se déplace de manière rectiligne (schéma de gauche). Après 6h d'incubation en milieu capacitant, le spermatozoïde développe une mobilité hyperactive caractérisée par une forte amplitude des battements flagellaires asymétriques conduisant à une trajectoire en « zigzag » (schéma de droite). Issu de *Morales et al., 1988*.

pièces principale et terminale après capacitation. De plus, les auteurs ont montré que l'activité de GST μ3 augmente au cours de la capacitation et que cette dernière est corrélée à sa TP (Kumar et al., 2014). Ainsi, *via* la TP, le gamète mâle assure aussi sa protection au cours de la capacitation.

Le processus de capacitation regroupe donc un ensemble d'évènements complexes qui sont nécessaires à la fertilité. En effet, le spermatozoïde capacité va être capable de développer une mobilité hyperactive et de réaliser la réaction acrosomique, des étapes essentielles sur le parcours qui mène le gamète mâle à la fécondation de l'ovocyte.

## E- Les conséquences fonctionnelles de la capacitation

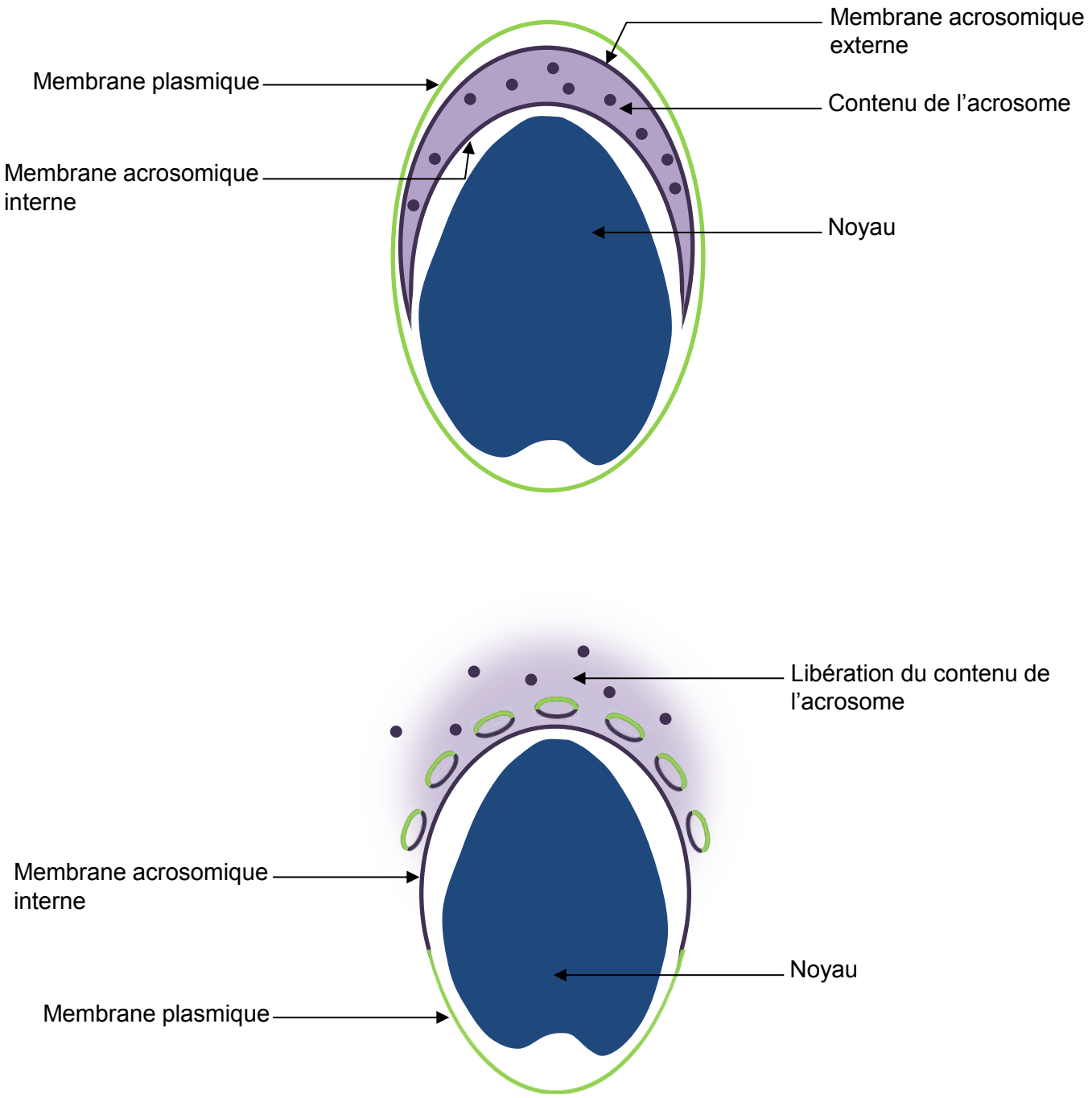
Il est aujourd'hui admis que l'hyperactivation ne fait pas partie intégrante de la capacitation. Néanmoins la capacitation prépare le spermatozoïde à développer cette mobilité.

### *1- L'hyperactivation flagellaire*

Dès l'éjaculation, le spermatozoïde acquiert la capacité de se mouvoir et développe une mobilité rectiligne grâce à des battements flagellaires symétriques. Ce premier type de mobilité permet l'ascension des voies génitales femelles. Chez de nombreuses espèces de mammifères, les spermatozoïdes vont s'attacher à l'épithélium de l'isthme de l'oviducte et former un réservoir (Suarez and Pacey, 2006). Cet attachement préserve les capacités fécondantes des gamètes en attente de la fécondation. Le développement des stades terminaux de la capacitation va conduire les spermatozoïdes à développer un autre de type de mobilité appelé l'hyperactivation flagellaire (HAF). Le battement flagellaire augmente en amplitude et devient asymétrique (**Figure 45** - (Morales et al., 1988), permettant le détachement des spermatozoïdes de l'épithélium oviductaire. Chez la souris seuls les spermatozoïdes présentant une HAF sont retrouvés détachés de cet

épithélium (Demott and Suarez, 1992). L'hyperactivation va être nécessaire pour que le gamète mâle puisse pénétrer la zone pellucide. Des expériences chez le hamster ont démontré que si l'hyperactivation est bloquée lorsque les spermatozoïdes sont liés à la zone pellucide, ceux-ci sont incapables de pénétrer cette zone (Stauss et al., 1995). De même, les spermatozoïdes des souris invalidées pour CatSper, bien que présentant une mobilité progressive, sont incapables de pénétrer la zone pellucide car ils ne développent pas d'HAF. En revanche, en l'absence de zone pellucide ils peuvent féconder normalement (Quill et al., 2003; Ren et al., 2001). Ces expériences témoignent de l'importance de l'HAF pour la fertilité.

Les facteurs déclenchant l'HAF *in vitro* sont aujourd'hui assez bien compris (AMPc, calcium, bicarbonate). Les voies de signalisation mises en place au cours de la capacitation activent de nombreux acteurs tels que des kinases, des phosphatases et des canaux ioniques nécessaires au mouvement. Le mouvement flagellaire résulte notamment de l'activité de dynéines-ATPases faisant glisser les microtubules entre eux et permettant leur courbure (Lesich et al., 2014). Le mouvement est soutenu par un métabolisme énergétique en augmentation. Chez le hamster, la sérine phosphorylation de PDHE1β par la voie de l'AMPc participe à l'activation des dynéines-ATPases (Fujinoki et al., 2003). De plus il a été démontré qu'au cours de la capacitation, des unités de G-actine se connectent pour former des filaments de F-actine. Cette polymérisation de l'actine est requise pour le développement de l'HAF (Itach et al., 2012). Finalement la plupart des évènements ayant lieu au cours de la capacitation et les protéines tyrosine phosphorylées décrites précédemment concourent à l'HAF (Ickowicz et al., 2012). Cependant, malgré les efforts des chercheurs, force est de constater que la régulation de l'hyperactivation résultant des relations entre $pH_i$, calcium et AMPc n'est pas encore clairement définie. De plus plusieurs études démontrent que capacitation et hyperactivation ne sont pas nécessairement couplées. Bien que ces deux processus soient dépendants des mêmes facteurs, les voies de signalisation impliquées semblent légèrement différentes (Suarez and Ho, 2003). *In vivo*, il semble évident que des spermatozoïdes hyperactivés trop tôt ne peuvent pas atteindre l'ovocyte, car ils sont incapables




**<u>Figure 46</u> : La réaction acrosomique.**

La membrane plasmique et la membrane acrosomique externe fusionnent localement pour libérer les enzymes hydrolytiques contenues dans l'acrosome. La membrane interne de l'acrosome est alors exposée.

de traverser la jonction utéro-tubaire. Un environnement particulier au niveau de l'isthme oviductaire doit donc permettre le déclenchement de l'HAF. Les hormones, les ions et les sécrétions dans le fluide oviductaire varient en fonction du cycle œstral (Nichol et al., 1992). Les facteurs responsables du déclenchement de l'HAF *in vivo* ne sont pas clairement identifiés. Il peut s'agir simplement d'une modification de la concentration de différents ions, de la présence d'hormones ou de toute autre molécule produite par l'oviducte ou le complexe ovocyte-cumulus, ou d'une combinaison de ces différents paramètres (Suarez, 2008). Au final le spermatozoïde sera dirigé vers l'ampoule et l'ovocyte *via* des mécanismes complexes de chimiotactisme et de rhéotaxie (réponse motile envers un courant) encore peu compris (Suarez and Wu, 2016).

Le processus de fécondation peut alors commencer et débute par la réaction acrosomique.

### *2- La réaction acrosomique*

L'acrosome est une vésicule géante de sécrétion dérivée du golgi qui recouvre la partie antérieure de la tête spermatique. La réaction acrosomique est une réaction d'exocytose multipoint. La membrane plasmique et la membrane acrosomique externe vont fusionner localement et libérer le contenu de l'acrosome composé d'enzymes hydrolytiques (**Figure 46**). Parmi ces enzymes, sont retrouvées entre autres l'acrosine, la hyaluronidase, des glucosaminidases (Moreno and Alvarado, 2006) ainsi que les phospholipases $A_2$ (Escoffier et al., 2010) qui vont permettre la progression à travers les voies génitales femelles et/ou la dégradation de la zone pellucide (voir partie sur la localisation de la réaction acrosomique - E-2-b). La réaction acrosomique physiologique n'a lieu que dans les spermatozoïdes capacités, elle est irréversible et indispensable pour la fusion avec l'ovocyte (Ikawa et al., 2010). Les mécanismes de la réaction acrosomique sont complexes et très dépendant de la concentration en progestérone (Abi Nahed et al., 2016).

### a) Mécanismes moléculaires de la réaction acrosomique

Plusieurs facteurs sont capables de déclencher la réaction acrosomique notamment la progestérone (Patrat et al., 2000) ou les protéines ZP (notamment ZP3) de la zone pellucide (Cherr et al., 1986; Florman and Storey, 1982; Hinsch et al., 1994). Cependant, le lien entre ces molécules et les mécanismes intracellulaires mis en place au cours de la réaction acrosomique sont encore méconnus. Il est clair que le calcium joue un rôle prépondérant dans le déclenchement de la réaction acrosomique. Ces flux se déroulent en plusieurs phases et sont dépendants de plusieurs canaux ioniques. Tout d'abord une entrée transitoire de calcium est initiée probablement par les canaux $Ca_v$. Les canaux $Ca_v2.3$ seraient notamment activés en réponse aux modifications lipidiques de la membrane plasmique qui ont lieu au cours de la capacitation (Cohen et al., 2014). Cette entrée de calcium transitoire va conduire à l'activation de la PLC-δ (Phospholipase C) qui entraîne la dégradation du PIP2 en IP3 et DAG. L'IP3 se fixe alors à son récepteur IP3R situé sur la membrane acrosomale. Les stocks calciques contenus dans l'acrosome sont alors relargués. La déplétion de ces stocks calciques conduit alors à l'ouverture des SOCs (Store-operated channels) présents dans la membrane plasmique ce qui entraîne un influx soutenu de calcium dans le gamète. Une cascade de signalisation est alors déclenchée, impliquant notamment des phospholipases, conduisant à la préparation de la machinerie de fusion membranaire qui nécessite de nombreuses protéines (Darszon et al., 2011; Florman et al., 2004; Roldan and Shi, 2007). Au cours de la capacitation la polymérisation des filaments d'actine a également lieu dans la tête du spermatozoïde et favorise le maintien de l'acrosome (Breitbart and Finkelstein, 2015). La dégradation de PIP2 par la PLC conduit au relargage de la gelsoline et à sa déphosphorylation. Celle-ci disloque alors les filaments d'actine, déstabilisant l'acrosome et facilitant alors la réaction acrosomique (Breitbart and Finkelstein, 2015; Ickowicz et al., 2012). Les recherches sur le sujet améliorent nos connaissances sur les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de la réaction acrosomique. Cependant des études récentes et innovantes remettent

en cause le rôle et l'endroit précis de cet évènement *in vivo* (La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016).

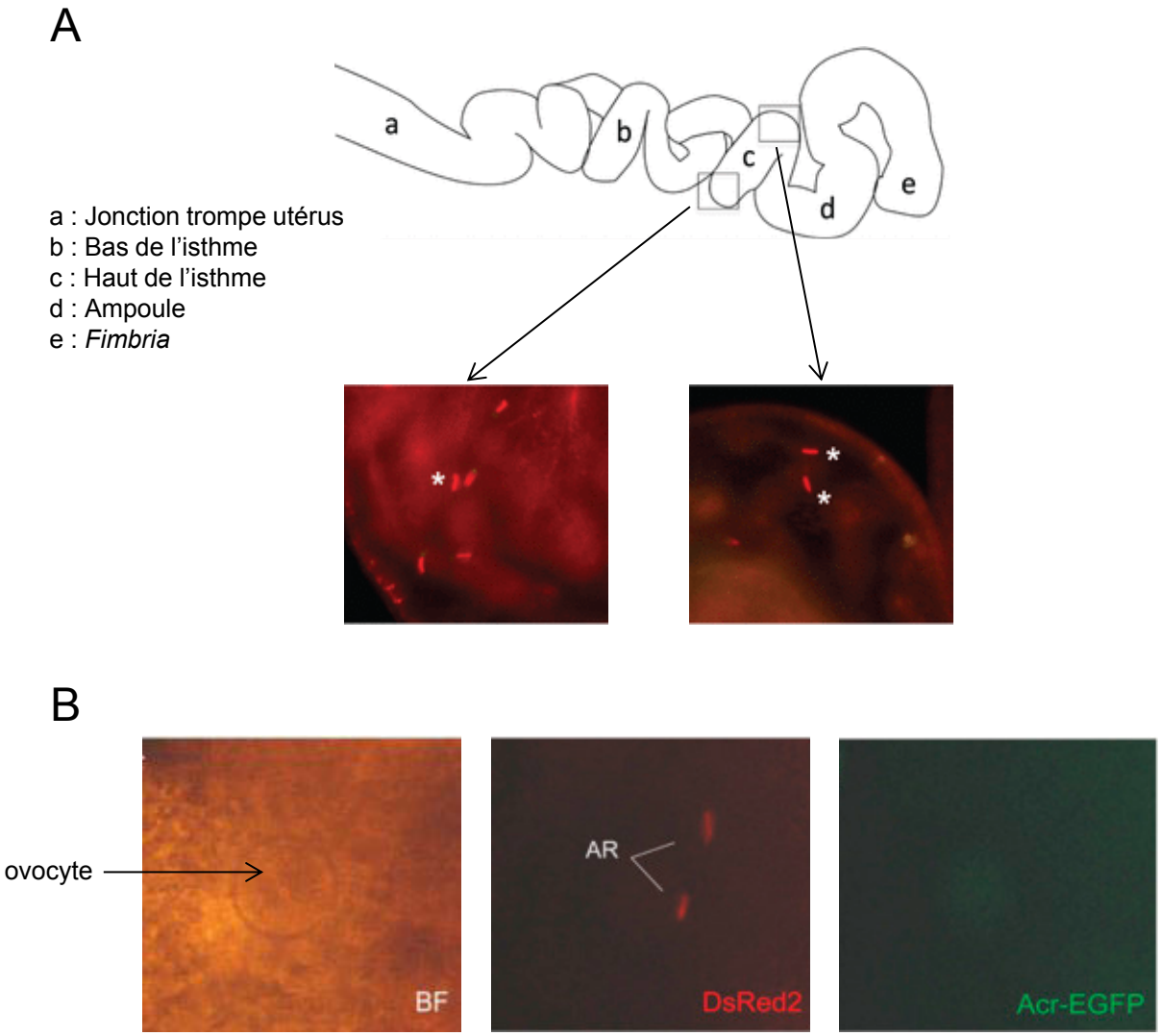
### b) Localisation de la réaction acrosomique

Il est admis depuis de nombreuses années que l'attachement du spermatozoïde à la zone pellucide provoque le déclenchement de la réaction acrosomique. La libération du contenu enzymatique de l'acrosome permettrait la dégradation de cette zone pellucide et favoriserait la pénétration du spermatozoïde. Cependant ce modèle est largement remis en cause depuis quelques temps grâce à des études originales sur le sujet.

Tout d'abord, des chercheurs ont démontré que des spermatozoïdes ayant déjà réalisé leur réaction acrosomique physiologiquement restent capables de féconder un ovocyte entouré de sa zone pellucide (ZP) et du cumulus (Inoue et al., 2011). Pour cela les auteurs ont utilisé deux modèles murins :

- Les souris invalidées pour *Izumo1*. Les spermatozoïdes de ces souris sont capables de pénétrer la ZP d'un ovocyte sauvage mais incapables de le féconder.
- Les souris invalidées pour *Cd9*. Les ovocytes de ces souris laissent les spermatozoïdes entrer dans la ZP mais sont également incapables d'être fécondés.

Ainsi dans ces deux modèles murins, il n'y a pas de fécondation et pas de libération des granules corticaux. De nombreux spermatozoïdes ayant perdu leur acrosome se retrouvent donc dans l'espace péri-vitellin. Les auteurs ont démontré que ces spermatozoïdes restent capables de pénétrer à nouveau le cumulus et la ZP d'un nouvel ovocyte. Les spermatozoïdes récupérés sur les ovocytes *Cd9*$^{-/-}$ produisent même des souriceaux viables après réimplantation dans une femelle pseudo-gestante. Ces résultats démontrent que contrairement à ce qui était admis (Saling et al., 1979), des spermatozoïdes sans acrosome peuvent lier et traverser la ZP *in vitro*. Ces résultats remettent également en cause les recherches sur la présence du récepteur à la ZP sur le spermatozoïde.




**<u>Figure 47</u> : Statut acrosomal des gamètes dans le tractus génital femelle.**

Les mitochondries présentent un marqueur rouge (Ds-Red2) et l'acrosome un marqueur vert (Acr-EGFP). A- La majorité des gamètes qui atteignent le haut de l'isthme ont déjà perdu leur acrosome. Les astérisques représentent les spermatozoïdes qui ont réalisé leur réaction acrosomique. Issu de *Muro et al., 2016*. B- Peu de gamètes atteignent l'ampoule et la majorité d'entre eux ont déjà réalisé leur réaction acrosomique. Issu de *La Spina et al., 2016*. BF : image Bright Field, AR : spermatozoïde à l'acrosome réagi.

La même année des recherches *in vitro* ont été initiées avec l'utilisation de souris transgéniques GFP pour l'acrosome. Les auteurs ont ainsi démontré que les spermatozoïdes se trouvant proches du cumulus ou de la zone pellucide avaient quasiment tous déjà initié leur réaction acrosomique. De plus ces spermatozoïdes traversent bien plus vite la zone pellucide que les rares gamètes ayant toujours leur acrosome (Jin et al., 2011). Ces résultats remettent en cause la nécessaire présence de l'acrosome pour lier et traverser la ZP, mais laissent également entrevoir que la réaction acrosomique pourrait avoir lieu en amont.

Enfin très récemment des études ont été développées *in vivo* avec ces mêmes spermatozoïdes acrosome-GFP. Les auteurs ont visualisé les spermatozoïdes présents dans le tractus génital femelle après un accouplement naturel et ont ainsi mis en évidence qu'une fois passée la jonction utéro-tubaire la majorité des spermatozoïdes avaient déjà effectué leur réaction acrosomique. Au niveau de l'ampoule la quasi-totalité des spermatozoïdes présents n'avaient plus leur acrosome (**Figure 47 A** - (La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016). Ces études sont d'autant plus percutantes qu'elles sont réalisées *in vivo* avec du sperme éjaculé et non des spermatozoïdes épididymaires comme c'est le cas dans le cadre d'une FIV. Des résultats similaires ont été obtenus avec des femelles qui n'avaient pas subis de stimulation ovarienne, écartant alors un biais des hormones de stimulation (Hino et al., 2016). Il semble donc que la membrane plasmique du spermatozoïde mais également la membrane interne de l'acrosome soient capables de lier la ZP. De plus, ces différentes recherches *in vivo* ont également mis en évidence que très peu de spermatozoïdes arrivaient sur le site de la fécondation, avec finalement environ autant de gamètes mâles que d'ovocytes à féconder (**Figure 47 B**). Les spermatozoïdes semblent également capables de se détourner du cumulus d'un ovocyte déjà fécondé pour se diriger vers un autre, expliquant pourquoi la fécondation reste efficace même avec très peu de gamètes présents dans l'ampoule (Hino et al., 2016). Ces données mettent en évidence l'importance des signaux diffusés par l'ovocyte et ses couches cellulaires.

Physiologiquement la réaction acrosomique a donc lieu bien en amont de la zone pellucide ce qui pose la question de son rôle et des mécanismes déclencheurs. Au final, seul un spermatozoïde ayant réalisé sa réaction acrosomique pourra féconder un ovocyte. En effet Izumo1 ne sera exposé à la surface qu'après la perte de l'acrosome et cette protéine est indispensable pour la fusion des gamètes (Inoue et al., 2005).

## III- Dyslipidémies et impact sur la fertilité mâle

### A- Les dyslipidémies

#### *1) Lipides et maturation post-testiculaire des spermatozoïdes*

Comme nous avons pu le développer dans les deux premières parties de cette introduction, la maturation post-testiculaire est largement influencée par les lipides. En effet au cours de la descente épididymaire la composition lipidique du gamète est fortement remaniée avec une perte globale de lipides qui ne touche pas toutes les classes lipidiques de manière homogène. Ces modifications font varier la dynamique membranaire afin de conférer une plus grande fluidité à la membrane. La répartition même de ces lipides n'étant pas homogène sur la membrane du spermatozoïde, ces remaniements doivent être finement contrôlés. De plus, nous avons également évoqué l'importance des lipides dans le transfert régionalisé de protéines épididymaires. L'épithélium épididymaire est capable de produire des vésicules lipidiques, les épididymosomes, permettant le transfert de protéines aux spermatozoïdes. Ces protéines vont être transférées spécifiquement dans certains compartiments membranaires et plus particulièrement dans des sous-types de radeaux lipidiques, ce qui nécessite là encore que la composition lipidique des épididymosomes et des spermatozoïdes soit adéquate. Ces

| Valeurs lipidiques plasmatiques normales | | |
|---|---|---|
| Cholestérol total | 4,1 - 5,2 mmol/L | 1,6 - 2 g/L |
| Triglycérides | 0,4 - 1,7 mmol/L | 0,35 - 1,5 g/L |
| HDL cholestérol | > 1mmol/L | > 0,4 g/L |
| LDL cholestérol | < 4,1 mmol/L | < 1,6 g/L |

**Figure 48 : Valeurs lipidiques plasmatiques normales chez l'homme.**

D'après *http://www.cnci.univ-paris5.fr/pharmacie/Constantes_biologiques_adultes_2009*.

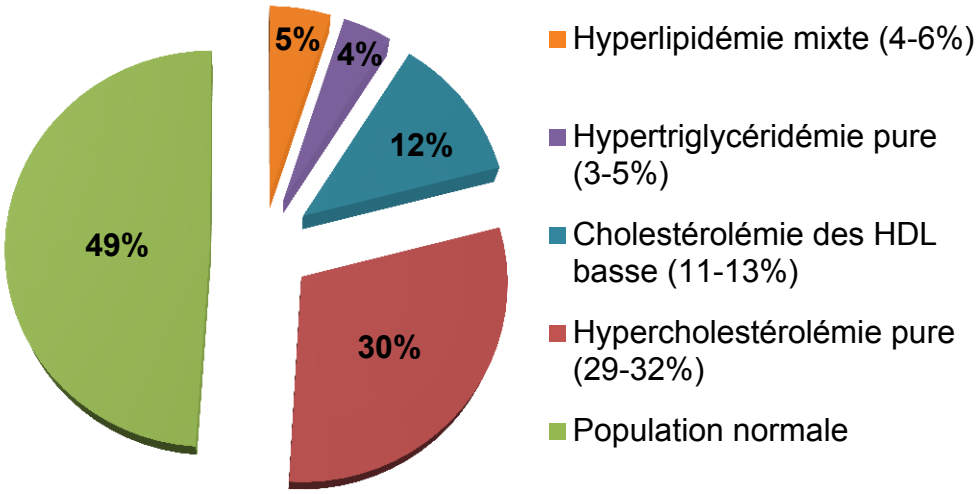
modifications permettent notamment l'acquisition de la mobilité spermatique et du pouvoir fécondant et vont préparer le gamète à la réalisation de la capacitation.

La capacitation est, elle aussi, une étape de maturation post-testiculaire en partie régulée par la composition lipidique membranaire. En effet comme nous avons pu le décrire précédemment les évènements déclenchant la capacitation se situent au niveau membranaire, que ce soit l'activation des nombreux canaux ioniques ou l'efflux de stérols nécessaire à l'initiation de la signalisation. Enfin, les étapes qui font suite à la capacitation sont également dépendantes de la composition lipidique. Une membrane trop rigide ne permettra pas le développement de l'HAF (Buffone et al., 2009). La composition lipidique est également déterminante dans le déclenchement de la réaction acrosomique comme en témoigne l'importance des phospholipases dans ce processus (Roldan and Shi, 2007).

Les lipides composant une cellule ont deux origines : une source endogène lorsque la cellule synthétise les elle-même et une source exogène lorsqu'elle utilise les lipides circulants dans le sang. La composition lipidique des spermatozoïdes varie en fonction de l'apport alimentaire en lipides (Jafaroghli et al., 2014; Liu et al., 2015), démontrant une corrélation directe entre le régime alimentaire et la composition des gamètes. De plus, l'alimentation a des répercussions importantes sur la concentration sérique en lipides. Cette alimentation, si elle est déséquilibrée, peut être à l'origine de pathologies graves telles que les maladies cardiovasculaires.

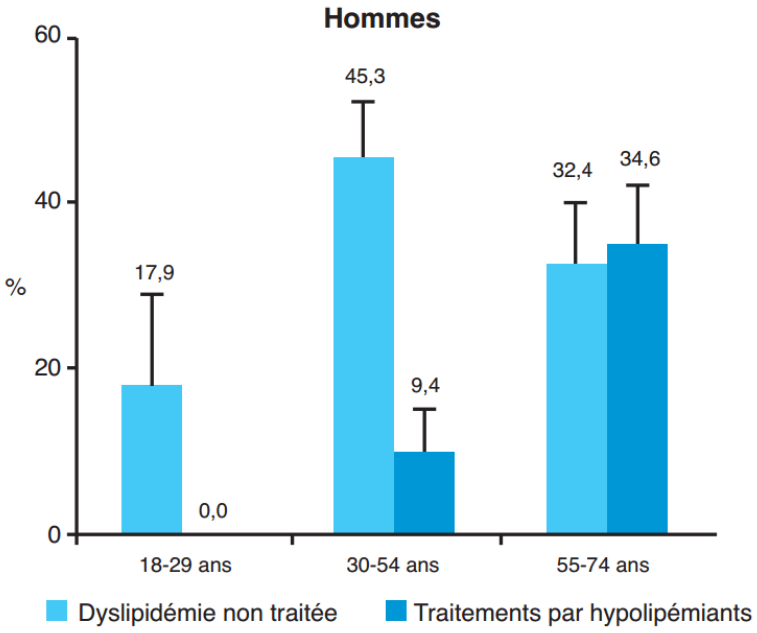
### *2) Définition des dyslipidémies*

Les dyslipidémies sont caractérisées par une concentration anormale de lipides dans le sang et peuvent donc concerner le LDL-cholestérol (LDLc, *Low Density Lipoprotein*), le HDL-cholestérol (HDLc, *High Density Lipoprotein*) et les triglycérides (TG). L'exploration d'une anomalie lipidique de base s'appuie donc sur le dosage sanguin à jeun du cholestérol total (CT), du HDLc et des triglycérides (le LDLc étant ensuite calculé selon la formule de Friedwald -




**<u>Figure 49</u> : Prévalence des dyslipidémies en France.**

La dyslipidémie la plus rencontrée est l'hypercholestérolémie pure. Données standardisées pour l'âge et le sexe avec intervalle de confiance à 95%. Issu de *Ferrières, 2008*.




**<u>Figure 50</u> : Prévalence de la dyslipidémie selon l'âge chez les hommes en France.**

Fréquence des dyslipidémies traitées ou non par médicaments hypolipémiants chez les hommes de 18 à 74 ans, étude ENNS, 2006. Issu de *Ferrières, 2008*.

**Figure 48**). Ainsi une ou des anomalies dans ce bilan lipidique peuvent conduire à différents types de dyslipidémies (Ferrieres, 2008) :

- L'hypercholestérolémie pure avec CT ≥ 2,4 g/L et TG < 2 g/L
- L'hypertriglycéridémie pure avec CT < 2,4 g/L et TG ≥ 2 g/L
- L'hyperlipidémie mixte avec CT ≥ 2,4 g/L et TG ≥ 2 g/L
- La baisse isolée du HDLc < 0,4 g/L

Bien que les dyslipidémies seules existent et présentent un risque pour la santé, elles sont le plus souvent recherchées dans le cadre d'une autre pathologie pour laquelle elles représentent un facteur aggravant. Par exemple les dyslipidémies sont largement associées aux maladies cardiovasculaires et notamment l'athérosclérose, au syndrome métabolique, au diabète ou à l'obésité. Il est donc essentiel d'évaluer la présence d'une dyslipidémie chez un patient présentant l'une de ces pathologies. En revanche il existe assez peu de données sur la prévalence de ces dyslipidémies dans la population générale.

### *3) Prévalences des dyslipidémies*

En France, l'étude nationale nutrition santé de 2006 (ENNS) a fourni des indications intéressantes sur la prévalence des dyslipidémies dans la population française. Cette étude, reprise par le cardiologue Jean Ferrières, a ainsi mis en évidence que l'hypercholestérolémie pure est l'anomalie la plus rencontrée puisque 30% de la population adulte est porteuse de cette affection (**Figure 49**). Viennent ensuite la cholestérolémie avec HDL bas (12%), l'hyperlipidémie mixte (5%) et l'hypertriglycéridémie pure (4%). L'étude par tranche d'âge met en évidence que 54,7% des hommes en France entre 30 et 54 ans présentent une dyslipidémie (sans distinction) et que seulement 9,4% d'entre eux sont traités par médicaments hypolipémiants (**Figure 50** -(Ferrieres, 2008). Ces chiffres très élevés témoignent de l'évolution des habitudes de consommation alimentaire dans nos sociétés occidentales. Aux Etats-Unis, 11,6% des hommes de plus de 20 ans présentent une hypercholestérolémie sévère (≥ 2,4 g/L) et 40,4% présentent une

hypercholestérolémie supérieure à 2 g/L (Mozaffarian et al., 2015). Au Canada, 43% des hommes de plus de 20 ans présentent une dyslipidémie (Joffres et al., 2013).

Les dyslipidémies affectent ainsi une part importante de la population, sans symptôme ou maladie associée, elles sont souvent silencieuses. Elles sont le plus souvent recherchées et détectées dans le cadre de pathologies plus globales et peuvent être en place depuis de nombreuses années avant la mise en route d'un traitement. Ces altérations lipidiques peuvent donc affecter la physiologie humaine y compris la fertilité et ce, de manière discrète.

L'infertilité pour un couple est définie comme l'incapacité à concevoir un enfant après un an de rapports sexuels réguliers non protégés. Dans 30% des cas la cause est d'origine masculine et dans 10% des cas l'infertilité est dite idiopathique c'est-à-dire sans cause connue. En réalité, en étudiant les paramètres spermatiques des couples sans enfant, dans 50% des cas un facteur associé à une infertilité masculine est découvert avec notamment des anomalies spermatiques. Une partenaire fertile peut compenser ce défaut chez l'homme, c'est pourquoi un nombre important d'anomalies masculines ne sont pas découvertes (Guidelines on Male Infertility, EAU 2015). D'après ce même rapport, aucun facteur associé à l'infertilité masculine n'est découvert chez 30% des hommes infertiles (infertilité masculine idiopathique). Ces hommes ne présentent pas d'antécédents de maladies pouvant affecter la fertilité, l'examen physique, les tests endocriniens, génétiques et biochimiques sont normaux. Ces données indiquent qu'une part importante des infertilités masculines (en particulier idiopathiques) est sous-estimée aujourd'hui.

La moyenne d'âge des hommes en centre de procréation médicalement assistée en France se situe aux alentours de 35 ans (Rapport FIVNAT 2002 36,5 ans ± 5ans). Compte tenu de la prévalence des dyslipidémies en France, dans cette tranche d'âge près de la moitié des hommes sont atteints d'une dyslipidémie pour laquelle ils ne sont pas traités. Compte tenu de l'importance des lipides dans la maturation post-testiculaire des gamètes et de la dépendance entre

composition du régime alimentaire et composition lipidique du gamète, la question de l'impact de ces dyslipidémies sur la fertilité masculine peut légitimement être posée.

## B- Dyslipidémies et infertilité mâle

Dans la majorité des cas, l'impact des dyslipidémies sur la fertilité mâle est étudié dans le cadre de pathologies plus larges auxquelles elles sont associées telles que l'obésité ou le syndrome métabolique (Chambers and Richard, 2015; Chavarro et al., 2010; Hammoud et al., 2008; Kasturi et al., 2008; McPherson and Lane, 2015; Palmer et al., 2012). En effet ces pathologies vont conduire à des dérégulations hormonales, un stress oxydant tissulaire et systémique important, des dysfonctions érectiles et une augmentation de la température scrotale conduisant à altérer la qualité spermatique et la fertilité. Que ce soit chez l'homme ou dans les modèles animaux, l'impact direct de la dyslipidémie en elle-même est rarement évoqué. De plus, seules les conséquences sur le testicule et la spermatogénèse sont le plus souvent abordées, les effets éventuels sur la maturation post-testiculaire étant rarement pris en compte. Une étude chez l'homme a néanmoins démontré une corrélation négative entre l'indice de masse corporelle et la quantité de « neutral-α-glucosidase » (NAG, une enzyme produite par l'épididyme) dans le sperme. Dans cet article, NAG était utilisée comme marqueur reflétant la fonction épididymaire et sa baisse chez la personne obèse était corrélée à une baisse de mobilité spermatique (Martini et al., 2010). Enfin une altération spécifique de l'épididyme a été mise en évidence chez des rats obèses. Dans ce modèle la fonction testiculaire n'est absolument pas perturbée (la baisse de testostérone étant modérée) tandis que l'épididyme présente un fort taux d'apoptose. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'accumulation de lipides dans les tissus pourrait être à l'origine de la production d'EOR entraînant une peroxydation lipidique tissulaire et spermatique, conduisant *in fine* aux altérations spermatiques observées (Vigueras-Villaseñor et al., 2011).

Quelques modèles animaux ont cependant permis de mettre en évidence un lien entre perturbation de l'homéostasie du cholestérol épididymaire et infertilité. Ces modèles seront détaillés brièvement puisqu'ils ont fait l'objet d'une revue inclue en annexe de ce manuscrit.

### *1) Modèles animaux d'infertilité en lien avec une perturbation du cholestérol*

#### a) Les souris *ApoB*$^{+/-}$

L'apolipoprotéine B est l'une des apolipoprotéines qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme lipidique. Le niveau plasmatique d'apoB est un facteur de risque important dans les maladies coronariennes, puisqu'il entre dans la composition des LDLs et permet leur fixation au LDLR (Young, 1990). Les souris *Apob*$^{+/-}$ présentent un niveau plasmatique de HDLc très bas ce qui, comme nous l'avons vu précédemment, est l'une des caractéristiques des dyslipidémies (Huang et al., 1995). Les souris mâles sont également infertiles *in vivo* et *in vitro* avec une diminution de la numération et de la mobilité des spermatozoïdes (Huang et al., 1996). *Apob* est exprimé à la fois dans le testicule et l'épididyme et bien qu'aucune anomalie testiculaire n'ait été mise en évidence, les auteurs émettent l'hypothèse qu'ApoB pourrait avoir un rôle dans la spermatogénèse. La mobilité étant un paramètre acquis lors du transit épididymaire, une altération de la maturation épididymaire ne peut être exclue.

#### b) Les souris *Npc2*$^{-/-}$

La protéine NPC2 (*Niemann-Pick disease type C2*) encore appelée HE1, a été identifiée originellement comme l'une des protéines les plus abondantes du fluide épididymaire (Kirchhoff, 1996). Elle est capable de lier et transférer le cholestérol entre des membranes (Infante et al., 2008; Okamura et al., 1999). Son invalidation chez la souris entraîne un phénotype locomoteur sévère ne permettant pas d'étudier la fertilité *in vivo*. Les organes reproducteurs de ces souris sont normaux ainsi que la numération et la morphologie des spermatozoïdes (Busso et al., 2014). Cependant les gamètes mâles présentent une diminution du cholestérol membranaire qui semble

associée à un défaut de tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation. Ces défauts de capacitation entraînent une diminution du taux de fécondation *in vitro*. Les auteurs font l'hypothèse que la quantité anormale de cholestérol altère la distribution de molécules membranaires conduisant à ce défaut de capacitation. Le mécanisme précis impliquant NPC2 dans les flux de cholestérol avec le gamète mâle n'est cependant pas complétement élucidé.

### c) Les souris *Dicer1* knock out conditionnel de l'épididyme

Récemment un modèle d'invalidation spécifique de *Dicer1* dans la tête de l'épididyme a été créé (Björkgren et al., 2012) en utilisant une lignée murine exprimant la *Cre* sous le contrôle du promoteur de la Défensine bêta 41 (*Defb41* - (Jalkanen et al., 2005). Ces souris sont infertiles et présentent une désorganisation de l'épithélium de la tête de l'épididyme, une augmentation des spermatozoïdes cassés et des pertes spontanées de l'acrosome ainsi qu'une forte diminution de la mobilité spermatique. Au cours de la capacitation, ces gamètes présentent une altération de l'efflux de cholestérol conduisant à une capacitation inefficace. De plus les niveaux de PUFA sont diminués ce qui entraîne une augmentation du ratio cholestérol/PUFA et par conséquent, une augmentation de la rigidité membranaire. Au niveau de l'épididyme, l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse (*Hmgcr* hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase) et le transport du cholestérol (*Abca1* et *Abcg1*) est augmentée (Björkgren et al., 2015). L'expression de ces gènes est régulée par des microARNs, miR-33 pour *Abca1* et *Abcg1* (Rayner et al., 2010) et miR-122 pour l'*Hmgcr* (Esau et al., 2006). La perte de DICER1 pourrait être à l'origine d'un défaut de maturation de ces miRNAs conduisant à une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol dans l'épididyme. Ce modèle a permis de mettre en évidence l'importance de la régulation de l'homéostasie du cholestérol (et des miRNAs) dans la maturation épididymaire des spermatozoïdes.

#### d) Les lapins hypercholestérolémiques

Au-delà des modèles transgéniques, l'hypercholestérolémie peut être induite dans les modèles animaux par une modification du régime alimentaire. Le lapin est souvent utilisé car l'hypercholestérolémie est facilement déclenchée par un régime enrichi en cholestérol ou en graisse (Kolodgie et al., 1996; Russell and Proctor, 2006). Il a été démontré que l'hypercholestérolémie entraîne chez le lapin :

- Une augmentation du contenu en cholestérol des spermatozoïdes ainsi que des gamètes à morphologie anormale (33,6% de gamètes anormaux chez le lapin hypercholestérolémique contre 21,1% en condition contrôle).
- Une diminution de 22% des spermatozoïdes mobiles et de 50% des réactions acrosomiques induites par la progestérone, sans changement de la numération spermatique.

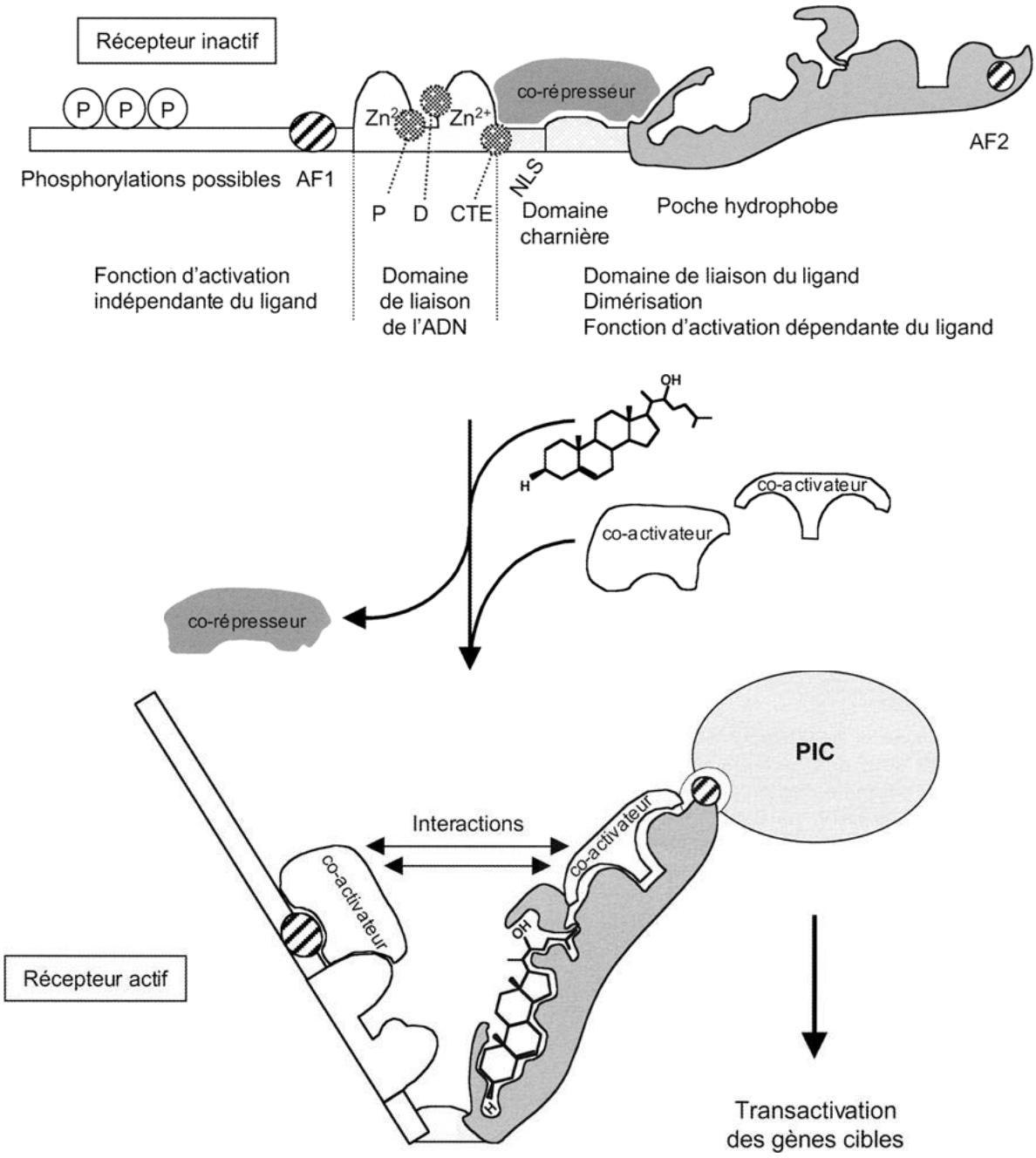
L'augmentation du cholestérol membranaire affecte la fluidité membranaire et altère donc l'efficacité de la capacitation, notamment mise en évidence par une baisse des niveaux de tyrosine phosphorylées (Saez Lancellotti et al., 2010). Bien que les auteurs ne discutent pas ce point, les modifications observées et la numération constante des spermatozoïdes pourraient indiquer que le phénotype soit au moins partiellement d'origine épididymaire.

### *2) Dyslipidémies et fertilité chez l'homme*

Très peu de données sont disponibles chez l'homme puisque la majorité des études se concentrent sur l'obésité sans forcément prendre en compte le bilan lipidique plasmatique. Une étude sur 501 partenaires masculins de couples souhaitant concevoir a néanmoins été réalisée (Schisterman et al., 2014). Le but de cette étude était de corréler les concentrations sériques en lipides avec les paramètres spermatiques classiques. Dans cette étude, l'IMC n'est pas corrélé à la concentration sérique en cholestérol total, indiquant que ces deux paramètres ne sont pas systématiquement liés. En revanche les concentrations sériques en cholestérol sont associées à

une diminution du volume du sperme et de la vitalité spermatique. Ces résultats mettent en évidence le rôle des lipides sériques dans la fertilité masculine et ce, indépendamment de l'IMC. Une étude plus ancienne a mis en évidence que la quantité de cholestérol total dans le liquide séminal de patients présentant une azoospermie est comparativement plus élevée que chez des patients normaux ou présentant une oligospermie. En revanche, une diminution des phospholipides dans le liquide séminal a été mise en évidence en cas d'oligo ou d'azoospermie ainsi que dans les spermatozoïdes d'hommes présentant une oligospermie. Une corrélation positive entre phospholipides séminaux et fertilité ainsi qu'une corrélation négative entre cholestérol séminal et fertilité étaient suggérées par les auteurs (Sebastian et al., 1987). Bien que ces corrélations soient établies on ne sait pas précisément à quel niveau ces dérégulations lipidiques affectent la fertilité.

L'étude de polymorphisme génique chez l'homme a également mis en évidence un lien entre métabolisme lipidique et fertilité. L'apolipoprotéine E est l'un des constituants des lipoprotéines VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), LDL et chylomicrons. Chez l'homme il existe 3 allèles *APOE* : ε2, ε3 et ε4 codant pour trois protéines fonctionnelles distinctes (Mahley and Rall, 2000), APOEε3 étant la forme normale. L'isoforme APOEε4 est connue pour augmenter les niveaux plasmatiques de cholestérol en particulier associé aux LDLs. Chez l'homme il a été montré que le génotype ε3/ε4 confère un risque de développer une infertilité masculine 3,82 fois supérieur au génotype ε3/ε3 (Setarehbadi et al., 2012). Ces données sont en accord avec une autre étude démontrant que le taux de natalité est inferieur lorsque le père portait l'allèle ε4 comparé aux autres allèles d'*APOE* (Gerdes et al., 1996). Les apolipoprotéines semblent jouer un rôle important dans la fertilité puisque des polymorphismes dans le gène *APOB* humain ont également été associés à une infertilité masculine (Peterlin et al., 2006).




**<u>Figure 51</u> : Représentation schématique du récepteur LXR et fonctions des différents domaines.**

En absence de ligand les co-répresseurs empêchent l'activation du récepteur. La fixation du ligand (ici le 22(R)-hydroxycholestérol) entraîne le relargage des co-répresseurs et le recrutement des co-activateurs. Un changement conformationnel du récepteur permet l'emprisonnement du ligand dans la poche hydrophobe et des interactions ente les co-activateurs, favorisant l'état permissif de la chromatine et le recrutement du complexe de pré-initiation de la transcription. Issu de *Volle et al., 2005*. 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, PIC : complexe de pré-initiation.

Ces différentes études mettent en relief le lien entre cholestérol et fertilité. Cependant et malgré l'importance des modifications lipidiques au cours de la maturation post-testiculaire, très peu d'études se focalisent sur l'impact des dyslipidémies sur cette maturation, la composante testiculaire étant systématiquement mise en avant même en absence de défaut de spermatogénèse.

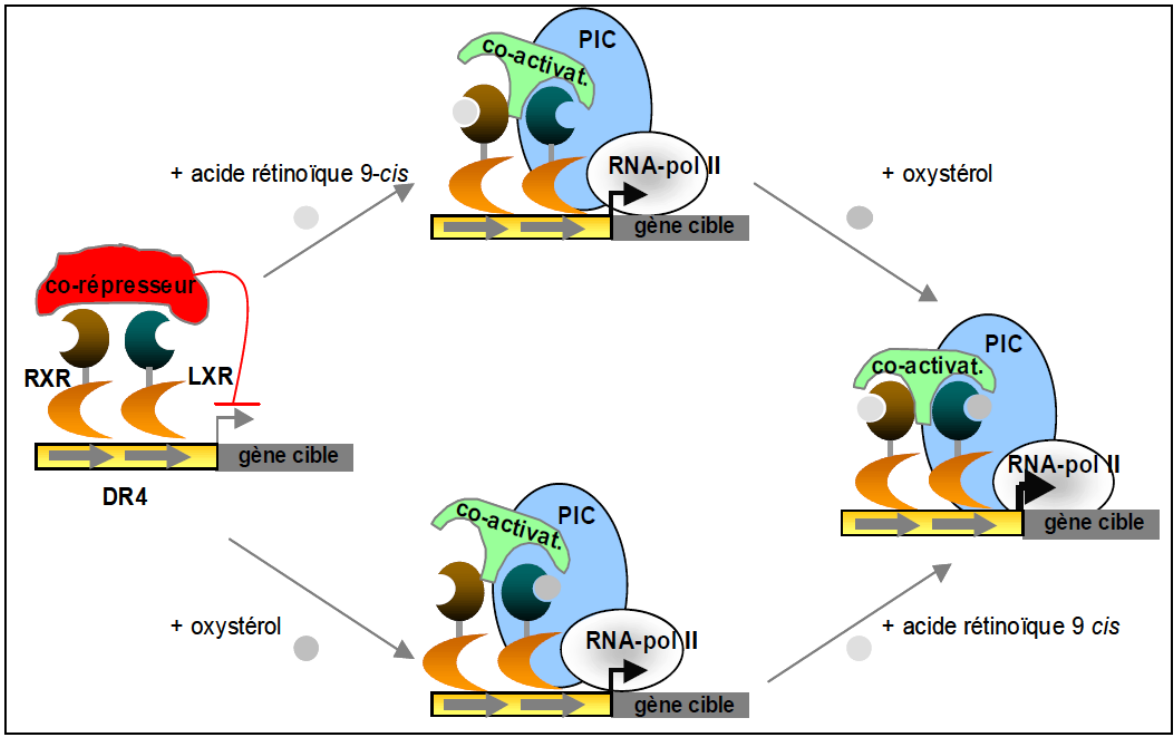
## C- Modèle d'étude : les souris invalidées pour les LXRs

### *1) Les LXRs*

#### a) Généralités

Les LXRs (*Liver X Receptors*) sont des récepteurs nucléaires activés par la fixation de leurs ligands, les oxystérols (Peet et al., 1998a). Ce sont des facteurs de transcription qui agissent en hétérodimère avec le récepteur à l'acide rétinoïque 9 *cis*, RXR (*Retinoid X Receptor*). Deux isoformes des LXRs existent chez les mammifères, LXRα (*NR1H3*) exprimé abondamment dans le foie, l'intestin, la rate et le rein et LXRβ (*NR1H2*) qui est exprimé plus faiblement mais de manière plus ubiquiste (Auboeuf et al., 1997; Repa et al., 2000). Chaque isoforme est constituée de 4 domaines (**Figure 51**) :

- Le domaine N-terminal (A/B). Il contient la région AF1 (*Activating Fonction1*) responsable de l'activité transcriptionnelle car elle permet le recrutement des co-activateurs.
- Le domaine de liaison à l'ADN ou domaine C. Il est composé d'un motif à deux doigts de zinc impliqué dans la reconnaissance des éléments de réponse LXRE ( *LXR Responsive Element* - (Willy and Mangelsdorf, 1997).
- Le domaine charnière ou domaine D reliant le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand. Les co-répresseurs peuvent se fixer à ce domaine pour maintenir la transcription inactive en absence de ligand.




**<u>Figure 52</u> : Mécanisme de régulation de la transcription dépendante des LXRs.**

En absence de ligand, l'hétérodimère interagit avec des co-répresseurs, ce qui réprime la transcription. La liaison du ligand de LXR ou RXR provoque le recrutement de co-activateurs et de la machinerie transcriptionnelle permettant la transcription des gènes cibles. La liaison des ligands de chaque hétérodimère a un effet synergique. D'après *Souidi et al., 2004*. LXR : Liver X Receptor, RXR : Retinoid X Receptor, PIC : complexe de pré-initiation, RNA-pol II : ARN polymérase II, LXRE : LXR Response Element.

- Le domaine de liaison au ligand (ou domaine E/F) en partie C-terminale est constitué d'une poche hydrophobe dans laquelle vient se fixer le ligand. La présence d'une fonction activatrice AF2 permet le recrutement de co-activateurs en présence du ligand.

L'hétérodimère LXR-RXR est constitutivement fixé à l'ADN sur les éléments de réponse. En absence de ligand la transcription génique est réprimée par la fixation des co-répresseurs. Après fixation du ligand, le récepteur subit un changement conformationnel permettant le relargage des co-répresseurs, l'emprisonnement du ligand dans la poche hydrophobe et le renforcement de la fixation des co-activateurs qui favorisent l'état permissif de la chromatine. La transcription des gènes cibles peut alors avoir lieu (**Figure 52** - (Wójcicka et al., 2007).

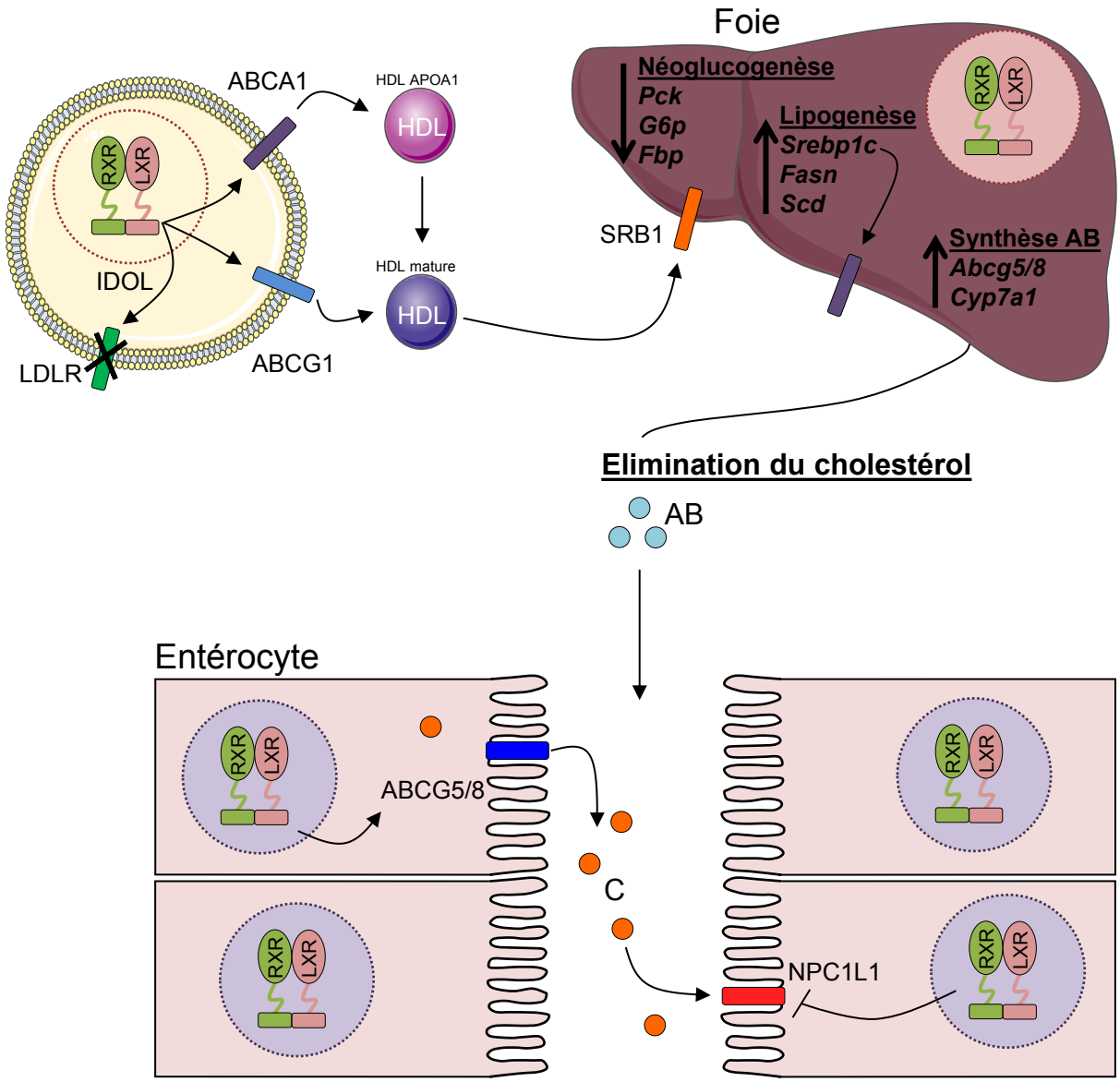
### b) Fonctions principales des LXRs

L'identification des oxystérols comme ligands naturels des LXRs a mis en évidence le rôle de ces récepteurs dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol. Ce rôle a été confirmé par l'analyse des souris invalidées pour les LXRs qui a permis de démontrer leur implication comme senseurs majeurs du cholestérol alimentaire (Peet et al., 1998a).

#### b-1) LXRs et homéostasie du cholestérol

L'activation des LXRs conduit à la stimulation du transport inverse du cholestérol, inhibe l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire et inhibe la synthèse *de novo* du cholestérol ainsi que son import dans les cellules (**Figure 53**).

Transport inverse du cholestérol : l'efflux du cholestérol intracellulaire représente la première étape du transport inverse du cholestérol. Cet efflux est initié par les transporteurs ABCA1 et ABCG1 tous deux cibles directes des LXRs. ABCA1 transfère le cholestérol de la membrane plasmique vers l'apolipoprotéine A1 tandis que ABCG1 transfère le cholestérol vers les HDL (Kennedy et al., 2005). Une étude a montré que l'administration d'agonistes des LXRs à des souris préalablement injectées avec des macrophages contenant du cholestérol radiomarqué favorisait l'excrétion du traceur dans les fèces, démontrant clairement le rôle des LXRs dans le




**<u>Figure 53</u> : Rôle des LXRs dans le métabolisme lipidique.**

Les LXRs régulent la lipogenèse hépatique en stimulant la synthèse d'acides gras et de triglycérides *via* la transcription de gènes tels que *Srebp1c*, *Fasn*, *Scd*. Les LXRs diminuent également l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogenèse (*G6p*, *Pck*, *Fbp*). Au niveau de certaines cellules les LXRs favorisent l'expression de transporteurs du cholestérol (*Abca1/g1*) permettant d'initier le transport inverse du cholestérol. De plus les LXRs stimulent l'expression de *Idol*, une E3 ubiquitine ligase qui entraîne la dégradation de LDLR, limitant ainsi l'entrée de cholestérol dans la cellule. Les LXRs induisent l'excrétion du cholestérol *via* ABCG5/8 et sa conversion en acides biliaires grâce à la régulation de CYP7A1. Dans les intestins, les LXRs limitent l'absorption du cholestérol *via* l'activation de *Abcg5/8* et l'inhibition de *Npc1l1*. D'après *Jakobsson et al., 2012*. ABCA1/G1/5/8 : ATP binding cassette, LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor, SR-B1 : Scavenger Receptor class B1, IDOL : Inducible Degrader Of the LDLR, HDL : High Density Lipoprotein, *Pck* : Phospho-Enol-Pyruvate-CarboxyKinase, *G6p* : Gucose-6-Phosphatase, *Fbp* : Fructose-1,6-Biphosphatase, *Srebp1c* : Sterol regulatory element-binding protein 1c, *Fasn* : Fatty Acid Synthase, *Scd* : Stearoyl-CoA Desaturase, AB : acides biliaires, C : cholestérol, NPC1L1 : Niemann-Pick C1 like 1.

transport inverse du cholestérol *in vivo* (Naik et al., 2006). Les LXRs stimulent également l'expression des gènes *NPC1* et *NPC2*. Ces protéines permettent d'assurer le transfert du cholestérol du compartiment endosomal vers la membrane plasmique où il devient alors disponible pour l'efflux (Rigamonti et al., 2005). Enfin les LXRs stimulent l'expression d'*APOE*, une protéine qui participe à l'efflux en tant qu'accepteur extracellulaire du cholestérol (Laffitte et al., 2001). Ces récepteurs favorisent donc le transport inverse du cholestérol en activant l'expression des transporteurs ABC mais également en augmentant la disponibilité des accepteurs extracellulaires.

Absorption intestinale du cholestérol : au niveau des entérocytes, l'absorption du cholestérol alimentaire est réalisée à travers le transporteur membranaire NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 like 1*). L'activation des LXRs diminue l'expression de ce transporteur limitant alors l'absorption intestinale du cholestérol. De plus les transporteurs ABCG5 et 8 sont eux chargés de renvoyer une partie du cholestérol vers la lumière de l'intestin. L'expression de ces deux transporteurs est stimulée par les LXRs (Wang, 2007).

Synthèse *de novo* du cholestérol : les souris invalidées pour *Lxra* présentent une augmentation de l'expression hépatique de *Srebp2* (*Sterol regulatory element-binding protein 2*) et de certains de ses gènes cibles comme *Hmgcs* (Hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase), *Hmgcr* ou *Sqs* (Squalène synthase), démontrant le rôle de cette isoforme des LXRs dans l'inhibition de la synthèse *de novo* du cholestérol (Peet et al., 1998b). De même les souris invalidées pour *Lxrβ* présentent une augmentation des transcrits de l' *Hmgcs* et de la *Sqs*, bien que cela soit dans une moindre mesure (Alberti et al., 2001). L'action des LXRs est cependant indirecte puisqu'ils agissent sur l'expression de *Srebp2* et pas directement sur les enzymes de la voie de synthèse du cholestérol. De plus, en réponse à un régime hypercholestérolémiant, on observe une diminution de l'expression des enzymes de biosynthèse du cholestérol chez les KO LXRs, démontrant que la régulation de ces gènes par SREBP2 reste prédominante (Eberlé et al., 2004).

Captage cellulaire du cholestérol : une grande partie du cholestérol plasmatique est transportée dans les LDL qui sont assimilés par les cellules *via* leur fixation sur le récepteur LDLR. Les LXRs sont capables d'activer l'expression d'*Idol* (*Inducible Degrader Of the LDLR*), une E3 ubiquitine ligase. IDOL va alors ubiquitinyler LDLR, ce qui entraîne sa dégradation protéasomale limitant l'entrée de cholestérol dans la cellule (Zelcer et al., 2009).

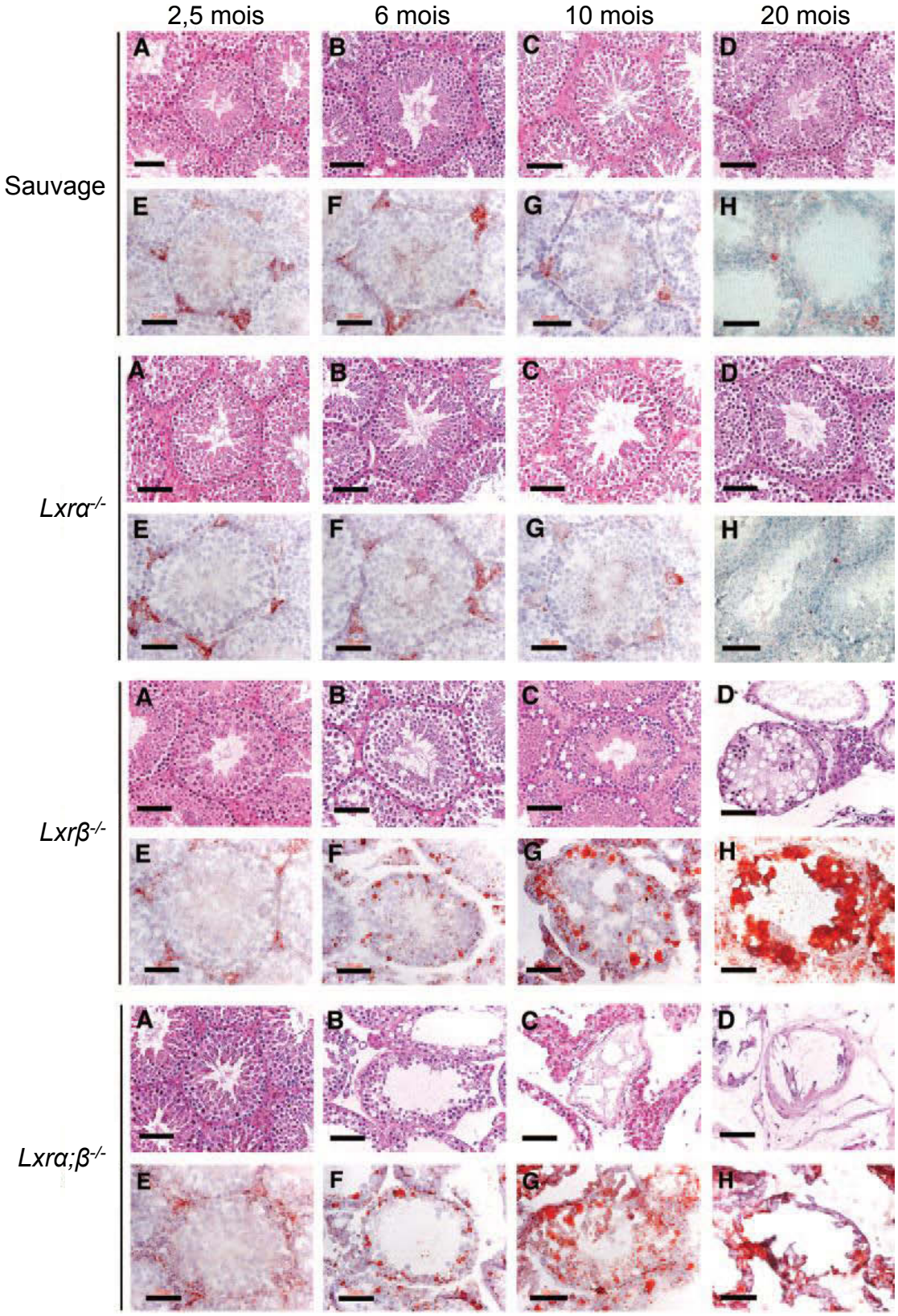
### b-2) Métabolisme des acides gras et du glucide

Les LXRs régulent la biosynthèse des acides gras par l'intermédiaire de SREBP1c qui lui-même régule les gènes impliqués dans cette voie : *Acc* (*Acetyl-CoA Carboxylase*), *Fasn* (*Fatty Acid Synthase*) ou encore *Scd* (*Stearoyl-CoA Desaturase* - (Eberlé et al., 2004). En effet, les souris *Lxra*$^{-/-}$ présentent une plus faible expression de *Srebp1c* et de ses gènes cibles et les souris invalidées pour les deux isoformes des LXRs présentent des quantités de triglycérides plasmatiques et hépatiques diminuées (Kalaany et al., 2005; Schultz et al., 2000).

Les LXRs ont également un rôle hypoglycémiant puisqu'ils sont capables d'inhiber l'expression de gènes de la néoglucogenèse tels que *Pck* (Phospho-Enol-Pyruvate-CarboxyKinase), *Fbp* (Fructose-1,6-Biphosphatase) ou *G6p* (Glucose-6-Phosphatase) ou d'activer l'expression du transporteur *Glut4* (*Glucose Transporteur 4*), stimulant ainsi l'entrée du glucose dans les adipocytes (Dalen et al., 2003; Laffitte et al., 2003)

### b-3) L'immunité

L'action anti-inflammatoire des LXRs a été largement décrite dans les macrophages, puisque l'utilisation d'un agoniste des LXRs provoque une diminution de l'expression de médiateurs de l'inflammation comme *iNOS* (Nitric Oxyde Synthase), *Cox-2* (CycloOxygénase-2) et *Il6* (InterLeukine-6) en réponse à une infection bactérienne ou à des lipopolysaccharides (Joseph et al., 2003). Ces récepteurs ont également un effet antiathérogène puisque leur activation par des agonistes entraîne une réduction des lésions athérosclérotiques dans des animaux modèles de cette pathologie (Joseph et al., 2002).




**<u>Figure 54</u> : Analyse histologique des testicules des souris invalidées pour *Lxr α* et/ou *β*.**

Analyses histologiques de testicules de souris sauvageS, *Lxrα*$^{-/-}$, *Lxrβ*$^{-/-}$ et *Lxr α;β*$^{-/-}$âgées de 2,5, 6, 10 et 20 mois. Chaque panel représente une coloration à l'hématoxyline éosine permettant d'apprécier la structure du tissu (A-D) ou une coloration à l'huile rouge mettant en évidence les accumulations lipidiques (E-H). Barres = 50µm. Issu de *Robertson et al., 2005*.

Les LXRs interviennent également dans de nombreux autres mécanismes/organes tels que l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, la production d'hormones surrénaliennes ou le maintien du système nerveux central. L'étude des souris *Lxrα;β*$^{-/-}$ a également démontré leur rôle prépondérant dans le maintien de la fertilité mâle.

### *2) Fertilité des souris Lxrα;β*$^{-/-}$

L'invalidation des deux isoformes des LXRs conduit à des défauts de fertilité qui se mettent en place dès 5 mois et qui entraînent une stérilité totale à 7 mois. Le phénotype reproducteur est composite puisqu'il touche à la fois le testicule et l'épididyme. L'analyse des souris invalidées pour *Lxrα*, *Lxrβ* ou pour les deux isoformes a permis de décortiquer leur rôle dans la fonction de reproduction.

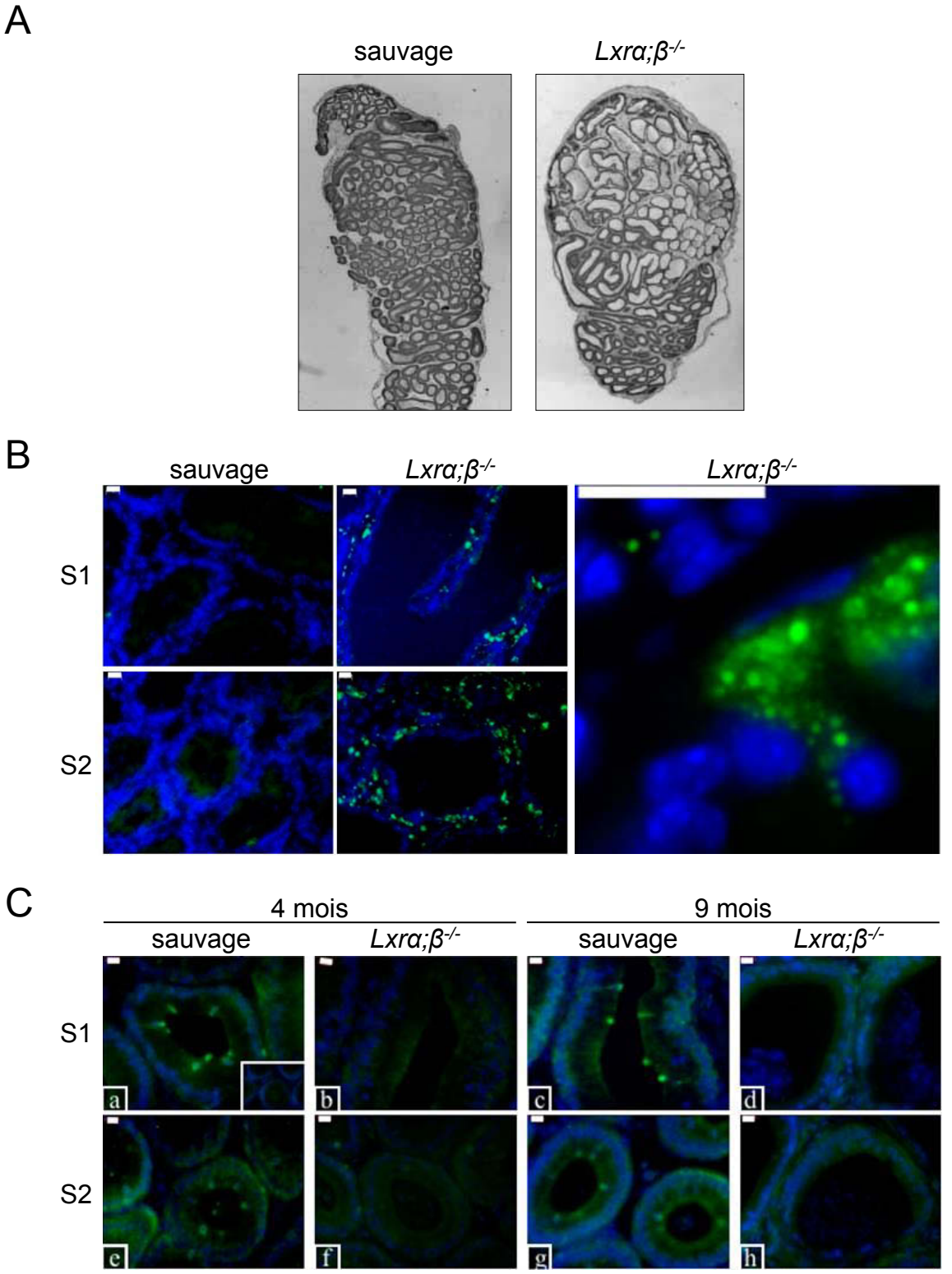
#### a) Le phénotype testiculaire

Alors que le double KO des LXRs (DKO) conduit avec l'âge à une stérilité totale, les simples KO (SKO, invalidation d'une seule des isoformes des LXRs), présentent une fertilité normale, démontrant un rôle redondant de chacune des isoformes dans le maintien de la fonction de reproduction (Robertson et al., 2005; Volle et al., 2007). L'analyse précise des SKO met également en évidence un rôle particulier de chacune des isoformes puisque le phénotype testiculaire n'est pas identique (**Figure 54**). En effet dès 2,5 mois de petites vésicules lipidiques apparaissent dans le compartiment basal des cellules de Sertoli chez les *Lxrβ*$^{-/-}$, alors que les testicules des *Lxrα*$^{-/-}$ sont parfaitement normaux. A 6 mois, ces vésicules lipidiques sont très importantes dans les tubes séminifères des *Lxrβ*$^{-/-}$ mais le testicule conserve sa structure et la production de spermatozoïdes est maintenue. A cet âge il n'y a toujours pas d'accumulation visible de lipides chez *Lxrα*$^{-/-}$. Enfin à 10 mois, l'accumulation lipidique dans les tubes séminifères des *Lxrβ*$^{-/-}$ est de plus en plus importante et la structure du tissu commence à être perturbée. Alors que la structure histologique des *Lxrα*$^{-/-}$ est toujours normale, les auteurs montrent que les DKO présentent systématiquement un phénotype plus aggravé au même âge que les *Lxrβ*$^{-/-}$, avec

notamment une perte des cellules germinales dès 6 mois. Ces résultats démontrent que l'isoforme alpha joue certainement un rôle dans ce phénotype (Robertson et al., 2005). Ces différences observées entre les génotypes sont principalement dues à une différence de localisation des isoformes. En effet, alors que les deux isoformes sont présentes dans les cellules germinales, bêta est plutôt spécifique des cellules de Sertoli et alpha est principalement retrouvée dans les cellules de Leydig (Volle et al., 2007). Au niveau sertolien LXRβ contrôle le métabolisme lipidique, les accumulations lipidiques visibles chez le *Lxrβ*$^{-/-}$ étant principalement dues à une perturbation des flux de cholestérol (la synthèse *de novo* n'étant pas perturbée dans le testicule - (Robertson et al., 2005; Volle et al., 2007). L'isoforme alpha quant à elle, régule principalement la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig et donc la production de testostérone, expliquant que les concentrations intra-testiculaires de cette hormone soient particulièrement basses chez les *Lxrα*$^{-/-}$. Cependant, ces niveaux n'étant pas nuls l'isoforme bêta pourrait également jouer un rôle dans la stéroïdogénèse, probablement en stimulant l'expression de facteurs paracrines par les cellules de Sertoli (Volle et al., 2007).

La présence des deux isoformes dans les cellules germinales pourrait expliquer l'absence de défauts de fertilité chez les SKO (Volle et al., 2007). En effet cette étude a démontré que l'isoforme bêta était impliquée dans la prolifération des cellules germinales et que sa perte était compensée par une diminution de l'apoptose de ces mêmes cellules. A l'inverse l'isoforme alpha semble impliquée dans la régulation de l'apoptose et sa perte est compensée par une augmentation de la prolifération des cellules germinales, conduisant à maintenir la balance prolifération/apoptose des cellules germinales dans les SKO.

Les LXRs ont donc un rôle prépondérant dans le testicule puisqu'ils participent au maintien de la spermatogénèse en garantissant l'intégrité des cellules de Sertoli, la production de testostérone par les cellules de Leydig et en maintenant la balance prolifération/apoptose des



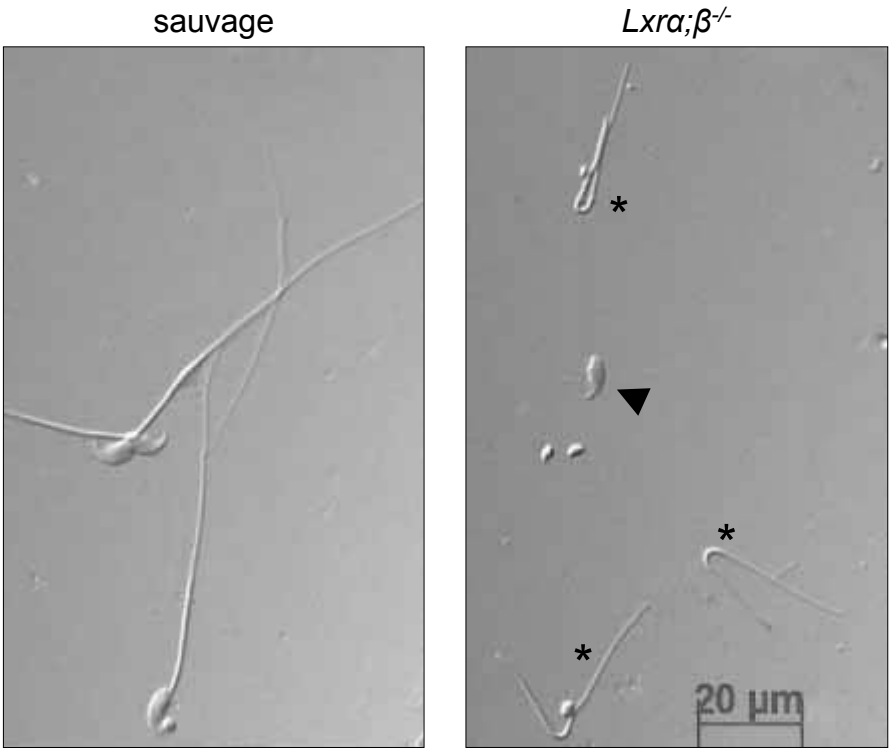

**<u>Figure 55</u> : Le phénotype épididymaire des souris invalidées pour *Lxrα* et *β*.**

A- Analyse histologique de la tête de l'épididyme. Les segments proximaux sont altérés chez les *Lxrα;β*$^{-/-}$ de 10 mois. Issu de *Frenoux et al., 2004*. B- Mise en évidence des accumulations lipidiques par marquage au rouge de Nil chez des souris de 9 mois. Les accumulations sont principalement interstitielles ou concernent les cellules apicales (grossissement à droite) chez les *Lxrα;β*$^{-/-}$. Barres = 20µm. Issu de *Ouvrier et al., 2009*. C- L'immunomarquage d'ABCA1 montre sa perte au pôle apical des cellules apicales des segments 1 et 2 chez les *Lxrα;β*$^{-/-}$ de 4 et 9 mois. Barres=10µm. Issu de *Ouvrier et al., 2009*.

cellules germinales. L'étude du DKO a également mis en évidence le rôle des LXRs au niveau épididymaire.

### b) Le phénotype épididymaire

Les deux isoformes des LXRs sont présentes dans l'épididyme. L'isoforme bêta est exprimée de manière homogène et importante dans tout l'organe tandis que l'expression de l'isoforme alpha est globalement plus faible et principalement retrouvée dans la tête de l'épididyme (Frenoux et al., 2004). Le phénotype des DKO LXR débute entre 4 et 5 mois et touche spécifiquement les segments proximaux de la tête, en particulier les segments 1 et 2. L'expression de gènes typiques de l'épididyme (*Gpx5*, *Gpx3*, *Pea3* : *Polyoma Enhancer Activator*) est altérée parfois de manière comparable entre le SKO bêta et le DKO, indiquant une spécificité de fonction de chacune des isoformes. Au niveau histologique, l'épithélium épididymaire est aminci avec une perte complète des stéréocils à 6 mois et une accumulation de vésicules lipidiques dans le tissu interstitiel et dans l'épithélium. Avec l'âge (9-10 mois) le phénotype s'aggrave avec de fortes inclusions lipidiques, un épithélium très fin et un élargissement des tubules parfois remplis d'une substance amorphe de nature inconnue (**Figure 55 A**). L'analyse plus fine des accumulations lipidiques a permis de montrer qu'elles étaient limitées au tissu interstitiel et aux cellules apicales des segments 1 et 2 (**Figure 55 B** - (Ouvrier et al., 2009). Ces inclusions n'ont pas pour origine une augmentation de la synthèse *de novo* du cholestérol. De même les transporteurs impliqués dans l'import de cholestérol (SR-B1 *Scavenger Receptor class B1*, LDLR) ne sont pas dérégulés chez les DKO. En revanche le transport inverse du cholestérol est affecté puisque la perte spécifique d'ABCA1 a été mise en évidence chez les DKO (**Figure 55 C**). Chez les souris sauvages, ABCA1 est localisé au pôle apical des cellules apicales dans les segments 1 et 2 puis au niveau des cellules principales dans les segments plus distaux. Sa perte spécifique dans les segments proximaux explique les fortes accumulations lipidiques visibles dans les cellules apicales et démontre une régulation régionalisée de l'expression d'ABCA1 par les LXRs. L'étude de ces différents transporteurs dans l'épididyme permet de souligner la complexité des flux de

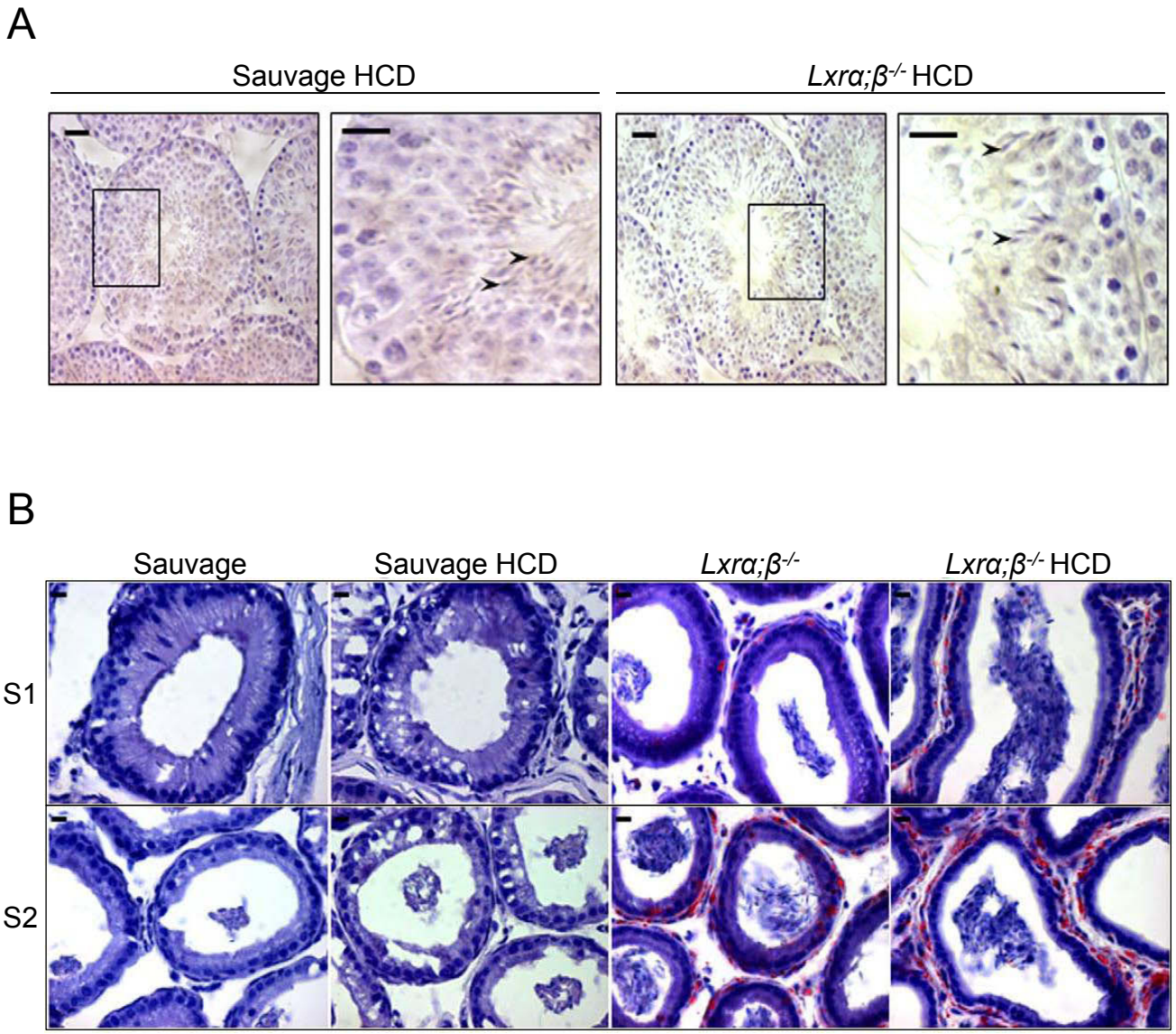



**<u>Figure 56</u> : Le phénotype spermatique des souris invalidées pour *Lxrα* et *β*.**

Les spermatozoïdes des souris de 11 mois invalidées pour les deux isoformes des LXRs présentent des altérations morphologiques. Les astérisques indiquent les flagelles angulés ou en épingle à cheveux, la pointe de flèche montre une tête spermatique isolée. Issu de *Frenoux et al., 2004*.

cholestérol dans l'épididyme. SR-B1 est localisé dans le tissu interstitiel au niveau de l'endothélium vasculaire où il pourrait prendre en charge les lipoprotéines provenant de la circulation sanguine. Le cholestérol peut être transféré vers la lumière des tubules *via* ABCA1 dans les cellules apicales (2 premiers segments) et *via* ABCG1 qui est localisé au pôle apical des cellules principales. De plus, la forte présence de SR-B1 au pôle apical de l'épithélium, et en particulier au niveau des cils dans le segment 2, suggère une intense activité de réabsorption du cholestérol. Les dérégulations de l'homéostasie lipidique dans l'organe entraînent une augmentation de l'apoptose au niveau épithélial, les cellules apicales étant particulièrement concernées. Avec un tel phénotype il est clair que la fonction épididymaire est perturbée. En effet, les rares spermatozoïdes retrouvés dans l'épididyme des DKO âgés présentent des anomalies morphologiques (Frenoux et al., 2004). Tous les gamètes mâles sont décapités et affichent des anomalies du flagelle (différentes angulations, épingle à cheveux – **Figure 56**). Une altération de la fonction épididymaire est très souvent associée à ce type d'anomalies morphologiques puisque des défauts de sécrétion/réabsorption du fluide peuvent être à l'origine de dérégulation du volume cellulaire spermatique (Sipilä et al., 2002; Yeung et al., 1999).

Bien que la présence des LXRs ait été démontrée dans l'épididyme, le phénotype observé pourrait être simplement la conséquence du phénotype testiculaire. En effet, la testostérone est primordiale pour le maintien de l'épididyme. Cependant, le phénotype épididymaire observé lors d'une castration est totalement différent de celui présent chez les DKO. En effet l'orchidectomie bilatérale conduit à une rapide régression de la taille de l'épididyme et à une dédifférenciation de son épithélium (Moore and Bedford, 1979), alors que la tête de l'épididyme des DKO est globalement plus grosse, avec des tubules élargis. De plus, dans le cadre d'une castration, l'épididyme entier est touché alors que les défauts observés dans le DKO ne concernent que les segments proximaux de la tête. Enfin, la supplémentation en testostérone ne restaure pas le phénotype épididymaire des DKO (Frenoux et al., 2004). Cependant, étant donné que le fluide




**<u>Figure 57</u> : Le phénotype testiculaire et épididymaire des souris *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD.**

A- Coloration à l'hématoxyline de Mayer de coupes paraffine de testicules de souris sauvageS ou *Lxrα;β*$^{-/-}$ de 4 mois nourries avec le régime enrichi en cholestérol (HCD). Pour chaque génotype l'image de droite représente un grossissement de l'encadré. Les têtes de flèches montrent les noyaux allongés de spermatides ou de spermatozoïdes. Barres = 20µm. B- Coloration à l'huile rouge de segments 1 et 2 de tête d'épididyme de souris sauvages ou *Lxrα;β*$^{-/-}$ de 4 mois nourries avec le régime contrôle ou le régime enrichi en cholestérol (HCD). Barres = 20µm. Issu de *Ouvrier et al., 2011*.

en provenance du testicule contient des facteurs paracrines, une implication testiculaire dans le phénotype épididymaire ne peut être complètement exclue.

### *3) Le modèle Lxrα;β$^{-/-}$ HCD*

Les travaux de l'équipe ont permis de démontrer que le phénotype épididymaire des DKO se mettait en place progressivement avec l'âge. En effet, très peu d'altérations sont visibles vers 4 mois alors que les défauts sont sévères au-delà de 9 mois et associés à une stérilité complète. Le phénotype apparaît donc de manière relativement rapide à un âge déjà avancé et n'est pas corrélé à un évènement physiologique connu (la puberté ayant déjà eu lieu). Ces constats ont donc conduit à se demander quelle était l'origine de cette cinétique. La synthèse *de novo* du cholestérol n'étant pas perturbée dans l'épididyme, les recherches se sont orientées vers l'incidence du cholestérol exogène. Afin de mieux comprendre cet aspect, l'effet d'un régime hypercholestérolémiant (HCD – *High Cholesterol Diet*) sur les DKO a été expérimenté (Ouvrier et al., 2011). Dans cette étude les souris sont utilisées à l'âge de 3 mois, c'est-à-dire avant que les phénotypes testiculaire et épididymaire n'apparaissent, et sont nourries durant 4 semaines avec le régime HCD. Les mâles DKO de 4 mois présentent une infertilité totale après 4 semaines de régime HCD. Le phénotype épididymaire est spécifiquement déclenché par le régime puisque les testicules présentent une histologie normale (**Figure 57 A**) sans anomalie de production des gamètes (numération en spermatozoïdes équivalente aux sauvages). Le phénotype épididymaire est très proche de celui décrit dans les DKO, seuls les segments 1 et 2 sont atteints. Des accumulations lipidiques très importantes sont observées dans ces segments, localisées principalement en péri-tubulaire au niveau des cellules musculaires lisses (**Figure 57 B**). Elles sont corrélées à une augmentation importante des concentrations plasmatiques en LDL. Comme chez les DKO âgés, l'épithélium épididymaire des segments proximaux est fortement aminci avec une perte des cils au pôle apical. Les cellules musculaires lisses perdent progressivement leur fonction comme en témoigne la perte du marqueur de contractilité cavéoline-1, suggérant que les contractions péristaltiques nécessaires à la progression des spermatozoïdes dans l'épididyme

pourraient être altérées. Ces résultats sont en accord avec l'accumulation de substance amorphe visible dans les tubules des animaux âgés (Frenoux et al., 2004). Ces cellules musculaires lisses affichent également le marqueur CD68 démontrant leur transdifférenciation en cellules spumeuses, un processus bien connu dans l'athérosclérose. Ces cellules semblent s'infiltrer au niveau de l'épithélium épididymaire, un phénomène favorisé par la production de la métalloprotéinase matricielle MMP-9, conduisant à la destruction de la membrane basale des tubules. Compte tenu des rapprochements avec l'athérosclérose, les auteurs ont proposé le terme d'épididymosclérose pour décrire ce phénotype.

Au final ces altérations épididymaires ont des répercussions spermatiques avec une diminution significative de la viabilité et de la mobilité des spermatozoïdes chez les DKO-HCD comparés aux DKO nourris au régime standard, ainsi qu'une augmentation des réactions acrosomiques précoces. Le pourcentage de spermatozoïdes décapités est également fortement augmenté chez les DKO-HCD, un phénomène qui avait également été observé chez les DKO vieillissants.

Cette étude a permis de mettre en évidence la sensibilité particulière de l'épididyme à une surcharge alimentaire en cholestérol. Ces données démontrent clairement l'impact délétère d'une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol sur la fonction épididymaire et donc sur la fertilité. Les souris *Lxra;β*$^{-/-}$ nourries avec le régime HCD fournissent un modèle de choix pour étudier les conséquences d'une dyslipidémie sur la maturation post-testiculaire.

# *Projet de Recherche*

Les souris invalidées pour les LXRs constituent un modèle intéressant pour l'étude de l'impact d'une dyslipidémie sur la maturation post-testiculaire et la fertilité. Le projet de recherche s'est organisé en deux axes :

- Le rôle de chacune des isoformes des LXRs dans le testicule a été bien décrit. Ces recherches ont permis de mettre en évidence que les isoformes alpha et bêta avaient des fonctions redondantes mais également des rôles spécifiques, notamment *via* leur restriction d'expression dans les différents types cellulaires qui composent le testicule. Bien que les premières études ne semblent pas mettre en évidence une variation du phénotype épididymaire entre les souris invalidées pour *Lxra* ou *Lxrβ*, les expérimentations étaient trop sommaires pour pouvoir l'affirmer.

**Le premier projet a consisté en l'étude approfondie du phénotype épididymaire des modèles murins *Lxrα*$^{-/-}$ et *Lxrβ*$^{-/-}$. L'objectif de ce travail était de caractériser le rôle de chacune des isoformes dans l'épididyme et de mettre en évidence les conséquences de la perte d'une isoforme sur la maturation spermatique et la fertilité. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence que certains processus physiologiques dans l'épididyme étaient spécifique de l'une ou l'autre des isoformes.**

- Le modèle *Lxra;β*$^{-/-}$ nourri avec un régime hypercholestérolémiant a démontré son intérêt pour l'étude de l'infertilité post-testiculaire en contexte dyslipidémique. Lorsqu'il est donné à des souris jeunes, le régime déclenche préférentiellement le phénotype épididymaire chez les *Lxra,β*$^{-/-}$, sans altérer la fonction testiculaire. Après un mois de régime, l'infertilité est totale dans ce modèle, démontrant l'importance de la maturation épididymaire dans l'acquisition du pouvoir fécondant.

**L'objectif de ce projet était de comprendre comment et à quel niveau la dyslipidémie affecte la maturation épididymaire et conduit à l'infertilité. Au cours de la maturation épididymaire la composition lipidique et protéique des spermatozoïdes est fortement**

**remaniée, ces paramètres pourraient donc être affectés par la dyslipidémie. De plus, comme nous avons pu le décrire en introduction, la capacitation dépend largement de la composition protéique et lipidique de la membrane plasmique spermatique. Des défauts de maturation épididymaire pourraient donc avoir des répercussions délétères sur la capacitation.**

# *Résultats*

## Présentation de la première publication

**BIOLOGY OF REPRODUCTION**

**Liver X Receptors (LXRs) Alpha and Beta Play Distinct Roles in the Mouse Epididymis**

Ce premier article apporte des éléments nouveaux quant aux rôles de chacune des isoformes des LXRs dans l'épididyme et dans la fertilité mâle en général. Comme nous avons pu le décrire en introduction, les souris mâles invalidées pour les deux isoformes des LXRs (DKO) présentent un phénotype composite, à la fois testiculaire et épididymaire, qui se met en place avec l'âge et conduit à une stérilité totale. Alors que le rôle de chacune des isoformes est bien décrit dans le testicule (Volle et al., 2007), très peu de données sont disponibles concernant l'épididyme. L'utilisation des souris *Lxrα*$^{-/-}$ et *Lxrβ*$^{-/-}$ (SKO) a permis de mettre en évidence que les isoformes des LXRs avaient des rôles redondants mais également des rôles spécifiques dans la physiologie épididymaire. En effet les gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol, des acides gras et des triglycérides sont principalement dérégulés dans l'épididyme des souris *Lxrβ*$^{-/-}$. Ce résultat est corrélé à des accumulations lipidiques péri tubulaires et intraépithéliales plus importantes dans l'épididyme des *Lxrβ*$^{-/-}$ comparés aux *Lxrα*$^{-/-}$. En revanche les souris *Lxrα*$^{-/-}$ présentent un phénotype tissulaire plus important avec notamment un amincissement de l'épithélium des segments proximaux 1 et 2, phénotype qui se rapproche de celui des DKO. Les deux modèles SKO présentent une altération de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, mais les gènes concernés ne sont pas systématiquement communs aux deux génotypes. Enfin, les deux modèles SKO présentent une hypofertilité avec notamment une diminution du nombre de petits par portée.

BIOLOGY OF REPRODUCTION (2016) **94**(3):55, 1–11
Published online before print 20 January 2016.
DOI 10.1095/biolreprod.115.133538

# Liver X Receptors (LXRs) Alpha and Beta Play Distinct Roles in the Mouse Epididymis[1]

**Marjorie Whitfield,[3,4] Aurélia Ouvrier,[3,4] Rémi Cadet,[4] Christelle Damon-Soubeyrand,[4] Rachel Guiton,[4] Laurent Janny,[4] Ayhan Kocer,[4] Geoffroy Marceau,[5,6] Hanae Pons-Rejraji,[4] Amalia Trousson,[7] Joël R. Drevet,[2,4] and Fabrice Saez[4]**

[4]*Equipe "Mécanismes post-testiculaires de l'infertilité," Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR GReD (Génétique Reproduction & Développement) CNRS 6293, INSERM U1103, Aubière, France*
[5]*"Retinoids, Reproduction Developmental Diseases," School of Medicine, Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France*
[6]*Biochemistry and Molecular Biology Department, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France*
[7]*Equipe "Lipides, récepteurs nucléaires et troubles chez l'homme" & Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne (CRNH), Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR GReD (Génétique Reproduction & Développement) CNRS 6293, INSERM U1103, Aubière, France*

## ABSTRACT

**After its production in the testis, a spermatozoon has to undergo posttesticular maturation steps to become fully motile and fertile. The first step is epididymal maturation, during which immature spermatozoa are transformed into biochemically mature cells ready to proceed to the next step, capacitation, a physiological process occurring in the female genital tract. The biochemical transformations include modification of sperm lipid composition during epididymal transit, with significant changes in fatty acids, phospholipids, and sterols between the caput and the cauda epididymal spermatozoa. Although quantitative aspects of these changes are well documented for several mammalian species, molecular mechanisms governing these steps are poorly understood. Transgenic male mice invalidated for the two liver X receptors (LXRalpha and LXRbeta, nuclear oxysterol receptors regulating cholesterol and lipid metabolism) become sterile when aging, showing an epididymal phenotype. We used single-knockout-model mice to characterize the role of each LXR isoform during sperm maturation in the epididymis. We show here that although a certain redundancy exists in the functions of the two LXR isoforms, some physiological processes are more under the influence of only one of them. In both cases, aging males showed slight subfertility, associated with dyslipidemia, emphasizing the importance of lipid metabolism in relation with male fertility.**

*cholesterol homeostasis, epididymis, inflammation, lipids, LXR, spermatozoa*

[1]M.W. and A.O. were supported by the French Ministry of Higher Education and Research (MESR). R.C., C.D.-S., R.G., L.J., A.K., H.P.R, A.T., J.R.D., and F.S. received funds from INSERM, CNRS, and MESR.
[2]Correspondence: Joël R. Drevet, CNRS UMR 6293/INSERM U 1103, GReD Campus Universitaire des Cézeaux, 10 Avenue Blaise Pascal, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France.
E-mail: joel.drevet@univ-bpclermont.fr
[3]These authors contributed equally to this work.

Received: 24 July 2015.
First decision: 11 August 2015.
Accepted: 11 January 2016.
© 2016 by the Society for the Study of Reproduction, Inc. This article is available under a Creative Commons License 4.0 (Attribution-Non-Commercial), as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0
eISSN: 1529-7268 http://www.biolreprod.org
ISSN: 0006-3363

## INTRODUCTION

Male fertility can be reduced in many ways, but it has been estimated that for about 50% of cases the cause is not known [1]. Posttesticular defects may be important, as the spermatozoon is not a fully mature cell after production in the male gonad and posttesticular maturation events are necessary for it to be able to fulfill its mission, moving to meet, recognize, and fertilize the oocyte [2–6]. These events start in the epididymis, the first organ that sperm cells have to go through when they leave the testis. Molecular changes during epididymal maturation include modification of the sperm plasma membrane lipid content, leading to an increase in membrane fluidity critical for the next maturation step occurring in the female genital tract, i.e., capacitation [7, 8]. Although quantitative lipid changes have been previously documented for several mammalian species, the underlying molecular mechanisms remain largely unknown. Recent advances have been made to improve understanding of the maturation mechanisms concerning cholesterol content, involving a particular class of nuclear receptors, the liver X receptors (LXRs). LXRα (Nr1h3) and LXRβ (Nr1h2) are nuclear receptors activated by oxysterols, metabolic derivatives or oxidized forms of cholesterol. They are well-characterized transcription factors regulating cholesterol homeostasis in various cell types, involved in the control of physiological processes such as lipid and metabolic homeostasis, energy utilization, differentiation, proliferation, inflammation, and reproduction [9–12].

The two LXR isoforms (LXRα and LXRβ) have been invalidated in mice, and *Lxrα;β*$^{-/-}$males show an age-dependent reproductive phenotype. Subfertile when young, *Lxrα;β*$^{-/-}$males become infertile at 8–9 mo of age. This is the result of a ''composite'' phenotype involving both testicular and epididymal defects [11, 13–15]. The epididymal phenotype is mainly characterized by cholesteryl ester (CE) accumulation [15] in the proximal caput epididymis (composed of five different segments as described in [16]), associated with the presence of an amorphous substance in the epididymal lumen [13]. CE accumulation was observed to be more pronounced in both apical cells of the caput epididymal epithelium and peritubular smooth muscle cells [17]. The apical cells of the proximal caput epididymis concomitantly lost expression of the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), an important actor of cholesterol efflux to extracellular acceptors such as Apo-A1-containing lipoproteins [14].Testicular and posttesticular defects led to the observation of broken spermatozoa when



Downloaded from www.biolreprod.org.

they were retrieved from the cauda epididymis of old $Lxr\alpha;\beta^{-/-}$ animals [13].

The present study investigates whether individual isoforms of the LXRs (LXRα and LXRβ) play different functions in epididymal physiology and posttesticular sperm maturation. We used aged male mice (6–14 mo) from strains invalidated for only one LXR isoform ($Lxr\alpha^{-/-}$ and $Lxr\beta^{-/-}$), to address this question, and the results clearly showed that, although one isoform can partly compensate for the other, each LXR isoform has particular functions in relation with epididymal physiology.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Wild-type (*wt*) and Lxr-knockout mice ($Lxr\alpha^{-/-}$ [10] and $Lxr\beta^{-/-}$ [18]) were maintained with a mixed-strain background (C57BL/6:129Sv) and were housed in an animal facility with controlled environment (22°C, 12L:12D) and fed ad libitum with Global-diet_2016S (Harlan). Mouse housing and manipulation were approved by the Regional Ethic Committee in Animal Experimentation (C2E2A, authorization CE99-12). For blood sampling, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (100 and 10 mg · $kg^{-1}$, respectively), in order to perform cardiac puncture. After the puncture, mice were killed by cervical dislocation before tissue sampling.

### Fertility

A group of male mice at 10, 12, and 14 mo of age were mated with 8-wk-old CD-1 *wt* females (two females per male). Mice were left during 8 days in the same cage; they were then separated and the females were housed in individual cages to follow gestations and deliveries.

### Spermatozoa Preparation and Evaluation

Epididymides were removed and, after dissection, the cauda or the caput epididymis was transferred to a small glass dish containing 500 μl of Whitten HEPES medium (20 mM HEPES, pH 7.3, 100 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM $KH_2PO_4$, 1.2 mM $MgSO_4$, 5.5 mM glucose, 1 mM pyruvic acid, 4.8 mM lactic acid; Sigma-Aldrich). To recover sperm cells, repeated punctures with a 26-gauge needle were made. After 10 min of incubation at 37°C to allow for sperm cell dispersion, sperm suspensions were recovered. Spermatozoa were counted in a Malassez hemacytometer after dilution of the original cell suspension (1:10 or 1:50 in PBS). Viability was also evaluated: 20 μl of sperm suspension and 20 μl of eosin solution (0.01 g · $ml^{-1}$) were mixed; 30 sec later, 30 μl of nigrosin suspension (0.07 g · $ml^{-1}$) was added and the suspension was mixed again. Then, 30 μl of the suspension was spread on a glass slide. After drying at room temperature (18–22°C), sperm viability was determined: dead and living spermatozoa had pink- and white-colored heads, respectively. A minimum of 200 spermatozoa was counted per sample. Sperm morphology was evaluated after coloration using the Shorr method [19], the percentage of broken spermatozoa was evaluated by counting at least 200 cells per slide.

### Tissue Preparation and Masson Trichrome Stain

After dissection, tissues were either snap frozen in liquid nitrogen for further use or processed for fixation as follows: tissues were fixed 24 h at 4°C in paraformaldehyde 4% in PBS before being rinsed three times in PBS. They were then processed for embedding either in paraffin or in cryosection medium (Neg50; Microm Microtech). Paraffin sections (5 μm) of caput epididymis from *wt*, $Lxr\alpha^{-/-}$, and $Lxr\beta^{-/-}$ mice were stained following a classical Masson trichrome staining procedure [20]. Slides were finally mounted using Cytoseal 60 (Electron Microscopy Sciences) as a mounting medium and observed.

### Western Blot Analysis

Proteins (30 μg) were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond ECL; Amersham Biosciences). Blots were blocked with 10% low-fat dried milk/0.1% Tween 20/Tris base salt (for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [GAPDH]) or 0.1% Tween 20/Tris base salt-5% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich; for AKT and Phospho-AKT) and then incubated with either anti-GAPDH (1:5000; Novus Biological, Interchim), anti-AKT (1:3000; Cell Signaling, Ozyme), or anti-Phospho-AKT (1:3000; Abcam) overnight at 4°C. Detection was performed with goat anti-rabbit or goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:10 000; P.A.R.I.S) using the ECL Western Blotting Detection kit (Amersham) on hyperfilms (Amersham). Densitometric analyses were carried out using Multi Gauge V3.2 software.

### Oil Red O Staining

Cryosections (7 μm) were stained with Oil Red O (Sigma-Aldrich) as previously described [15], a method commonly used to stain neutral lipids (triglycerides and CEs).

### Immunohistochemistry

After deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidases were inhibited (30 min in 0.3% $H_2O_2$ [Sigma-Aldrich] in water) and sections blocked in PBS-BSA 1% (w/v; Euromedex) for 30 min. Slides were then incubated overnight at 4°C with the different primary antibodies: rabbit polyclonal anti-matrix-metalloprotease-9 (1:100; Novus Biologicals, Interchim) and anti-Ki67 (cell proliferation marker; 1:1000; Leica), diluted in PBS-BSA (Sigma-Aldrich) 0.1% w/v. Sections were washed 5 min in PBS and incubated 1 h with biotin-SP-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H + L) antibodies (1:500 in PBS-BSA 0.1% w/v; Jackson Immuno-research, Immunotech). After a wash in PBS, sections were incubated 30 min with peroxidase-conjugated streptavidin (1:500 in PBS; Jackson Immunoresearch). Color was developed with the Vector NovaRED substrate kit for peroxidase (Vector). Unless indicated, slides were counterstained with Hematoxylin QS (Vector), dehydrated, and then mounted with Cytoseal 60 mounting medium before observation.

### In Situ Cell Death Detection (TUNEL Assay)

After deparaffinization and rehydration, paraffin sections (5 μm) were incubated for 8 min in unmasking buffer (trisodium citrate 10 mM, pH 6.0) in a microwave oven. Then the slides were incubated with 0.3 U/μl terminal deoxynucleotidyl transferase (Euromedex), 6.7 mM biotin-11-dUTP (Euromedex), and 26.7 mM dATP (Promega) in terminal deoxynucleotidyl transferase buffer 1 h at 37 C. For the negative control, the enzyme was omitted from the system. Extravidin alkaline phosphatase conjugate (dilution 1:100; Sigma-Aldrich) was added on the slides for 25 min at room temperature. Sigmafast FastRed TR/Naphthol AS-MX (Sigma-Aldrich) was used as substrate according to the manufacturer's instructions. Counterstain was performed with Mayer hematoxylin solution (Sigma-Aldrich) for 30 sec.

### Quantification of mRNA by Real-Time Quantitative RT-PCR

Total mRNAs from caput epididymides were isolated using the NucleoSpin RNA II column kit (Macherey-Nagel), according to manufacturer's instructions. RNA (1 μg) was reverse transcribed with Moloney leukemia virus reverse transcriptase and random hexamer primers (Promega) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed with SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa Bio) on a LightCycler 480 II (Roche). Primer sequences are listed in Table 1. The relative accumulation level of each mRNA was normalized using 36b4 as a standard, following the comparative Ct method (ΔΔCt method).

### Plasma Lipid Dosages

Following cardiac punctures, blood was kept on ice in heparin-coated tubes and centrifuged 15 min at 1500 × *g* at 4°C, and then plasma was recovered and kept at −80°C until use. Analyses were performed on an automated clinical chemistry analyzer (Hitachi Modular; Roche Diagnostic) based on enzymatic colorimetric assays.

### Statistical Analysis

To determine whether differences were statistically significant, groups were compared using the Mann-Whitney test. A $P$ value of 0.05 or less was considered to be statistically significant. The software GraphPad PRISM 5 was used to perform the statistical analysis and to generate the associated graphs.

## RESULTS

### LXR Isoforms Differentially Regulate Cholesterol and Lipid Homeostasis in the Caput Epididymis

Cholesterol and lipid homeostasis are modified in *Lxr*-double-knockout animals, provoking a dyslipidemia with an



Downloaded from www.biolreprod.org.

TABLE 1. Sequences of the primers used in quantitative RT-PCR experiments.

| Gene | NCBI reference # | Forward primer (5′→ 3′) | Reverse primer (5′→ 3′) | Amplicon size (bp) |
|---|---|---|---|---|
| *36b4* | NM_007475.5 | gtc act gtg cca gct cag aa | tca atg ctg cct ctg gag at | 98 |
| *Abca1* | NM_013454.3 | gga gct ggg aag tca aca ac | aca tgc tct ctt ccc gtc ag | 176 |
| *Abcg1* | NM_009593.2 | atg gcc tgt ctg atg gcc gct t | ggg ccc ctc ggg tac aga gta g | 270 |
| *Acat2* | NM_009338.3 | cac ccc agc gaa cgc atc | ctc cca taa cag aag gct cc | 146 |
| *Bad* | NM_007522.3 | ggc ttg agg aag tcc gat cc | tcc atg atg act gtt ggt ggc | 252 |
| *Bax* | NM_007527.3 | tgg agc tgc aga gga tga ttg | cac gga gga agt cca gtg tc | 216 |
| *Bcl-2* | NM-009741.4 | ctt aga aaa tac agc att gcg gag | gga tgt gct ttg cat tct tgg | 380 |
| *B-myc* | NM_023326.1 | tca tgt gcg acg atg agg ag | gaa gct atc acc gtc gtg gt | 197 |
| *Ccnd2* | NM_009829.3 | tcc cgc agt tcc tat ttc | ctg ggg ctt cac aga gtt gt | 290 |
| *Hmgcr* | NM_008255.2 | ctt gtg gaa tgc ctt gtg att | agc cga agc agc aca tga t | 75 |
| *Idol* | NM_153789.3 | gcc ggc gtt gtg gac ctt gt | gga cag gac tgc agc tgg gc | 260 |
| *Il1b* | NM_008361.3 | gtt gat tca agg gga cat ta | agc ttc aat gaa aga cct ca | 106 |
| *Il6* | NM_03168.1 | aca acc acg gcc ttc cct act t | cac gat ttc cca gag aac atg tg | 129 |
| *Tnfa* | NM_013693.2 | ctg tag ccc acg tcg tag c | ttg aga tcc atg ccg ttg | 97 |
| *Ldlr* | NM_001252658.1 | cgc gac tgc cag gac tgg tc | ggt cca tgt gga agc cgg cc | 262 |
| *Fasn* | NM_007988.3 | ccc caa ccc tga gat ccc a | ttg atg ccc acg ttg cc | 90 |
| *Srebf1* | NM_011480.3 | gga gcc atg gat tgc aca tt | gct tcc aga gag gag gcc ag | 182 |
| *Srebf2* | NM_033218.1 | gga gcc ggt gat tcg ccc ac | cag cgt acc agg cgc agc tt | 228 |

increase in plasma concentration of low-density lipoproteins (LDLs) [17]. Plasma lipid dosages confirmed that the invalidation of only one LXR isoform triggered a similar situation with a significant increase in plasma LDL levels (Fig. 1). We also observed a significant increase in cholesterol and high-density lipoproteins (HDLs) solely in *Lxrβ*$^{-/-}$ animals. Plasma triglycerides were not significantly different in the single knockouts whereas they were significantly different between *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ animals as previously reported [17, 21]. The impact of LXR invalidations on cholesterol and lipid

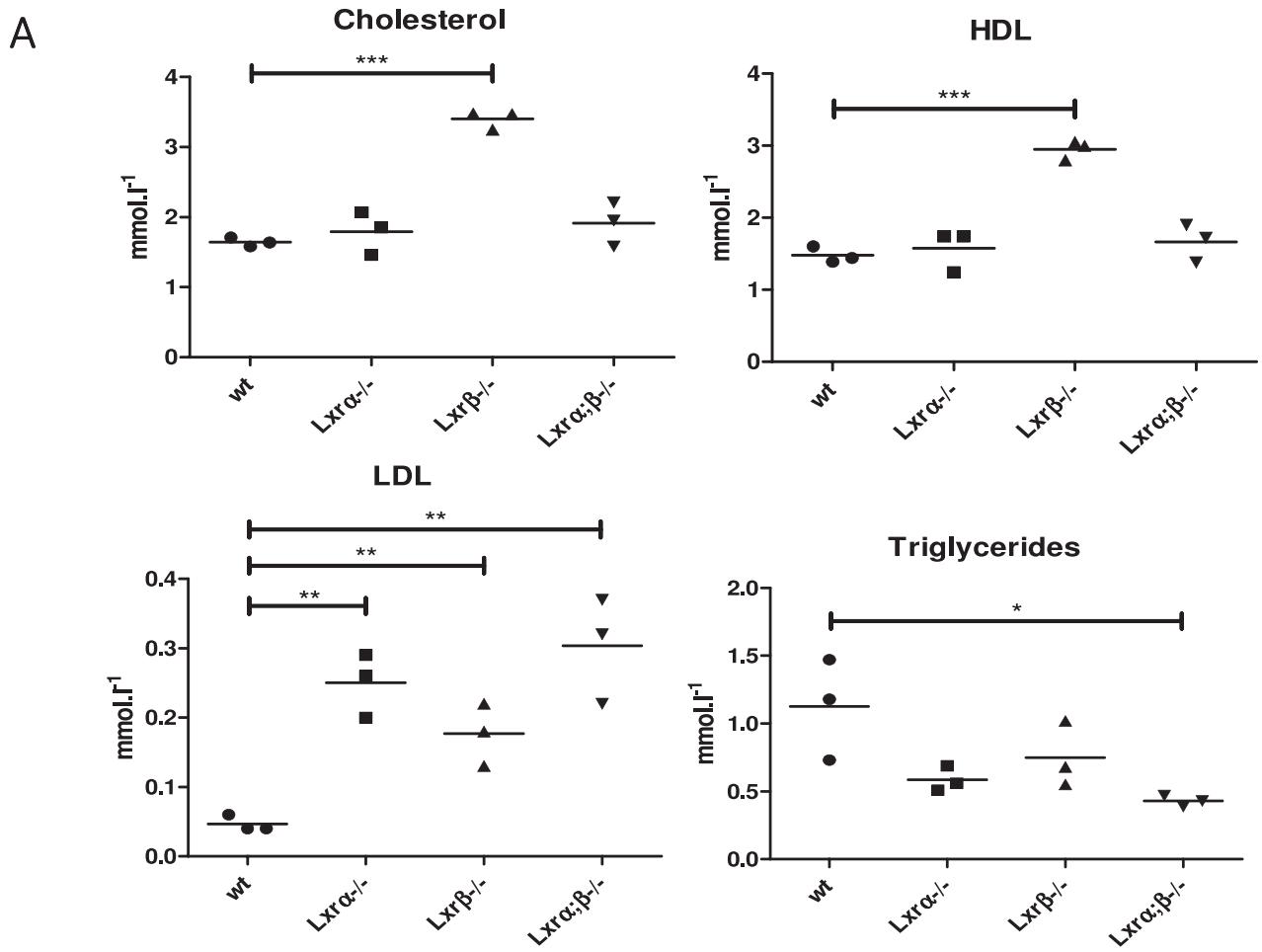



FIG. 1. Influence of LXR isoforms on plasma lipid parameters of 14-mo-old male mice. Cholesterol, HDL, LDL, and triglyceride plasma levels were measured in three male mice for each genotype. Individual results are represented and the horizontal bar represents the mean. *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$ between the compared groups (Mann-Whitney test).



Downloaded from www.biolreprod.org.

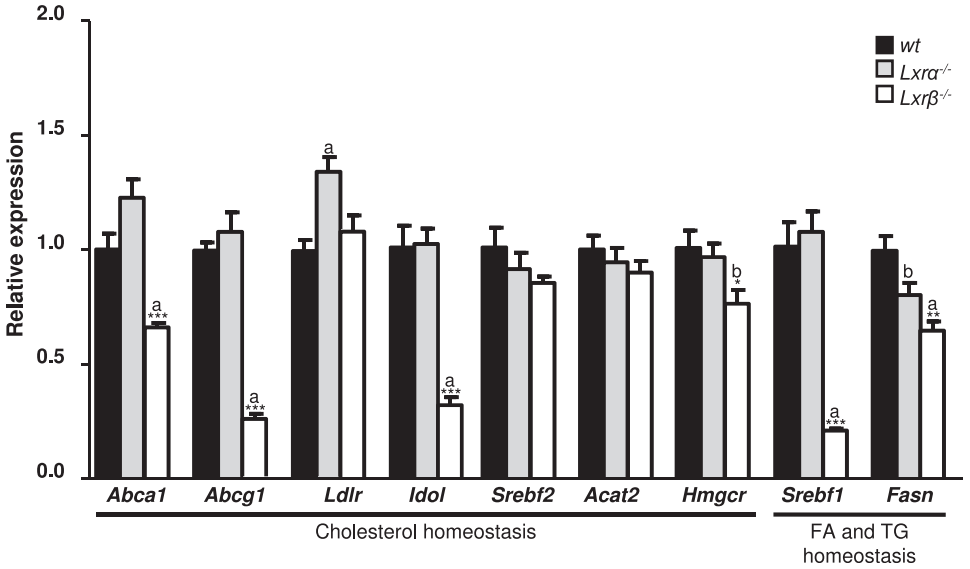



FIG. 2. Influence of LXR isoforms on cholesterol, fatty acid, and triglyceride homeostasis-related gene expression in the caput epididymis of 12-mo-old mice. Relative gene expression levels (compared to *wt* mice) of LXR-target genes involved either in cholesterol homeostasis regulation (*Abca1, Abcg1, Ldlr, Idol, Srebf2, Acat2,* and *Hmgcr*) or in lipid homeostasis (*Srebf1* and *Fasn*) were measured by quantitative real-time PCR. Data are means ± SEM from at least six individuals per genotype. a, $P < 0.01$ versus *wt*; b, $P < 0.05$ versus *wt*; *$P < 0.05$ versus $Lxr\alpha^{-/-}$; **$P < 0.01$ versus $Lxr\alpha^{-/-}$; ***$P < 0.001$ versus $Lxr\alpha^{-/-}$ (Mann-Whitney test).

homeostasis in the caput epididymis was first tested by measuring mRNA levels of known LXR-target genes. As shown in Figure 2, cholesterol and lipid homeostasis were more specifically controlled by LXRβ than by LXRα. Messenger RNA accumulation for ABCA1 and ABCG1, two proteins involved in cholesterol efflux, were significantly down-regulated in $Lxr\beta^{-/-}$ animals. The levels of expression of LDL receptor (LDLR) were slightly up-regulated in $Lxr\alpha^{-/-}$ animals compared to *wt*, whereas the mRNA coding for the inducible degrader of LDLR (IDOL) was down-regulated in $Lxr\beta^{-/-}$ animals. Expression levels of genes involved in cholesterol biosynthesis and esterification (*Srebf2*, *Acat2*, and *Hmgcr*) were not modified except for a slight down-regulation of *Hmgcr* in $Lxr\beta^{-/-}$ animals. Finally, genes controlling fatty acid and triglyceride metabolisms (*Srebf1* and *Fasn*) were also specifically down-regulated in $Lxr\beta^{-/-}$ animals. *Fasn* was also significantly down-regulated in $Lxr\alpha^{-/-}$ animals but to a lesser extent.

The accumulation of CE in the epididymis and the testis has previously been described in $Lxr\alpha;\beta^{-/-}$ animals as a consequence of cholesterol homeostasis disturbances [17, 22]. We show here that the selective deletion of only one LXR isoform does not have the same effects on this parameter (Fig. 3). Whereas $Lxr\alpha^{-/-}$ animals presented neutral lipid accumulation in peritubular cells surrounding the epididymal tubules and in cells at the basal region of the epithelium, $Lxr\beta^{-/-}$ animals showed mainly intraepithelial accumulation, located either in the basal region of the epithelium or protruding towards the lumen in a pyramidal shape. The wt mice sometimes showed small inclusions in the basal region of the epithelium in segment 1 (visible in the upper right panel). In both genotypes, small inclusions could be observed in the interstitial tissue between the epididymal tubule sections (see arrowheads in Fig. 3). This neutral lipid accumulation is in accordance with the dyslipidemic status shown above.

Both $Lxr\alpha^{-/-}$ *and* $Lxr\beta^{-/-}$ animals have abnormal neutral lipid accumulation in the epididymis, but their location and underlying mechanisms seem to be different in the two genotypes.

### *LXR Deletions Modify the Inflammatory Status of the Epididymis*

LXRs are known as anti-inflammatory regulators [23–25], including during the atherosclerotic process; the inflammatory status of single-knockout male caput epididymis was thus investigated. The mRNA levels of several classical inflammatory mediators were measured by quantitative RT-PCR (Fig. 4). A significant increase in IL-1β mRNA was specifically observed in the tissues of $Lxr\alpha^{-/-}$ animals, whereas IL-6 mRNA was significantly elevated only in the caput tissues of $Lxr\beta^{-/-}$ males. For tumor necrosis factor α (TNFα), mRNA levels were increased in both genotypes. Matrix metalloprotease 9 (MMP-9) had previously been shown to be accumulated in the caput epididymis of aged $Lxr\alpha;\beta^{-/-}$ males [17], and more specifically in spots where foam cells could be observed. This was not the case for either $Lxr\alpha^{-/-}$ or $Lxr\beta^{-/-}$ animals, as no staining appeared in the initial segment (IS) or other segments of the caput epididymis (data not shown).

The inflammatory status was differentially modified in the caput epididymis of *Lxrα* and *Lxrβ* knockout male mice. LXR isoforms thus appear to have redundant functions concerning the regulation of inflammation-related genes such as TNFα and MMP-9. LXR isoforms can also have specific anti-inflammatory functions in this tissue, as IL-1β was up-regulated only in $Lxr\alpha^{-/-}$ animals and IL-6 up-regulated only in $Lxr\beta^{-/-}$ animals.

### *LXR Deficiency Leads to a Discrete Hypofertility in Aging Males*

To evaluate the impact of the invalidation of one LXR isoform on fertility and sperm parameters, a follow-up study of males aged 10, 12, and 14 mo was performed with young virgin CD-1 females. After the last mating trial at 14 mo of age, males were killed and cauda epididymal spermatozoa were retrieved to assess sperm count, viability, and morphology. In 14-mo-old males, the invalidation of *Lxrα* appeared to reduce the number of fertilized females (Fig. 5A) whereas no real



Downloaded from www.biolreprod.org.

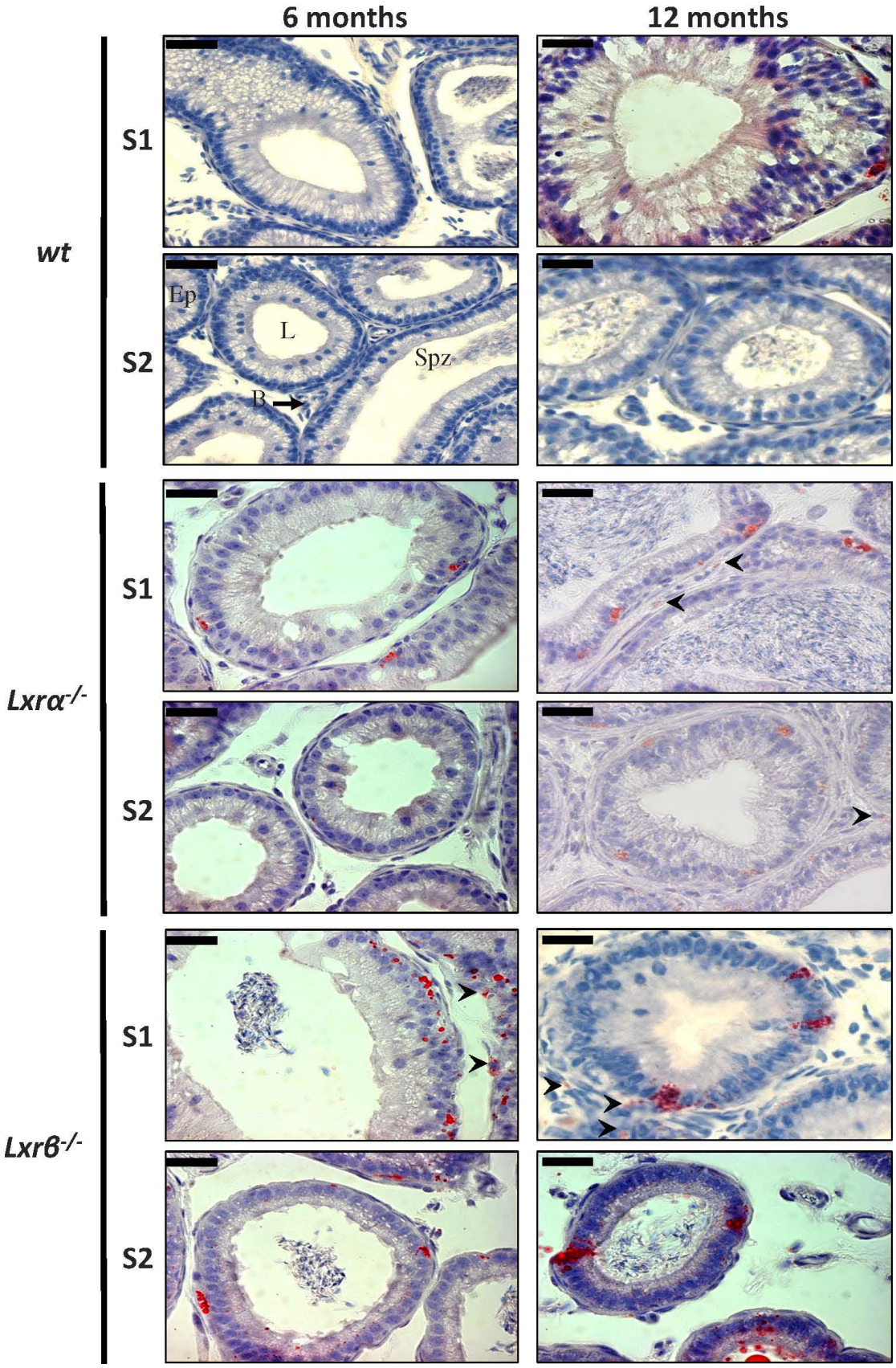



FIG. 3. Age-related influence of LXR isoforms on neutral lipid accumulation in the two proximal mouse epididymal segments. Oil Red O staining was applied to 7-μm-thick tissue cryosections issued from 6- (left) or 12-mo-old (right) male mice. The two upper lines illustrate the results obtained for *wt* animals, the two middle lines for *Lxrα*$^{-/-}$ animals, and the two bottom lines for *Lxrβ*$^{-/-}$ animals. Each picture is representative of at least four different animals. Bar = 10 μm. B, blood vessel; Ep, epithelium; L, lumen; Spz, spermatozoa in the lumen.

Downloaded from www.biolreprod.org.

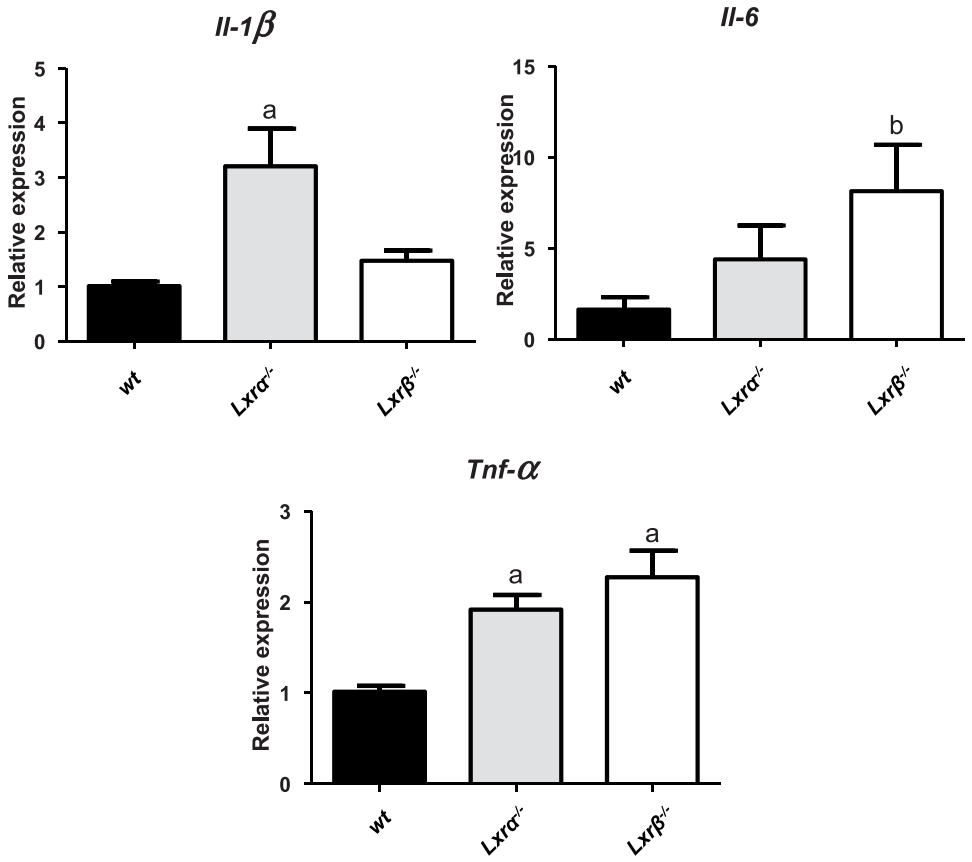



FIG. 4. Inflammatory status in the caput epididymides of 12-mo-old *wt*, *Lxrα*$^{-/-}$, and *Lxrβ*$^{-/-}$ mice. Relative gene expression levels (compared to *wt*) of major proinflammatory genes (interleukin-1β [*IL-1β*], interleukin-6 [*Il-6*] and tumor necrosis factor α [*Tnf-α*]) were measured by quantitative real-time PCR. Data are means ± SEM from at least six individuals per genotype. a, $P < 0.01$ versus *wt*; b, $P < 0.05$ versus *wt* (Mann-Whitney test).

impact was seen for *wt* or *Lxrβ*$^{-/-}$ males. Furthermore, a significant decrease was noticed concerning the number of pups per litter at 10 and 12 mo for *Lxrα*$^{-/-}$ males compared with *wt* (Fig. 5B). Surprisingly, no statistically significant difference was seen at 14 mo of age, probably because of the reduced number of litters (see table in Fig. 5A). Sperm analyses revealed that *Lxrα*$^{-/-}$ animals had a significantly higher number of gametes in their cauda epididymis compared to other genotypes, whereas *Lxrβ*$^{-/-}$ animals had a significant decrease compared to *wt* and *Lxrα*$^{-/-}$ animals (Fig. 5C). Sperm viability was altered in both *Lxrα*$^{-/-}$ and *Lxrβ*$^{-/-}$ animals, as shown by the significant decreases observed (Fig. 5D). To understand if the differences in sperm counts were due to testicular and/or epididymal defects, testis were weighed and a sperm count was performed after recovery from caput epididymides of several individuals. There was no significant difference either in testicular weight or in sperm counts in the caput epididymides (Fig. 5, E and F, respectively). The higher sperm count observed in cauda epididymides of *Lxrα*$^{-/-}$ animals suggested a possible alteration of defective sperm elimination during epididymal transit, as previously described in another model, indoleamine 2,3-dioxygenase (*Ido1*$^{-/-}$) mice [26]. The percentage of broken sperm cells was significantly higher when spermatozoa were retrieved from the cauda epididymides of both *Lxrα*$^{-/-}$ and *Lxrβ*$^{-/-}$ males as compared to *wt* animals. However, there was a strong interindividual variation, which was also evident when caput epididymal sperm cells were observed (Fig. 5G). The individual progressions of the percentage of broken sperm cells during the epididymal transit were graphically represented (Supplemental Fig. S1B; Supplemental Data are available online at www.biolreprod.org); it was clear that, for the majority of the individuals, this percentage decreased for *wt* and *Lxrα*$^{-/-}$ males (as expected under normal conditions) whereas the opposite situation occurred for *Lxrβ*$^{-/-}$ animals.

The knockout of LXRα resulted in a slight subfertility, characterized by a decrease in the percentage of females conceiving and in the number of pups per litter. It was associated with a significantly higher number of sperm cells stored in the cauda epididymis. The knockout of LXRβ also led

FIG. 5. Age-related influence of LXR isoforms on male fertility in vivo and on sperm parameters of 14-mo-old mice. A follow-up study of fertility for males aged 10, 12, and 14 mo was performed and the results expressed as the number of females conceiving (**A**) or the number of pups per litter (**B**). Data are means ± SEM. a, $P < 0.01$ versus *wt*; $^{**}P < 0.01$ versus *Lxrβ*$^{-/-}$. Sperm parameters of the same males were evaluated at 14 mo. Data are means ± SEM from at least 10 individuals (14-mo-old) per genotype for cauda spermatozoa and testis weight, and at least four individuals for caput spermatozoa. a, $P < 0.01$ versus *wt*; b, $P < 0.05$ versus *wt*; $^{**}P < 0.01$ versus *Lxrα*$^{-/-}$ (**C**–**F**). Spermatozoa collected from 14-mo-old mice caput or cauda epididymis were stained according to Shorr [19], and the percentages of broken sperm cells were determined by counting at least 200 cells per slide. Each dot represents an individual value and the mean is represented by the horizontal bars. $^{*}P < 0.05$ between the compared groups as given by the Mann-Whitney test (**G**).

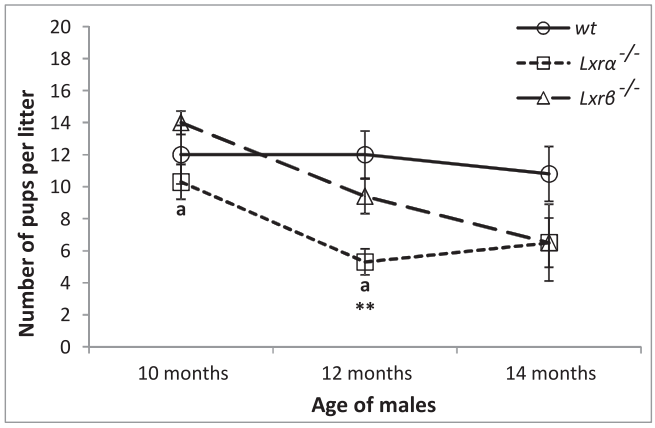


Downloaded from www.biolreprod.org.

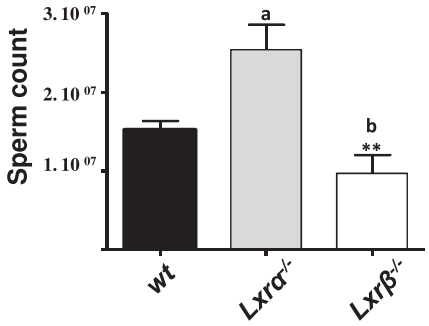
**A**

| | # females having a litter | | |
|---|---|---|---|
| Ages of males | *wt* | *Lxrα*$^{-/-}$ | *Lxrβ*$^{-/-}$ |
| 10 months | 7/12 (58.3%) | 11/16 (68.7%) | 6/16 (37.5%) |
| 12 months | 6/12 (50.0%) | 9/16 (56.2%) | 9/16 (56.2%) |
| 14 months | 5/12 (41.7%) | 4/14 (28.6%) | 6/16 (37.5%) |

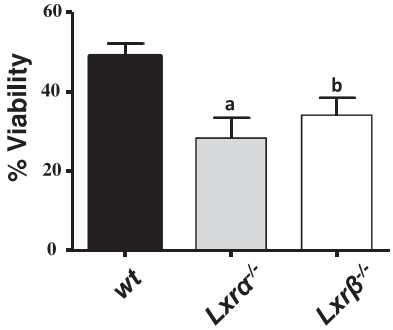
**B**



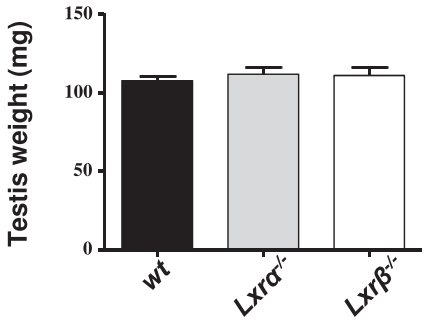

**C**



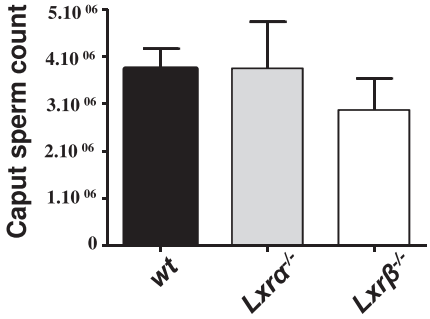

**D**



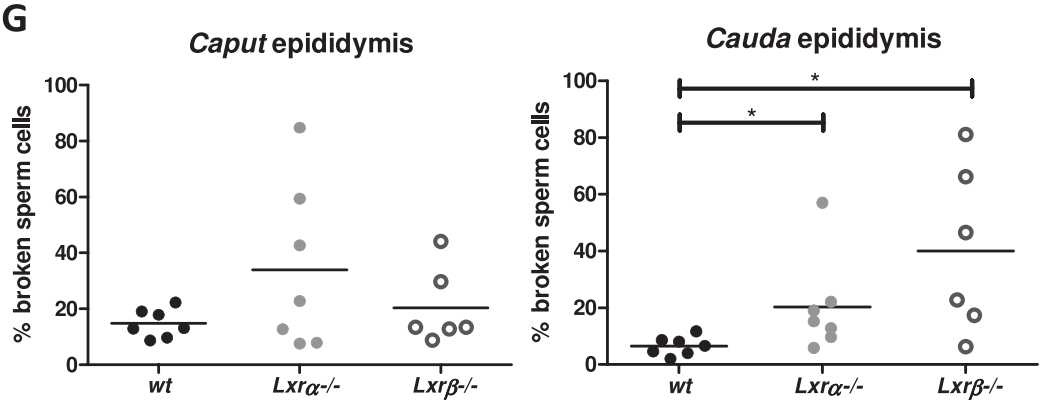

**E**




**F**




**G**




Downloaded from www.biolreprod.org.

to a decrease in the number of pups per litter associated with an increase in the percentage of broken sperm cells between caput and cauda epididymis. In both genotypes, older males (12–14 mo) showed reduced male fertility.

### *LXRα Maintains Epithelium Stability in the Initial Segment of Aging Males*

Histological analysis from the two most proximal epididymal segments (IS and segment 2 [S2]) was performed using the Masson trichrome protocol in tissues from 8-, 12- and 14-mo-old animals from each genotype (Fig. 6). In the *wt* group, the histological aspect of the IS was modified in animals aged 12 mo and older, with the appearance of what resembled new tubules forming in the already existing epithelium (indicated by the * in the upper panel of Fig. 6). S2 did not show any abnormal histology at the observed ages. The tubule reorganization seen in *wt* animals was also present in the first segment of *Lxrβ*$^{-/-}$ animals, but appearing earlier, as it was already detected in 8-mo-old animals. This phenomenon was also clearly visible for older animals of this genotype. Segment 2 did not show any abnormality, as for *wt* animals. The most drastic changes were observed in the epithelium of *Lxrα*$^{-/-}$ animals at 12 mo and older, as a very elevated proportion of new tubules was systematically observed in the IS of these animals. This phenotype could sometimes evolve, at 14 mo of age, into a phenotype close to what was previously described for the double-knockout animals [13]: distended tubules with a thinner epithelium, presence of an amorphous substance and occasionally round cells (arrow) in the lumen, and an abnormally distended interstitial tissue with the presence of numerous infiltrating cells. In these cases the phenotype was generally extended to the S2 as well.

The presence of a large number of neotubules in the IS of *Lxrα*$^{-/-}$ animals at 12 mo of age raised the question of proliferation of the epithelium. Immunohistochemical staining of a proliferation marker, Ki67, was performed (Supplemental Fig. S2A) and stained nuclei were counted in the IS and reported to the tubule surface (proliferation index, Supplemental Fig. S2B). The density of stained nuclei did not appear higher in the neotubules of *Lxrα*$^{-/-}$ animals (Supplemental Fig. S2A). The proliferation index of the whole IS was similar between *wt* and *Lxrα*$^{-/-}$ animals, as shown in Supplemental Figure S2B. This index was slightly but significantly higher in the IS of *Lxrβ*$^{-/-}$ animals compared to *Lxrα*$^{-/-}$ animals, but here again the stained nuclei were not at a higher density in the neotubules.

LXRα has a role in the maintenance of the epithelial structure of the IS, whereas LXRβ appears to be involved in the regulation of the epithelial proliferation in the IS.

## DISCUSSION

It has been known for a long time that the lipid composition of spermatozoa is crucial for their fertilizing potential. This composition is finalized in the male genital tract under the influence of epididymal secretion and reabsorption processes, but the underlying regulatory mechanisms remain largely unknown. The importance of LXRs has been unraveled by several groups and *Lxrα;β*$^{-/-}$ male mice have been described with severe fertility troubles when aging, leading to complete infertility at 9 mo of age. Our group showed that in younger fertile *Lxrα;β*$^{-/-}$ males, the epididymis was highly susceptible to a high-cholesterol diet-induced dyslipidemia, triggering posttesticular-dependent infertility without drastic changes in sperm production by the testes [17]. These data raised the question of the relative functional importance of each LXR isoform in the epididymis, because it was previously demonstrated that they play different roles in the testis [11, 22].

Plasma lipid profiles of single-LXR-knockout animals revealed that the absence of either isoform provoked a dyslipidemia characterized by a significant increase in circulating LDL (Fig. 1), similar to the condition present in double-knockout animals. This is in accordance with previously reported data [27]. We also noticed a significant increase in plasma total cholesterol level due to high HDL levels in *Lxrβ*$^{-/-}$ mice (Fig. 1). This may be related to the fact that LXRα has an important role in the regulation of reverse cholesterol transport essentially via its action on ABCA1-driven cholesterol efflux to Apo-A1 lipid-poor pre-β-HDL by macrophages [10, 28]. The plasma HDL level is thus high in the only dyslipidemic knockout mouse strain valid for LXRα (besides the *wt*, which shows no dyslipidemia), i.e., the *Lxrβ*$^{-/-}$ mice. In the caput epididymis, LXRs had different impacts on gene regulation: LXRβ was involved in cholesterol homeostasis as shown by the expression levels of several genes presented in Figure 2. Cellular cholesterol efflux was altered as attested by the significant decreases in *Abca1* and *Abcg1* mRNAs, whereas there were no changes in synthesis and esterification (*Srebf2*, *Acat2*, and *Hmgcr* are not drastically modified). Cellular cholesterol uptake is controlled by the regulation of LDLR by an E3-ubiquitin ligase named IDOL. IDOL induces the posttranslational degradation of the LDLR by the proteasome; thus, the down-regulation of *Idol* mRNA specifically in *Lxrβ*$^{-/-}$ males shows that this process is under the regulation of LXRβ in the mouse caput epididymis. The transcriptional regulation of *Ldlr* is mainly controlled by SREBP2 [29], which is not deregulated here, a fact that may explain why the mRNA for LDLR is not decreased. Expression levels of genes involved in fatty acid (*Fasn*) and triglyceride (*Srebf1*) synthesis are also impaired in the epididymides of *Lxrβ*$^{-/-}$ males. This is in accordance with previously published data for *Srebf1* [15]. Modification of cholesterol and lipid metabolisms led to neutral lipid accumulation, as shown in Figure 3. The localization of neutral lipid accumulation varied according to the invalidated LXR isoform, a fact that supports the differential genes regulated by LXRs mentioned above. Further investigations will be necessary to understand the relationships between these two aspects.

Within the IS of the epididymis, in all three genotypes, it was interesting to note the formation of neotubules in aging animals. Although the three genotypes were concerned, it was particularly developed in *Lxrα*$^{-/-}$ males. We therefore tested the proliferation status of the epithelium in the IS and found that the proliferation index was slightly but significantly higher in *Lxrβ*$^{-/-}$ animals. The large number of neotubules observed in the IS of *Lxrα*$^{-/-}$ males is thus not related to a difference in the epithelial proliferation status. Expression levels of mRNAs of cell cycle- or proliferation-related genes were measured in the caput epididymis (Supplemental Fig. S3A). The expression levels of both cyclin D2 (*Ccnd2*) and *B-myc* (an important regulator of cell proliferation highly expressed in the epididymis [30]) were not significantly changed in single-knockout animals. Other proapoptotic or antiapoptotic genes were evaluated (Supplemental Fig. S3A) and only slight down-regulation of the antiapoptotic gene *Bcl2* was observed in the caput epididymis of *Lxrβ*$^{-/-}$ animals. The fact that the proliferation index was higher in *Lxrβ*$^{-/-}$ animals suggests that LXR isoforms play different roles in the maintenance of the epithelial structure. This is in agreement with what was shown in the testis, where LXRα regulates apoptosis whereas LXRβ regulates cell proliferation [11]. Apoptosis did not seem

Downloaded from www.biolreprod.org.

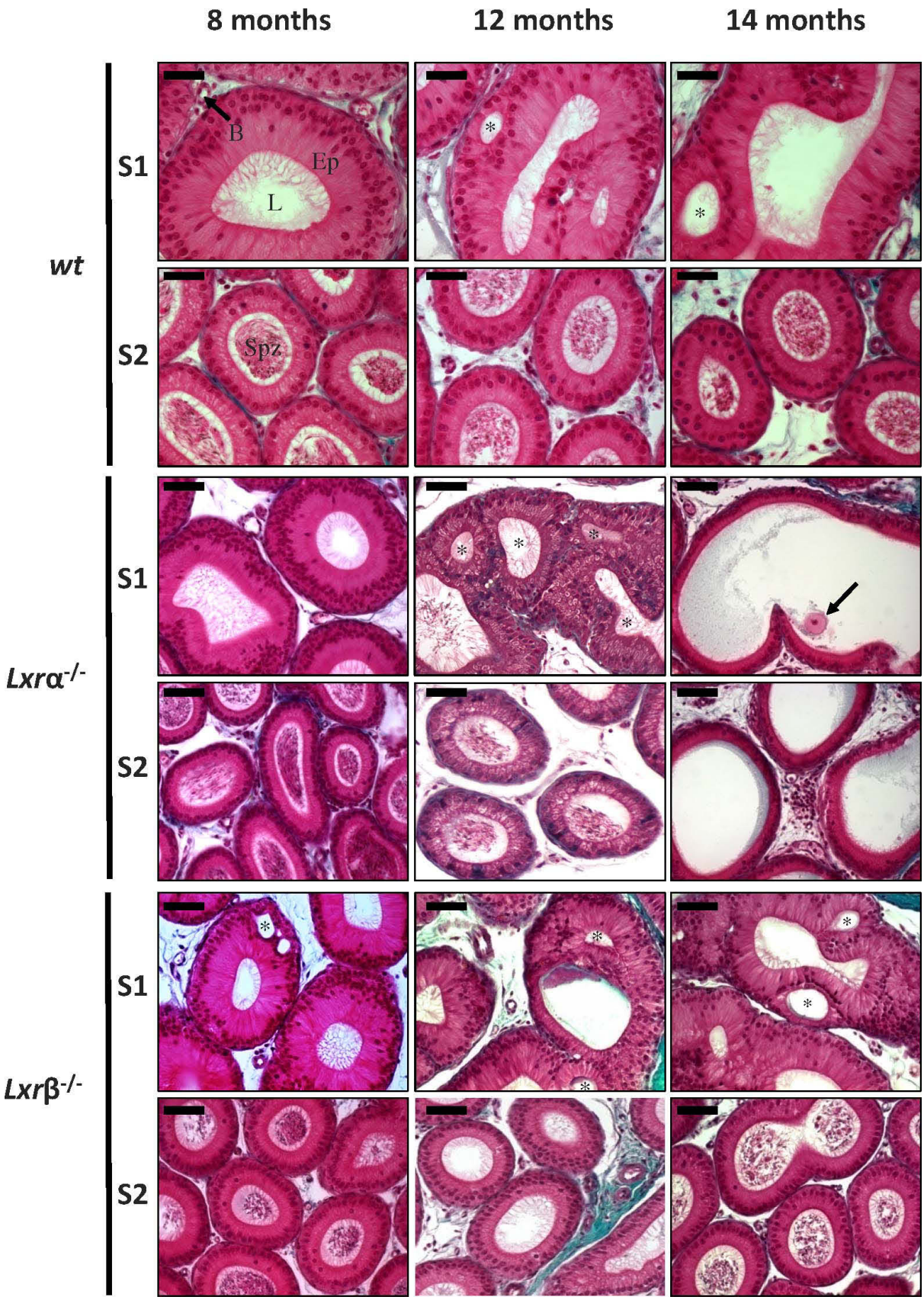



FIG. 6. Age-related influence of LXR isoforms on mouse epididymal tissue structure in the two proximal segments. Masson trichrome staining was performed on 5-μm-thick paraffin tissue sections issued from 8- (left), 12- (middle) or 14-mo-old (right) male mice. The two upper lines illustrate the results obtained for *wt* animals, the two middle lines for $Lxr\alpha^{-/-}$ animals, and the two bottom lines for $Lxr\beta^{-/-}$ animals. Each picture is representative of at least four different animals. *, intraepithelial rearrangements; arrow, intraluminal cell infiltration. Bar = 10 μm. B, blood vessel; Ep, epithelium; L, lumen; Spz, spermatozoa in the lumen.



Downloaded from www.biolreprod.org.

to be modified in the caput epididymides of single-knockout males, as shown by the negative results for TUNEL staining (Supplemental Fig. S3B). Recently, an alteration of the epithelial shape was demonstrated in the caput epididymis of mice bearing a conditional deletion of *Pten* (phosphatase and tensin homolog) in the epithelial cells of the proximal epididymis from Postnatal Day 17 onward [31]. It was characterized by the appearance of epithelial folding, a situation close to what was observed here, and a stimulation of the (RAF1)/ERK signaling pathway was evidenced by an increase in the phosphorylation of AKT (protein kinase B). This hypothesis was tested in our models (Supplemental Fig. S4) and no dysregulation of the phospho-AKT/AKT balance was seen.

Another element that could perturb the epithelial maintenance of the IS in mice lacking LXRα is the proinflammatory environment. Caput epididymides of $Lxr\alpha^{-/-}$ males showed increased mRNA accumulations of IL-1β and TNFα, whereas in $Lxr\beta^{-/-}$ mice the mRNAs for IL-6 and TNFα were significantly increased. An increase in proinflammatory cytokines (including IL-1β, IL-6, and TNF) is correlated with the appearance of epithelial cell proliferation disorders, epithelial-mesenchymal transition, or even malignant transformations in many organs, such as breast [32], prostate [33], or testis, for example [34], and could thus be related to the phenotype observed. Again, the fact that partly different couples of proinflammatory cytokines were promoted in $Lxr\alpha^{-/-}$ (IL-1β and TNFα) and $Lxr\beta^{-/-}$ (IL-6 and TNFα) suggests redundant functions but also distinct ones. No MMP-9 accumulation was seen in $Lxr\alpha^{-/-}$ or $Lxr\beta^{-/-}$ males, whereas we reported earlier a clear involvement of MMP-9 in older $Lxr\alpha;\beta^{-/-}$ animals [17]. It has been shown that LXR activation can antagonize the expression of inflammatory genes downstream of IL-1β and TNFα-mediated signaling [35]. In addition, LXR activation was shown to repress NF-κB target genes such as MMP9 in macrophages [36].

The phenotypes described herein impact male fertility, a point that was investigated. This study revealed, in our conditions, a decrease in the number of pups per litter in each strain (Fig. 5B), which differed from what has been reported earlier [11, 22]. This could be related to the fact that we used virgin CD-1 females rather than females from the *wt* strain [11] or from the corresponding male genotype [22]. The choice of the CD-1 females was made to avoid any potential interference of the female strain on the reproductive efficiency, as fertility troubles had previously been reported for $Lxr\alpha;\beta^{-/-}$ females [37]. The most severe testicular phenotype was reported in 20-mo-old $Lxr\beta^{-/-}$ males, whereas no phenotype was visible at the same age for $Lxr\alpha^{-/-}$ males [22]. This was corroborated by the fact that $Lxr\beta^{-/-}$ males showed increased lipid accumulation in their Sertoli cells, associated with a lower proliferation rate of the germ cells [11]. Our results are in agreement with these data, as the sperm count was significantly lower for 14-mo-old $Lxr\beta^{-/-}$ males compared to others (Fig. 5C). In contrast to $Lxr\beta^{-/-}$ males, the sperm count was significantly higher for $Lxr\alpha^{-/-}$ mice compared to other genotypes. The fact that sperm numbers in the caput epididymides and testis weights were not statistically different in the three genotypes (Fig. 5F) strongly suggests that the differences in sperm numbers in the cauda epididymides are due to epididymal dysfunctions in single-knockout males. During the epididymal maturation, abnormal spermatozoa are eliminated (Supplemental Fig. S1), although the underlying molecular and cellular mechanisms remain unknown and controversial [38, 39]. The higher sperm count observed in cauda epididymides of $Lxr\alpha^{-/-}$ males could thus be related to a defect in this process. The proportion of broken spermatozoa shows a tendency to decrease after epididymal transit in these males (Fig. 5G), suggesting that the ''quality control'' function remains at least partly efficient. The reason for the higher sperm count will thus need further investigation. For the $Lxr\beta^{-/-}$ males the percentage of broken sperm cells shows a tendency to increase during epididymal transit (Fig. 5G), suggesting that defects occur during epididymal maturation. It is interesting to note that genes regulating cholesterol homeostasis are specifically down-regulated in these $Lxr\beta^{-/-}$ males (Fig. 2). A likely hypothesis to correlate the broken spermatozoa to LXR-dependent maturational defects could be that the sperm plasma membrane is altered in these gametes because of abnormal lipid maturation promoting breakage of sperm. It is interesting to note that a similar sperm phenotype (head-midpiece breakage associated with abnormal lipid composition) was recently reported for the caput epididymis conditional knockout of Dicer1 (the enzyme leading to the production of mature miRNAs [40]). It will thus be interesting to determine the lipid composition changes occurring in spermatozoa from single-knockout animals.

In conclusion, this study emphasized the fundamental roles of LXR in the male reproductive function, here at the level of the epididymis. LXR isoforms partly play different physiological roles in the mouse proximal epididymis. LXRα somehow controls the maintenance of epithelial integrity in the IS and the number of spermatozoa stored in the distal epididymis, whereas LXRβ regulates cell proliferation in the IS and epithelial cholesterol homeostasis that may impact spermatozoa lipid maturation. However, besides these distinct roles, they also show functional redundancy because each single knockout similarly develops an epididymal inflammatory condition, a fragility of the structural aspects of the sperm head, and thus a decreased fertility, especially in aging males.

## ACKNOWLEDGMENT

J.R.D. is indebted to the French Andrology Society for its continuous support. We thank Sandrine Plantade, Khirredine Ouchen, and Philippe Mazuel for animal facilities. We acknowledge Dr. Felicity Vear (INRA Crouel, Clermont-Ferrand) for English grammar and syntax copy editing.

## REFERENCES

1. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU guidelines on male infertility. Eur Urol 2005; 48:703–711.
2. Saez F, Ouvrier A, Drevet JR. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. Asian J Androl 2011; 13:11–17.
3. Sullivan R, Saez F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. Reproduction 2013; 146:R21–R35.
4. Cooper TG. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. Asian J Androl 2007; 9:533–539.
5. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. Hum Reprod Update 2009; 15:213–227.
6. Dacheux JL, Dacheux F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. Reproduction 2014; 147:R27–R42.
7. Keber R, Rozman D, Horvat S. Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. J Lipid Res 2013; 54:20–33.
8. Pyttel S, Nimptsch A, Bottger J, Zschornig K, Jakop U, Wegener J, Muller K, Paasch U, Schiller J. Changes of murine sperm phospholipid composition during epididymal maturation determined by MALDI-TOF mass spectrometry. Theriogenology 2014; 82:396–402.
9. El-Hajjaji FZ, Oumeddour A, Pommier AJ, Ouvrier A, Viennois E, Dufour J, Caira F, Drevet JR, Volle DH, Baron S, Saez F, Lobaccaro JM. Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. Biochim Biophys Acta 2011; 1812:974–981.
10. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. Cell 1998; 93: 693–704.
11. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Dechelotte P, Sion B, Veyssiere G, Benahmed M, Lobaccaro JM. Multiple roles of the nuclear



Downloaded from www.biolreprod.org.

receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. Mol Endocrinol 2007; 21:1014–1027.
12. Jamroz-Wisniewska A, Wojcicka G, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. Postepy Hig Med Dosw (Online) 2007; 61: 760–785.
13. Frenoux JM, Vernet P, Volle DH, Britan A, Saez F, Kocer A, Henry-Berger J, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JM, Drevet JR. Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. J Mol Endocrinol 2004; 33:361–375.
14. Ouvrier A, Cadet R, Vernet P, Laillet B, Chardigny JM, Lobaccaro JM, Drevet JR, Saez F. LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. J Lipid Res 2009; 50:1766–1775.
15. Saez F, Chabory E, Cadet R, Vernet P, Baron S, Lobaccaro JM, Drevet JR. Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. Asian J Androl 2007; 9:574–582.
16. Abe K, Takano H, Ito T. Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. Arch Histol Jpn 1983; 46:51–68.
17. Ouvrier A, Alves G, Damon-Soubeyrand C, Marceau G, Cadet R, Janny L, Brugnon F, Kocer A, Pommier A, Lobaccaro JM, Drevet JR, Saez F. Dietary cholesterol-induced post-testicular infertility. PLoS One 2011; 6: e26966.
18. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev 2000; 14:2819–2830.
19. Shorr E. A new technic for staining vaginal smears: III, a single differential stain. Science 1941; 94:545–546.
20. Towers B. A modification of Masson's trichrome stain which differentiates in colour between striated and smooth muscle. J Physiol 1953; 119:23p–24p.
21. Kalaany NY, Gauthier KC, Zavacki AM, Mammen PP, Kitazume T, Peterson JA, Horton JD, Garry DJ, Bianco AC, Mangelsdorf DJ. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. Cell Metab 2005; 1:231–244.
22. Robertson KM, Schuster GU, Steffensen KR, Hovatta O, Meaney S, Hultenby K, Johansson LC, Svechnikov K, Soder O, Gustafsson JA. The liver X receptor-{beta} is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. Endocrinology 2005; 146:2519–2530.
23. Garcia RA, Search DJ, Lupisella JA, Ostrowski J, Guan B, Chen J, Yang WP, Truong A, He A, Zhang R, Yan M, Hellings SE, et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene knockout attenuates atherosclerosis and in vivo foam cell formation in hyperlipidemic apoE(−)/(−) mice. PLoS One 2013; 8:e53192.
24. Hong C, Tontonoz P. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. Curr Opin Genet Dev 2008; 18: 461–467.
25. Hong C, Walczak R, Dhamko H, Bradley MN, Marathe C, Boyadjian R, Salazar JV, Tontonoz P. Constitutive activation of LXR in macrophages regulates metabolic and inflammatory gene expression: identification of ARL7 as a direct target. J Lipid Res 2011; 52:531–539.
26. Jrad-Lamine A, Henry-Berger J, Gourbeyre P, Damon-Soubeyrand C, Lenoir A, Combaret L, Saez F, Kocer A, Tone S, Fuchs D, Zhu WT, Oefner PJ, et al. Deficient tryptophan catabolism along the kynurenine pathway reveals that the epididymis is in a unique tolerogenic state. J Biol Chem 2011; 286:8030–8042.
27. Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Schuster GU, Gustafsson JA, Basso MD, Nambi P. Liver X receptor (LXR)-beta regulation in LXRalpha-deficient mice: implications for therapeutic targeting. Mol Pharmacol 2006; 70:1340–1349.
28. Zhang Y, Breevoort SR, Angdisen J, Fu M, Schmidt DR, Holmstrom SR, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ, Schulman IG. Liver LXRalpha expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. J Clin Invest 2012; 122:1688–1699.
29. Shimomura I, Bashmakov Y, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94:12354–12359.
30. Cornwall GA, Collis R, Xiao Q, Hsia N, Hann SR. B-Myc, a proximal caput epididymal protein, is dependent on androgens and testicular factors for expression. Biol Reprod 2001; 64:1600–1607.
31. Xu B, Washington AM, Hinton BT. PTEN signaling through RAF1 proto-oncogene serine/threonine kinase (RAF1)/ERK in the epididymis is essential for male fertility. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111: 18643–18648.
32. Fouad TM, Kogawa T, Reuben JM, Ueno NT. The role of inflammation in inflammatory breast cancer. Adv Exp Med Biol 2014; 816:53–73.
33. Rodriguez-Berriguete G, Sanchez-Espiridion B, Cansino JR, Olmedilla G, Martinez-Onsurbe P, Sanchez-Chapado M, Paniagua R, Fraile B, Royuela M. Clinical significance of both tumor and stromal expression of components of the IL-1 and TNF-alpha signaling pathways in prostate cancer. Cytokine 2013; 64:555–563.
34. Bialas M, Fiszer D, Rozwadowska N, Kosicki W, Jedrzejczak P, Kurpisz M. The role of IL-6, IL-10, TNF-alpha and its receptors TNFR1 and TNFR2 in the local regulatory system of normal and impaired human spermatogenesis. Am J Reprod Immunol 2009; 62:51–59.
35. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. Nat Med 2003; 9:213–219.
36. Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. J Biol Chem 2003; 278:10443–10449.
37. Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, Sion B, Dechelotte P, Gauthier K, Vanacker JM, Lobaccaro JM. Oxysterol nuclear receptor LXRbeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. J Biol Chem 2007; 282:4693–4701.
38. Jones R. Sperm survival versus degradation in the Mammalian epididymis: a hypothesis. Biol Reprod 2004; 71:1405–1411.
39. Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. J Cell Sci 2001; 114:1665–1675.
40. Bjorkgren I, Gylling H, Turunen H, Huhtaniemi I, Strauss L, Poutanen M, Sipila P. Imbalanced lipid homeostasis in the conditional Dicer1 knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. FASEB J 2015; 29:433–442.

Downloaded from www.biolreprod.org.

## Présentation de la deuxième publication

**MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION (en révision)**

**Dyslipidemia alters sperm maturation and capacitation in LXR-null mice**

Cette seconde publication a permis de préciser l'impact de la dyslipidémie observée chez les souris *Lxra;β*$^{-/-}$ nourries avec un régime enrichi en cholestérol sur la fonction des gamètes. Comme cela a été précisé en introduction, la dyslipidémie provoquée par ce régime chez les *Lxra;β*$^{-/-}$ jeunes déclenche préférentiellement le phénotype épididymaire et provoque une stérilité prématurée (Ouvrier et al., 2011). Les dérégulations de l'homéostasie lipidique dans l'épididyme de ces souris pourraient perturber la maturation post-testiculaire et modifier la composition lipidique des gamètes avec des conséquences possible sur la capacitation. Les spermatozoïdes des souris *Lxra;β*$^{-/-}$ HCD présentent en effet des défauts de capacitation *in vitro*, mis en évidence par une diminution des niveaux de phosphotyrosine. Cette altération de la capacitation est corrélée à une modification de la composition lipidique des gamètes conduisant à une diminution de la fluidité membranaire. En conséquence, les flux calciques régulant la capacitation sont perturbés, en association avec des défauts d'acquisition, au cours du transit épididymaire, de certaines protéines impliquées dans cette régulation (PMCA4 ou VDAC2). La maturation lipidique et protéique des gamètes au cours du transit épididymaire est donc directement en lien avec une homéostasie normale du cholestérol. La dyslipidémie, dans notre modèle, entraîne ainsi des défauts de maturation et de qualité des gamètes ayant des conséquences négatives sur le processus de capacitation.

# Dyslipidemia alters sperm maturation and capacitation in LXR-null mice

**Whitfield M[1], Guiton R[1], Rispal J[1], Acar N[2], Kocer A[1], Drevet JR[1$], and Saez F[1§]**

[1] Team MEPTI (Mécanismes post-testiculaires de l'infertilité), Université Clermont Auvergne, UMR GReD (Génétique Reproduction & Développement) CNRS 6293, INSERM U1103, Aubière, France.

[2] Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France.

[$] Corresponding author (joel.drevet@univ-bpclermont.fr)

[§] Co-corresponding author (fabrice.saez@univ-bpclermont.fr)

**STUDY QUESTION:** Does diet-induced dyslipidemia alter sperm epididymal maturation and impacts capacitation in male knockout mice for Liver-X-Receptors?

**SUMMARY ANSWER:** Diet-induced dyslipidemia in LXR-null male mice impairs lipid and protein sperm contents, membrane dynamics, and limits the capacitation via dysregulation of the calcium fluxes regulating this process.

**WHAT IS KNOWN ALREADY:** Little is known about the impact of lipid metabolic disorders on male gametes when considering post-testicular maturation events, studies being most of the times concentrated on the endocrine side and testicular consequences. However, when considering that 30% of male infertilities are idiopathic, and that 50% of middle-aged men present an undiagnosed dyslipidemia, a link is possible between these two parameters.

**STUDY DESIGN SIZE, DURATION:** 3-month-old males (*wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$) were fed 4 weeks with a control diet or a lipid-enriched diet containing 1.25% cholesterol (High Cholesterol Diet - HCD). Spermatozoa, epididymosomes and/or epididymal tissues were collected from these mice and analyzed either individually or pooled for some experiments. Capacitation was evaluated during kinetic studies at 0, 45 and 90 min of incubation in a capacitating medium.

**PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS:** Lipids were analyzed by LC-MS, capacitation was measured by phosphotyrosine western blots, membrane fluidity and intracellular calcium concentrations were determined by flow cytometry and epididymosomes were obtained by ultracentrifugation of the epididymal fluid. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test. Statistically significant differences between groups were considered when the p-value was $< 0.05$. The Spearman correlation test was used to examine an association between two subpopulations and significance was determined at a confidence level of 95%. The software "GraphPad PRISM® 5" was used to perform the statistical analysis and to generate the associated graphs.

**MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE:** Spermatozoa from *Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed the HCD showed higher chol/PL and PC/PE ratios compared to *wt*-HCD ($p < 0.05$) and lower oxysterol contents compared to wt ($p<0.05$) or *Lxrα;β*$^{-/-}$ ($p<0.05$). These modifications impaired the membrane-associated events triggering the tyrosine phosphorylation normally occurring during the capacitation process, as shown by phosphotyrosine western blots. A smaller subpopulation of spermatozoa from *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD males had the capacity to raise their membrane fluidity during capacitation ($p<0.05$ vs. *wt* or *wt-HCD*) as well as their intracellular calcium concentration ($p<0.05$ vs. *Lxrα;β*$^{-/-}$ and $p<0.001$ vs. *wt*). These dysregulations in spermatozoa of *Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed the HCD were associated to a decrease in the accumulation of their major calcium efflux pump PMCA4 ($p<0.05$ vs. *Lxrα;β*$^{-/-}$ and $p<0.001$ vs. *wt*) and to a tendency to a decrease of this protein accumulation in *cauda*-purified epididymosomes.

**LARGE SCALE DATA:** None

**LIMITATIONS REASONS FOR CAUTION:** Parts of this work revealed only tendencies because of the paucity of the biological material possibly recovered in individuals. For example, our model imposed to purify epididymosomes from tissues pooled from several animals. This may have leveled the potential differences. As with any study using *in vitro* experiments with an experimental animal model, caution is required when extrapolating the present findings to humans.

**WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS:** This study is the first showing a direct impact of dyslipidemia on post-testicular sperm maturation with consequences on the signaling cascade regulating sperm capacitation. It may lead to the identification of prognostic markers of fertility in this pathophysiological situation, which could help clinicians to better understand male infertilities so far classified as idiopathic.

**STUDY FUNDING AND COMPETING INTEREST(S):** Work supported by the French Ministry of Higher Education and Research (MESR), INSERM, CNRS, the French National Institute for Agricultural Research (INRA), Regional Council of Burgundy, and FEDER (European Funding for Regional Economic Development). The authors declare that there is no conflict of interest that could prejudice the impartiality of the present research.

**Keywords:** Epididymis, Cholesterol/Dietary, Dyslipidemia, Oxysterols, Calcium, Membranes, Phosphotyrosine, Fertility, Hypercholesterolemia.

## INTRODUCTION

Lipid metabolism disorders (dyslipidemia) have dramatically increased around the world in the last decades, with major effects on health and life expectancy. Among dyslipidemia, hypercholesterolemia is highly represented with for example over 30 million Americans older than 20 years (13.1% of this population) presenting a high blood cholesterol level [>240 mg/dL,(Mozaffarian *et al.*, 2015)]. Other studies have shown a high prevalence of dyslipidemia in the adult population: again as an example 45.3% of French men aged 30-54 years are dyslipidemic, without being treated while only 9.4% of men in these ages are diagnosed and treated (Ferrieres, 2008); similarly in Canada, 43% of men aged over 20 are also presenting a dyslipidemia (Joffres *et al.*, 2013). Even though the negative impact of these diseases on reproductive function is known, very few mechanistic studies on spermatozoa have been published (Whitfield *et al.*, 2015).

Liver X Receptors α (LXRα – *Nr1h3*) and β (LXRβ – *Nr1h2*) are nuclear receptors activated by oxysterols and act as major regulators of cholesterol homeostasis in various cell types (Peet *et al.*, 1998; Wójcicka *et al.*, 2007). The importance of LXRs in the male reproductive physiology was underlined by the *Lxrα;β*$^{-/-}$ mouse model in which male mice showed infertility starting at 5 months evolving in sterility at 10 months (Robertson *et al.*, 2005; Volle *et al.*, 2007). This phenotype was composite, with alterations of both testis (Robertson *et al.*, 2005; Volle *et al.*, 2007) and epididymis (Frenoux *et al.*, 2004; Saez *et al.*, 2007; Ouvrier *et al.*, 2009; Whitfield *et al.*, 2016). We previously showed that the epididymal phenotype could be triggered in young *Lxrα;β*$^{-/-}$ animals by a HCD regimen even though the testis showed no structural and functional alterations (Ouvrier *et al.*, 2011). The epithelium of the proximal epididymal segments was disrupted and high amounts of cholesteryl ester accumulation were characterized. The testes did not present significant disruptions, but spermatozoa were altered, with decreased motility and viability, as well as an increased percentage of decapitated spermatozoa (Ouvrier *et al.*, 2011). This study revealed the peculiar susceptibility of the epididymis to cholesterol overload and provided a new model of infertility issued from diet-induced hypercholesterolemia.

In this model, the HCD-induced epididymal alterations appeared to affect male gamete functions, in complete agreement with the roles of that epididymal maturation in the acquisition of sperm fertilizing ability (Cornwall, 2009; Saez *et al.*, 2011). It is well known that epididymal maturation extensively modifies the sperm protein, sugar and lipid contents (Dacheux *et al.*, 2003; Aitken *et al.*, 2007). Regarding membranous lipids, sterols and phospholipids are qualitatively and quantitatively changed in order to prepare spermatozoa to the subsequent events of sperm post-testicular maturation (*i.e.* capacitation and acrosomal reaction). In mice, a decrease in the sperm cholesterol content was observed during epididymal transit (Rejraji *et al.*, 2006).

Capacitation has been defined in the early 1950's as a set of functional and biochemical events that occur after ejaculation in the female genital tract (Chang, 1951, 1955; Austin, 1952). Capacitation is triggered by plasma membrane cholesterol loss (Cross, 1998; Travis and Kopf, 2002) towards cholesterol acceptors in the female secretions (Visconti *et al.*, 1999a, 1999b). Recent studies have described the participation of oxysterols (cholesterol oxidation products) production during the course of capacitation as facilitating sterol efflux to further increase membrane fluidity (Brouwers *et al.*, 2011; Boerke *et al.*, 2013). Consequently, sperm plasma membrane fluidity is increased, allowing the activation of ion channels. Intracellular pH ($pH_i$) (Chávez *et al.*, 2012) and intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) are increased (Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2012), leading to the activation of an intracellular signaling cascade *via* a raise in cAMP intracellular concentration produced by the soluble adenylyl cyclase sAC (Wertheimer *et al.*, 2013). The Ser/Thr kinase PKA (protein kinase A) is consequently activated by cAMP resulting in phosphorylation of numerous targets. Tyrosine kinases are activated, which will in turn phosphorylate specific tyrosine residues on sperm proteins (Visconti *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 2006). Ultimately, gametes acquire an hyperactived motility (Nassar *et al.*, 1999) and the ability to bind and fertilize an oocyte (Naz, 1996).

Based on our mouse model of *Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed for 4 weeks with a high cholesterol diet, this work investigates the impact of the dyslipidemia-induced epididymal disruption on sperm post-testicular lipid composition and maturation, especially during the *in vitro* capacitation process.

| Gene | NCBI reference # | Forward primer (5'→3') | Reverse primer (5'→3') | Amplicon size (bp) |
|---|---|---|---|---|
| *36b4* | NM_007475.5 | gtc act tgt cca gct cag aa | tca atg gtg cct ctg gag at | 98 |
| *Pmca4* | NM_001167949.2 | ctg caa ggc aaa ctc aca cg | act cag gaa gcc att ctc gg | 139 |
| *Vdac2* | NM_011695.2 | aag acg aag tca tgc agc gg | cgg tgt tcc act tct ctg tga | 139 |

**Table 1: Sequences of the primers used in quantitative RT-PCR (Reverse Transcription - polymerase Chain Reaction) experiments.**

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Mice (*Lxrα;β*$^{-/-}$ and *wt*) are derived from a mixed strain background (C57BL/6:129Sv) and were housed in an animal facility with controlled environment (22°C, 12 hr light / 12 hr dark). Control mice were fed *ad libitum* with a Global-diet 2016 (Harlan, Gannat, France). Under High Cholesterol Diet (HCD), 3-month-old males were fed for 4 weeks with a lipid-enriched diet containing 1.25% cholesterol (Safe, Augy, France). Mouse housing and manipulations were approved by the Regional Ethic Committee in Animal Experimentation (authorization CE 100-12). Mice were killed by cervical dislocation.

### Sperm collection

For all experiments, sperm were collected by pressure on *cauda* epididymis in 1ml of non-capacitating WH medium (see composition below) and then counted using a Malassez haemocytometer.

### Cholesterol and phospholipids assays

Cholesterol and phospholipids assays were carried out at the MetaToul platform (Toulouse). Lipids of sperm (4 millions) from *wt*, *wt* HCD, *Lxrα;β*$^{-/-}$ and *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD were extracted by Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer, 1959) with internal standard. Regarding phospholipids, calibration range has been performed for each compound, then extracts and range were analyzed by liquid chromatography (LC-ESI-QqQ 6460 Agilent). Sterols were silylated and then analyzed by gas chromatography (GC-MS simple quadrupole).

### Oxysterols assay

Total lipids were extracted from a pool of 6 million of spermatozoa according to the method of Folch et al. (Folch *et al.*, 1957). Oxysterols were quantified by gas chromatography coupled to mass spectrometry according to previously published procedures (Grandgirard *et al.*, 2004; Fourgeux *et al.*, 2012). After a known quantity of betulin (Sigma-Aldrich, Lyon, France) was added as an internal standard, samples were submitted to alkaline hydrolysis in KOH before oxysterols were extracted with dichloromethane. Oxysterols were purified on silica columns with acetone and derivatized into trimethylsilyl ethers by the addition of pyridine and BSTFA. Trimethylsilyl ethers were analyzed on a Shimadzu QP2010 gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (Shimadzu, Marne-La-Vallée, France). Samples were injected in a splitless mode at an injection temperature of 290°C on a DB-5MS fused silica capillary column (30m × 0.25mm i.d., film thickness 0.25µm, Agilent Technologies, Massy, France). Hydrogen was used as the carrier gas (inlet pressure 60kPa). The flame ionization detector was maintained at 290°C. The initial oven temperature was held at 50°C for 1 min, and then increased at a rate of 20°C/min to 250°C and thereafter at 5°C/min to a final temperature of 300°C. Electron impact ionization was used at 70eV ionization energy. Oxysterols were analyzed in the single ion monitoring mode at m/z 456 for 7α-hydroxycholesterol and 7β-hydroxycholesterol, at m/z 474, m/z 366, and m/z 356 for α-epoxycholesterol and β-epoxycholesterol, at m/z 472 and m/z 382 for 7-ketocholesterol, and at m/z 483 and m/z 496 for betulin. Absolute amounts of each oxysterol were determined by interpolation from a standard curve of betulin generated for each experiment.

### Capacitation media

The basic medium used throughout these studies for sperm preparation and *in vitro* capacitation was a modified Krebs-Ringer medium (Whitten's-HEPES buffer (WH) containing 100 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM $KH_2PO_4$, 1.2 mM $MgSO_4$, 5.5 mM glucose, 1 mM pyruvic acid, 4.8 mM lactic acid, 20 mM HEPES, pH 7.4). Capacitation medium 1 contained 5 mg.ml$^{-1}$ fatty acid free BSA (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France), 2 mM $CaCl_2$ and 20 mM $NaHCO_3$ in WH. Capacitation medium 2 was made with WH supplemented with 1 mM 8-Bromo-cAMP (Sigma) and 500 µM IsoButylMethylXanthine (IBMX, Sigma). For BSA range experiments, capacitation medium 1 was used with increasing fatty acid free BSA concentrations (0-0.3-1-3-5-10-20-30 mg.ml$^{-1}$).

### Analysis of capacitation by western blot

Sperm were incubated in capacitation medium 1 or 2 at the final concentration of 15x10$^6$ cells.ml$^{-1}$ during 0, 45 or 90 minutes at 37°C, 5% $CO_2$. Each time, one million was collected, centrifuged at 500g for 5 minutes and washed with 300 µl of phosphate buffered saline (PBS) then resuspended in sample buffer (Laemmli, 1970) without mercaptoethanol and boiled for 5 minutes. After a centrifugation at 7000g for 5 minutes, the supernatant was collected, boiled in the presence of 5% mercaptoethanol (Sigma) for 5 minutes and then subjected to SDS-PAGE as described below.

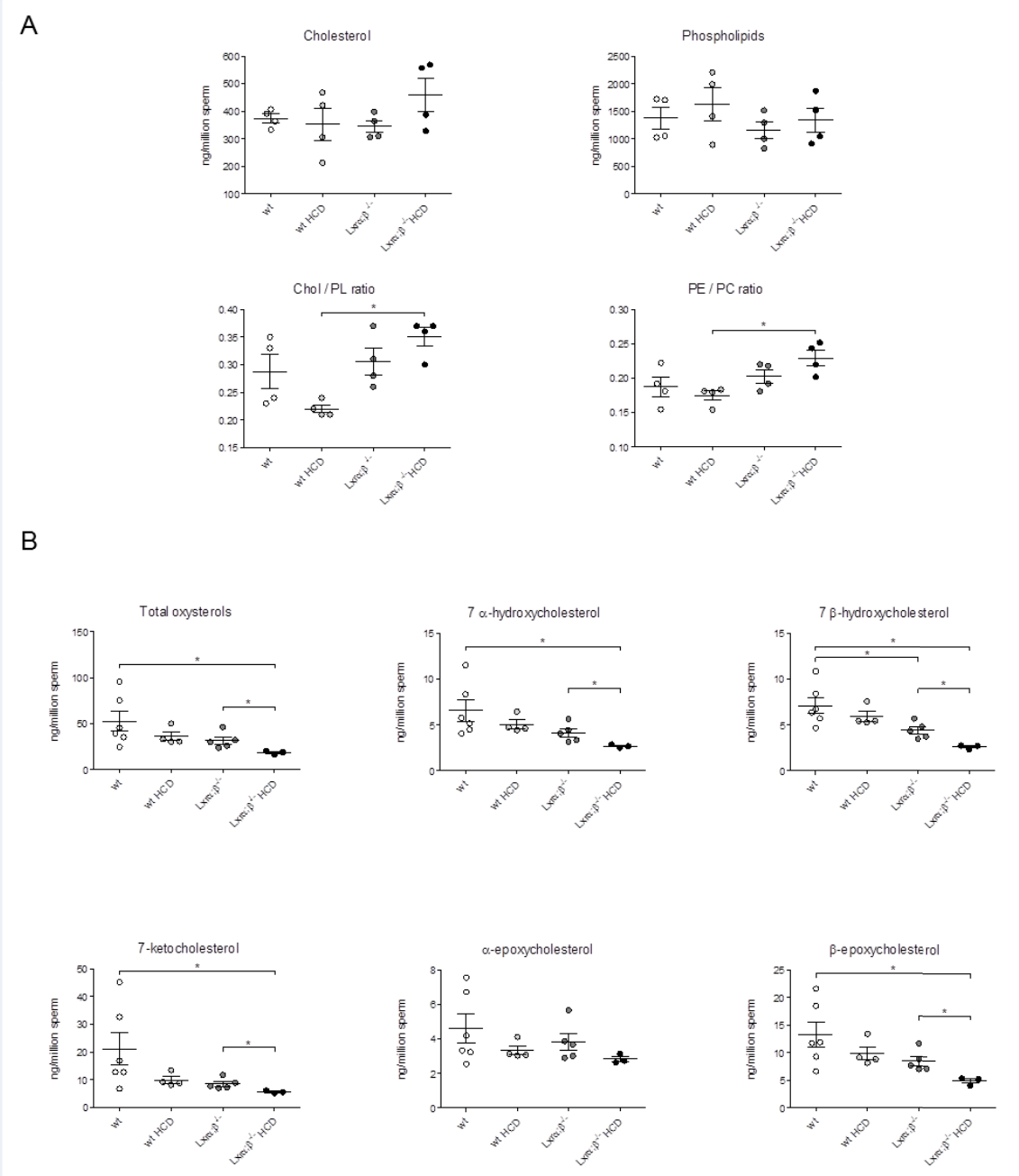



**Figure 1: Influence of HCD on sperm lipid composition. (A)** Cholesterol and phospholipids were assayed and membrane fluidity-related ratios were calculated on sperm from control diet-and HCD-fed 4-months-old wild type (*wt*) and *Lxrα;β*$^{-/-}$ mice. Horizontal bars represent means ± SEM, n=4. **(B)** Total and different classes of oxysterols were assayed from sperm of control and HCD fed 4-months-old wild type (*wt*) and *Lxrα;β*$^{-/-}$ mice. Horizontal bars represent means ± SEM, n= 6 *wt*, 4 *wt* HCD, 5 *Lxrα;β*$^{-/-}$, 3 *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD. *$p<0.05$ between the compared groups (Mann-Whitney test). Chol: cholesterol, PL: phospholipids, PE: phosphatidylethanolamine, PC: phosphatidylcholine.

### Extraction of sperm proteins

*Cauda* epididymal sperm proteins were extracted in RIPA buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 12 mM sodium deoxycholate, 3 mM sodium dodecyl sulfate, 1% Igepal CA-630, Sigma) supplemented with protease inhibitors (Complete mini, Roche, Meylan, France) and phosphatase inhibitors (Halt phosphatase inhibitor cocktail, ThermoScientific, MA, USA) and subjected to 30 minutes of sonication (30sec/30sec) at 4°C. Samples were then centrifuged at 14000g for 10 minutes at 4°C. Supernatants were collected and the proteins dosed by the bicinchoninic acid method (Smith *et al.*, 1985). For electrophoresis, 25 µg of proteins were diluted in Laemmli sample buffer and incubated for 5 minutes at 100°C.

### Extraction of tissue proteins

Testis, *caput* and *cauda* epididymal tissues were homogenized in high salt buffer (25 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 1% Igepal CA-630, Sigma) supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Lysates were centrifuged at 4°C for 10 minutes at 13000g. Supernatants were collected and the proteins dosed by the Bradford method (Bradford, 1976). For electrophoresis, 25 µg of proteins were diluted in Laemmli sample buffer and incubated for 5 minutes at 100°C.

### Collection of epididymosomes

*Cauda* epididymides from six mice were collected in 500 µl of WH. Sperm cells were retrieved in WH by first stitching tissues using a needle and sperm suspensions were collected. Then tissues were minced in 500 µl of WH to release epididymal fluid. Suspensions of tissues and sperm were centrifuged separately at 500g for 5 minutes at 4°C. The supernatants were further clarified by centrifugation (16000g, 20 minutes at 4°C) and pooled, representing the epididymal luminal fluid (ELF). Using an Optima L-80 XP centrifuge with SW41 rotor (Beckman Coulter, Roissy CDG, France), the ELF was subjected to ultracentrifugation at 120 000g for 2 hours at 4°C. The pellet, containing the epididymosomes, was taken up in 25µl RIPA buffer and the proteins were extracted by 30 minutes of sonication as described above. Supernatants were collected and the proteins dosed by the bicinchoninic acid method (Smith *et al.*, 1985). For electrophoresis, 25 µg of proteins were diluted in Laemmli sample buffer and incubated for 5 minutes at 100°C.

### Immunoprecipitation of phosphotyrosine-containing proteins

*Cauda* epididymal sperm were collected as described above and 80 millions of sperm cells were incubated in capacitation medium 1. At 0 and 90 min of incubation, sperm cells (40 millions) were washed in PBS and proteins were extracted in RIPA with protease and phosphatase inhibitor. After sonication as described above, lysates were centrifuged at 4° C for 10 minutes at 15000g. Supernatants were incubated 30 minutes at 4°C with Protein A/G magnetic beads (ThermoScientific) for preclearing. Then 20 µl of supernatants were mixed with 5 µl of Laemmli 5X and boiled for 5min (input). The remainders of the supernatants were subjected to immunoprecipitation by incubation with 20 µl of magnetic beads conjugated with the anti-phosphotyrosine antibody (16-282, Merck Millipore, Fontenay-sous-Bois, France), overnight at 4°C. Then magnetic beads were washed three times with 300 µl of PBS and boiled for 5 minutes in 20 µl of Laemmli 2X before SDS-PAGE as described below.

### SDS-PAGE and western blot analysis

Protein samples were subjected to denaturing SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Blots were blocked with Tris Buffered Saline (TBS) (50 mM Tris, 150 mM NaCl) containing 0.1% v/v Tween 20 and 10% w/v low fat dried milk for anti-phosphotyrosine (05-321, clone 4G10, Merck Millipore), α-Tubulin (T6074, Sigma) and β-Actin (A2066, Sigma) antibodies, 5% w/v BSA for VDAC-2 antibody (ab37985, ABCAM), or 5% w/v low fat dried milk and 3% casein for PMCA4 antibody (sc-22080, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA). Membranes were probed overnight at 4°C with anti-phosphotyrosine (1/1000), α-Tubulin (1/10000), β-Actin (1/1000), VDAC2 (1/250) and PMCA4 (1/500) antibodies in corresponding blocking solutions. After washing, membranes were incubated with the following secondary antibodies: anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated (HRP) (BI 2413C, 1/1000 for anti-phosphotyrosine and α-Tubulin; Abliance, Compiègne, France), anti-rabbit HRP (BI 2407, 1/1000 for β-Actin, Abliance) and anti-goat HRP (BI 2403, 1/1000 for VDAC2, Abliance). For PMCA4 anti-goat Biotin-SP conjugated (1/5000, 705-066-147, Jackson Immunoresearch, PA, USA) followed by streptavidine HRP (1/5000, 016-030-084, Invitrogen,

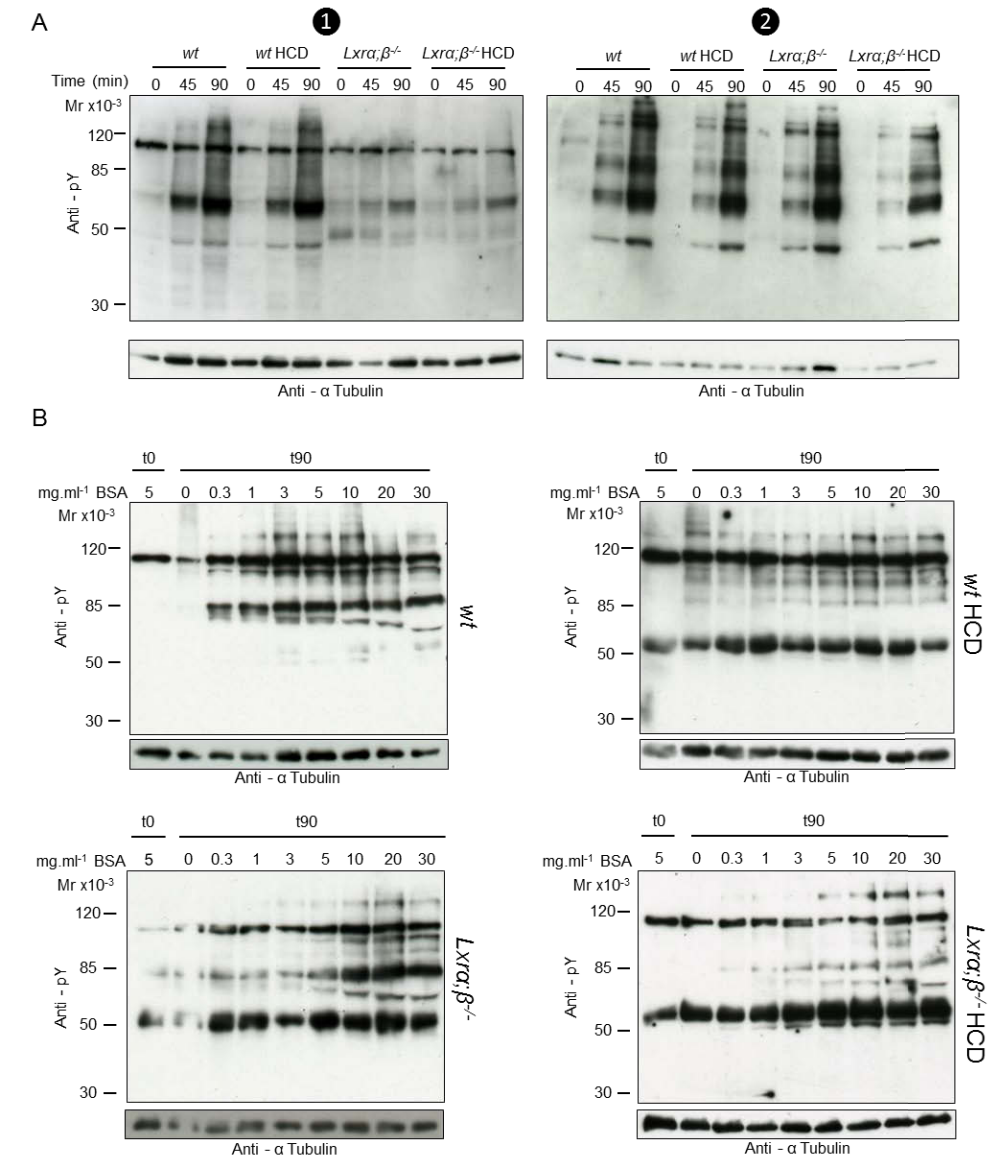



**Figure 2: Capacitation efficiency determined with anti-phosphotyrosine western blot. (A)** Sperm from *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ mice fed with control diet or HCD were incubated 0, 45 or 90 minutes in classical capacitation medium 1 or in medium 2 supplemented with 8-Bromo-cAMP and IBMX. Protein extracts were analyzed with anti-phosphotyrosine antibody. This experiment was performed 4 times with similar results. Alpha-tubulin was used as a control of the protein amount. **(B)** Sperm from *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ mice fed with control diet or HCD were incubated 90 minutes in capacitation medium 1 containing increasing concentrations of BSA (0, 0.3, 1, 3, 5, 10, 20, 30 mg.ml$^{-1}$). Proteins extracts were analyzed with anti-phosphotyrosine antibody. Each western blot for each group is representative of 4 experiments. Alpha-tubulin was presented under each blot as a control of protein amount.

MA, USA) were used. Detection was performed using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) on MF-ChemiBIS 3.2 camera (DNR Bioimaging systems, Jerusalem, Israel) and densitometric analyses were carried out using Multi Gauge V3.2 software.

### Evaluation of membrane fluidity using flow cytometry

Sperm ($15x10^6$cells.ml$^{-1}$) were incubated in capacitation medium 1 during 0, 45 and 90 minutes. Each time, after washing in WH, 2.7 µM of merocyanine 540 (marker of membrane fluidity, Molecular Probes, Oregon, USA) and 25 µM of YO-PRO-1 (a marker of viability, Molecular Probes) were added and $0.5x10^6$ sperm cells were acquired in LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) flow cytometer and the results were analyzed using FACSDIVA™ 6.01 software.

### Determination of calcium flux using flow cytometry

*Cauda* epididymal sperm cells ($10x10^6$cells.ml$^{-1}$) were loaded with 5 µM of Fluo4-AM probe (dissolved in 20% Pluronic F127 to facilitate cell loading) during 1 hour at room temperature in the dark (Molecular Probes) in WH. After washing in WH, sperm were incubated in capacitation medium 1 during 0, 45 and 90 minutes. Before each assay, 1.5 µg.ml$^{-1}$ of propidium iodide (a marker of cell viability, Sigma) were added and $0.5x10^6$ sperm cells were acquired on an LSR II (BD Biosciences) flow cytometer and the results were analyzed using FACSDIVA™ 6.01 software.

### Immunocytology

Sperm ($5x10^6$cells.ml$^{-1}$) were fixed in paraformaldehyde 2% in PBS during 15 minutes at 4°C. After two washes in PBS, sperm were spread on glass slides. After drying at room temperature, sperm were permeabilized with PBS-triton 0.2% during 20 minutes and blocked 1 hour with PBS-triton 0.2%, NGS 1.5% (normal goat serum, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Slides were then probed with anti-phosphotyrosine 4G10 antibody (1/100, Merck Millipore) overnight at 4°C. The secondary anti-mouse Alexa Fluor 555 -conjugated antibody (1/100, A21425, Life Technologies, Carlsbard, USA) was incubated 1 hour at room temperature and sperm nuclei were stained with Hoechst 33342 (1 µg.ml$^{-1}$, Invitrogen) and mounted in PBS/glycerol. The percentages of unlabeled, tail, head and head + tail stained were evaluated by counting at least 200 cells per slide.

### Quantification of mRNA by Real-Time Quantitative RT-PCR

Total mRNAs from testis, *caput* and *cauda* epididymides were isolated using the NucleoSpin RNA II column kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to manufacturer's instructions. RNA (1 µg) was reverse transcribed and quantitative PCR was performed as previously described (Whitfield *et al.*, 2016). The relative accumulation level of each mRNA was normalized using 36b4 as a standard and analyzed with ΔΔCt method. Primer sequences are listed in Table 1.

## RESULTS

### Dyslipidemia affects sperm lipid composition

To test whether the diet-induced epididymal phenotype affects the sperm lipid content we assayed the cholesterol and phospholipids composition in *cauda* epididymal sperm of 4-month-old *wt* or *Lxrα;β*$^{-/-}$ male mice fed a control or HCD diet. No significant difference in cholesterol or total phospholipids was apparent between groups (Fig.1A). However, the cholesterol/phospholipids (Chol/PL) ratio and the phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine (PE/PC) ratio were significantly increased in sperm from *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD mice ($p<0.05$ compared to *wt*-HCD, Fig.1A). As recent articles showed the presence of oxysterols in sperm (Brouwers *et al.*, 2011; Boerke *et al.*, 2013) thought to promote membrane fluidity by causing lateral membrane expansion (Olkkonen and Hynynen, 2009) we assessed the amount of oxysterols in *cauda* sperm cells by mass spectrometry. Total oxysterols were significantly decreased in *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD compared to *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ mainly due to a decrease of 7 α -hydroxycholesterol, 7 β-hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol and β-epoxycholesterol ($p<0.05$ compared to *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$, Fig.1B). Overall, these data suggest that dyslipidemia disrupts the epididymal function and impairs sperm lipid composition in *Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed with the HCD.

### Dyslipidemia disrupts membrane-related capacitation events

Cholesterol efflux from the sperm plasma membrane facilitated by acceptors such as albumin present in the secretions of the female genital tract triggers sperm capacitation. This

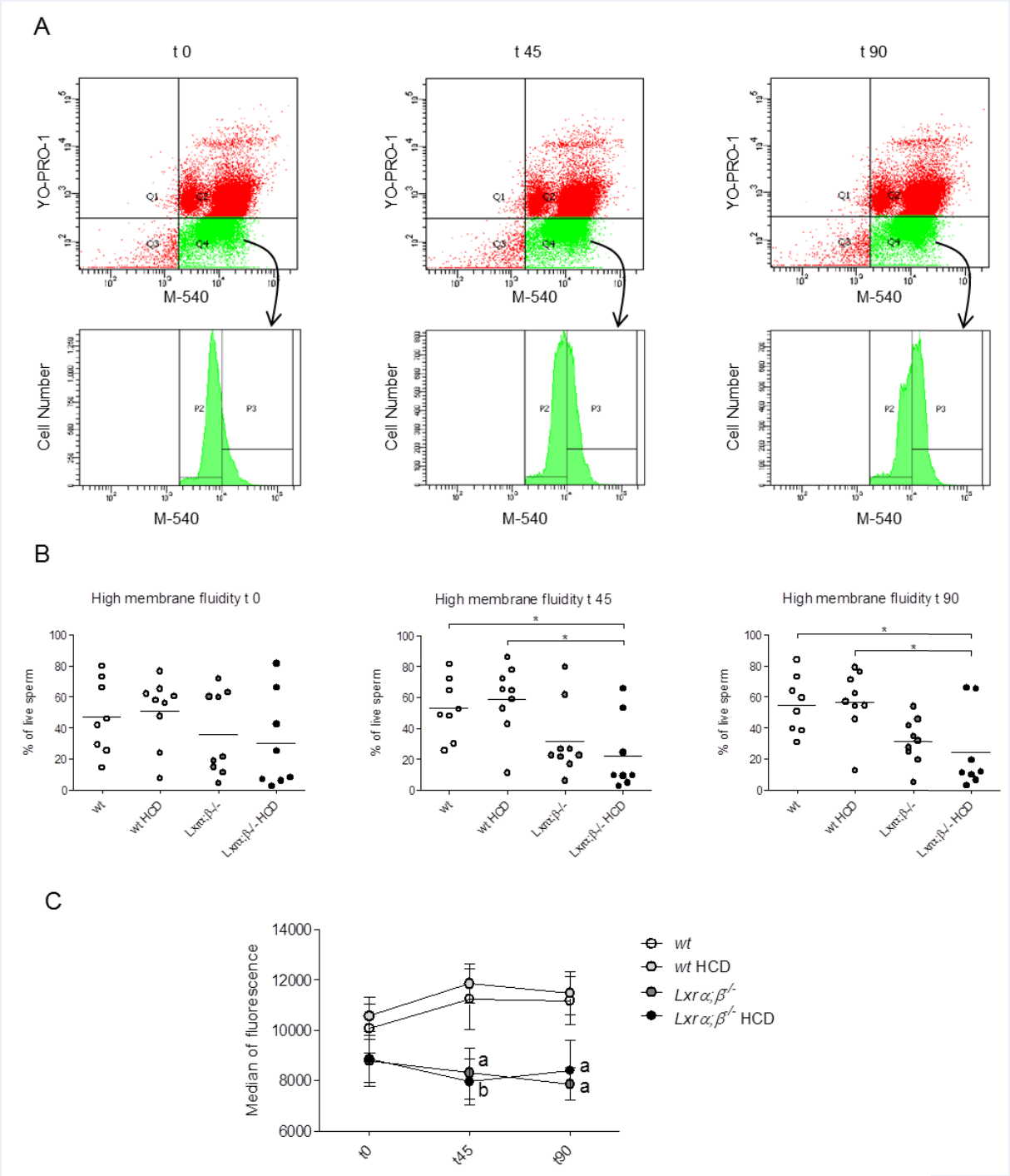



**Figure 3: Evaluation of membrane fluidity using flow cytometry.** Sperm from *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ mice fed with control diet or HCD were incubated 0, 45 or 90 minutes in capacitation medium 1. YO-PRO-1 and merocyanine-540 were added to determine sperm viability and membrane fluidity respectively and 0.5x10$^{6}$ cells were acquired on an LSR II flow cytometer. **(A)** The upper panel shows cytograms with a green population representing live sperm stained with merocyanine -540 probe. The underlying histograms show the cell number of this green subpopulation depending on the intensity of merocyanine-540 fluorescence. Two subpopulations are visible: P2 with low membrane fluidity and P3 with high membrane fluidity. **(B)** Scatter dot plots represent the percentage of live sperm in P3 subpopulation (high membrane fluidity) during capacitation. Horizontal bars represent means. **(C)** Evolution of median fluorescence in merocyanine-540 in the green subpopulation during capacitation. The points are means ± SEM. * p<0.05 between compared groups, a = p<0.05 *vs wt*, b = p<0.01 *vs wt* HCD (Mann Whitney test). n= 8 *wt*, 9 *wt* HCD, 9 *Lxrα;β*$^{-/-}$, 8 *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD. M-540: merocyanine-540.

can be mimicked *in vitro* by adding BSA in the capacitation medium (Fig. 2A-1) and the efficiency of capacitation can be measured by quantifying tyrosine-phosphorylated proteins by western blot, as it is a final marker of the process.

As shown in Figure 2A1, the HCD had no effect on capacitation efficiency in *wt* animals, during a kinetic study between 0, 45 and 90 min of incubation. *Lxrα;β*$^{-/-}$ males showed a rather altered tyrosine-phosphorylation profile that was slightly aggravated by the HCD. Since signaling pathway following sperm plasma membrane cholesterol efflux involves sAC-mediated cAMP production which in turns activates PKA resulting *in fine* in tyrosine phosphorylation events, we have used 8-bromo-cAMP (a cell permeant analogue of cAMP) and IBMX (an inhibitor of the phosphodiesterases responsible for cAMP degradation) to produce an increase in intracellular cAMP. Doing so PKA is activated independently of the physiological membrane events (cholesterol efflux) normally triggering the capacitation process. In these conditions (Fig. 2A-2) tyrosine phosphorylation of sperm proteins during capacitation was similar between groups. This result strongly suggests that the dysregulations observed with BSA as a capacitation inducer are due to membrane defaults, upstream of cAMP production. This hypothesis was further tested by incubating sperm in capacitation media containing increasing amounts of BSA (Fig. 2B). For *wt* sperm, fed with control diet or HCD, the maximum efficiency was reached when low concentrations of BSA were present (left and right upper panels). Maximum efficiency in tyrosine-phosphorylation was reached with higher BSA concentrations for *Lxrα;β*$^{-/-}$ males (lower left panel) and *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD males(lower right panel). These results are in accordance with changes in membrane dynamics limiting cholesterol efflux to extracellular acceptors, and thus altering capacitation efficiency.

To determine if the decrease in tyrosine phosphorylation was due to a decrease in the number of capacitating sperm cells or to a decrease in the overall phosphorylation intensity, the percentage of sperm cells stained by the anti-phosphotyrosine antibody was calculated (Fig. S1A). It clearly appeared that significantly fewer spermatozoa were stained in the *Lxrα;β*$^{-/-}$ males compared to the *wt* group at any time of capacitation (a). These results also showed that sperm from *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD mice were significantly less stained than the ones from *Lxrα;β*$^{-/-}$ males (c), here again in accordance with the western blot data. At t0, fewer *wt*-HCD spermatozoa were stained compared to *wt*, but this difference was not maintained during the course of capacitation. The defects in the capacitation-associated signaling pathway were probably located on the whole sperm cell surface as the percentage of sperm cells stained on the head or the tail were lower in the *Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed or not with the HCD compared to the *wt* groups at any time of capacitation (Fig. S1B).

### Dyslipidemia alters sperm membrane fluidity during capacitation

Sperm plasma membrane fluidity was evaluated using a direct method with merocyanine-540 (M-540) that has the ability to target membrane fluid domains. M-540 detection was coupled with YO-PRO-1 (detecting live cells), and flow cytometry was used to measure the relative proportion of live sperm undergoing membrane fluidification during the capacitation process. In figure 3A, living spermatozoa (in green in the Q4 quartile) appeared as separated into two subpopulations (P2 and P3): P2 showing low membrane fluidity, and P3 showing high membrane fluidity. During the course of capacitation, the relative proportion of the P3 subpopulation increased, revealing an increase in the percentage of sperm cells showing high fluidity (lower panel of Fig. 3A). When comparing the percentages of sperm cells in the P3 subpopulation between groups, there was no significant difference at t0 (Fig. 3B, left panel), but at that time the heterogeneity was high. During capacitation, at t45 and t90, significantly fewer spermatozoa reached a state of high membrane fluidity for the *Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed with the HCD compared to *wt* and *wt*-HCD spermatozoa (Fig. 3B, middle and right panels). There was also a similar tendency for *Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed with the control diet (compared to *wt*) at these two times of capacitation.

The median of fluorescence intensity measured on the Q4 subpopulation is related to the overall sperm membrane fluidity as it is dependent on the total amount of M-540 inserted in their membrane. When plotting this median of fluorescence to compare the groups, no significant difference was seen at t0. During the course of capacitation, it was clear that *Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed with the control diet or the HCD had a significantly lower overall fluidity than the *wt* spermatozoa (Fig. 3C).

Overall, these results showed that fewer spermatozoa from

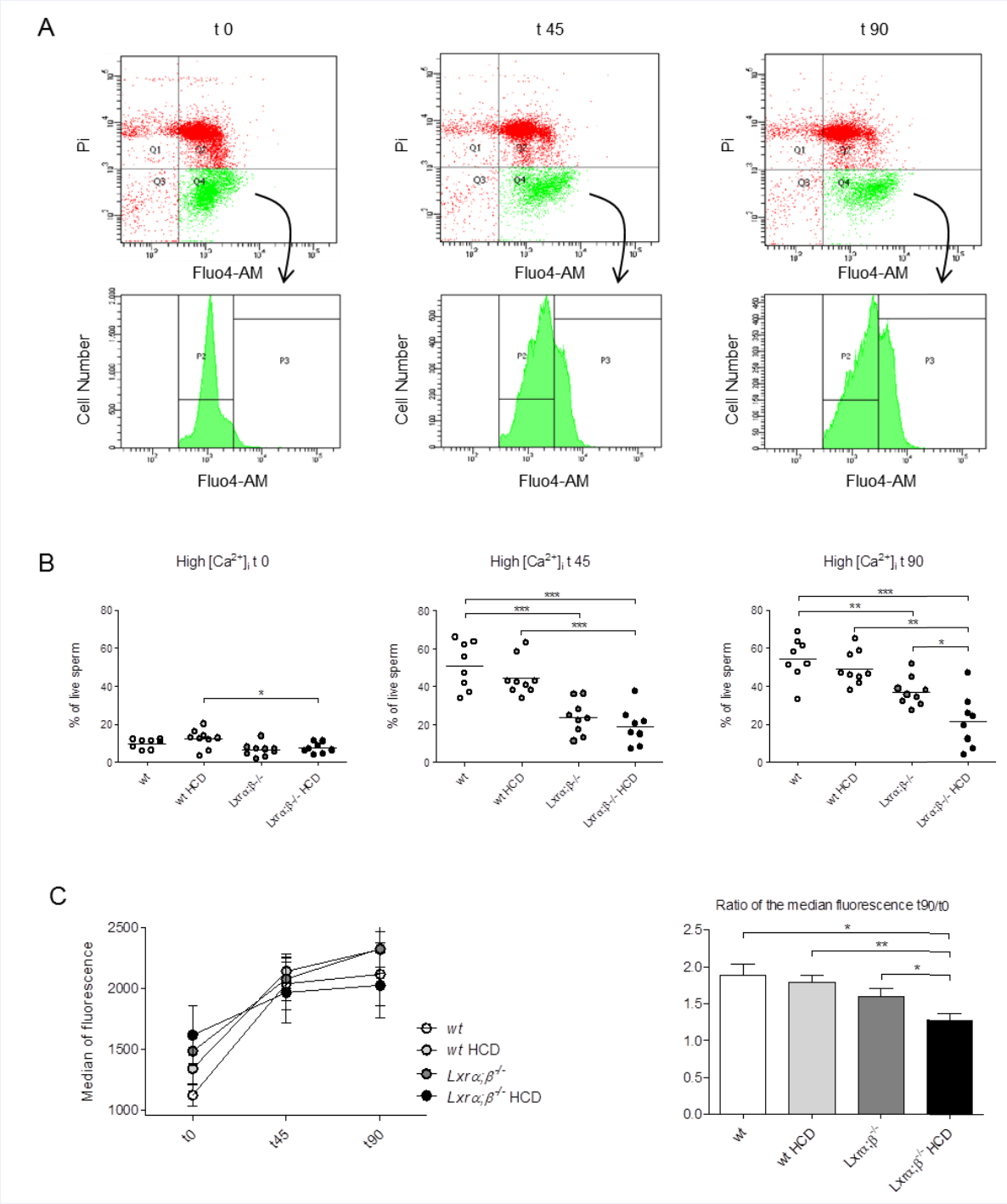



**Figure 4: Determination of calcium fluxes during capacitation.** Sperm from *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ mice fed with control diet or HCD were incubated 1 hour with Fluo4-AM (to load sperm). Fluo4-AM emits fluorescence depending on intracellular calcium concentration as the probe is blocked in cells after hydrolysis of the ester group by cell esterase. Then sperm were incubated 0, 45 or 90 minutes in capacitation medium 1, Pi was added to determine sperm viability and $0.5 \times 10^6$ cells were acquired on an LSR II BD flow cytometer. **(A)** The upper panel shows cytograms with a green subpopulation representing live sperm that integrated Fluo4-AM probe. The underlying histograms show the cell number of this green subpopulation depending on the intensity of Fluo4-AM fluorescence. Two subpopulations are visible: P2 with low intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and P3 with high $[Ca^{2+}]_i$. **(B)** Scatter dot plots represent the percentage of live sperm in P3 subpopulation (high intracellular calcium concentration) during capacitation. Horizontal bars represent mean. **(C)** Evolution of the median fluorescence of Fluo4-AM in green subpopulation during capacitation (left panel), and median fluorescence ratio between t90 and t0 indicating the increase of $[Ca^{2+}]_i$ during capacitation (right panel). The values are means ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 between compared groups (Mann Whitney test). n= 8 *wt*, 9 *wt* HCD, 9 *Lxrα;β*$^{-/-}$, 8 *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD. Pi: propidium iodide.

*Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed with the HCD had the ability to engage into capacitation as measured by the increase in membrane fluidity, and that their overall fluidity was lower than for the *wt* spermatozoa.

### Dyslipidemia alters sperm calcium fluxes during capacitation

Calcium influx during capacitation is highly regulated and involved in the control of the signaling pathway triggered by membrane events. Alterations of the membrane dynamics may thus have impacts on these calcium fluxes. We used flow cytometry with Fluo4-AM to measure $[Ca^{2+}]_i$ in capacitating spermatozoa from our four groups (Fig. 4). As seen for membrane fluidity in figure 3, living sperm in the Q4 quartile (Fig. 4A in green) were separated into two subpopulations of low (P2) and high (P3) $[Ca^{2+}]_i$. During the course of capacitation, the percentage of sperm cells in the P3 subpopulation normally increases as seen in the lower panel of figure 4A. At t0, the differences between groups were minimal and the $[Ca^{2+}]_i$ low. There was a significant difference between wt-HCD and *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD (Fig. 4B left panel, $p<0.05$). During capacitation, the raise in $[Ca^{2+}]_i$ was clearly visible between t0 and t45 for all the groups (Fig. 4B, middle panel). Fewer spermatozoa from the *Lxrα;β*$^{-/-}$ males showed a high $[Ca^{2+}]_i$, with an effect of the diet at t90 as the difference was significant between *Lxrα;β*$^{-/-}$ and *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD males (Fig. 4B, right panel, $p<0.05$).

Here also the median of fluorescence in the Q4 subpopulation was used to evaluate the relative $[Ca^{2+}]_i$ between groups. At t0, even though no significant difference appeared between groups, sperm from the *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD males had a higher $[Ca^{2+}]_i$ than those from *wt* males, and this tendency was inverted at t90 (Fig. 4C, left panel). The ratio of the median fluorescence between t90 and t0 was calculated, and indicates the capacity of the sperm cells to elevate their $[Ca^{2+}]_i$ during the course of capacitation. The difference was significant between *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD and each one of the other groups (Fig. 4C, right panel).

Overall, these results showed that fewer spermatozoa from *Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed with the HCD had the ability to engage into capacitation, as measured by the increase in $[Ca^{2+}]_i$, and that their overall $[Ca^{2+}]_i$ was lower than for the other groups at the end of capacitation. These results are in accordance with those from membrane fluidity measurements (Fig. 3). Indeed there is a strong correlation between the subpopulations of high membrane fluidity and high intracellular calcium concentration at t90 (Fig. S2, $r=0.5972$, $p<0.0002$).

### Sperm calcium dysregulation comes from dyslipidemia-induced epididymal sperm maturation defect

Calcium fluxes during capacitation are regulated by the activity of several proteins, including the major calcium pump PMCA4 (plasma membrane calcium ATPase 4) and VDAC2 (voltage-dependent anion channel 2). VDAC2 was previously demonstrated as tyrosine phosphorylated during capacitation (Arcelay *et al.*, 2008), while PMCA4 is known to be acquired during epididymal transit (Patel *et al.*, 2013). These characteristics prompted us to evaluate their behavior in the *Lxrα;β*$^{-/-}$-observed dysregulations of $[Ca^{2+}]_i$. We therefore have first investigated the distribution of these proteins on *cauda* epididymal sperm from our four groups by western blot. PMCA4 was shown to be significantly decreased in sperm from *Lxrα;β*$^{-/-}$ males fed with the HCD (compared to each one of the other groups) whereas VDAC2 was stable among the groups (Fig. 5A). As PMCA4 has been shown to be acquired *via* epididymosomes during epididymal maturation, these vesicles were isolated from the *cauda* epididymis of *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD males. The quantities of PMCA4 and VDAC2 were then measured by western blot (Fig. 5B). Both PMCA4 and VDAC2 were less abundant on epididymosomes purified from *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD males compared to *wt* males, even though these differences were not statistically significant due to variations between the different pools used for this study ($p=0.3$ for PMCA4 and 0.0571 for VDAC2).

Tyrosine phosphorylation of VDAC2 and PMCA4 (although it is not yet known whether PMCA4 is Tyr-phosphorylated or not during capacitation) was evaluated Tyrosine-phosphorylated proteins were immunoprecipitated from sperm of *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD males, at t0 and t90 of the capacitation process. VDAC2 and PMCA4 were measured by western blot on the pool of immunoprecipitated proteins in order to evaluate the course of their tyrosine phosphorylation during capacitation. As previously described, VDAC2 was tyrosine phosphorylated during capacitation in our two conditions (Fig. 6A). However, the level of VDAC2 tyrosine phosphorylation was higher at t0 in spermatozoa from *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD males compared to *wt* (Fig. 6A). When considering the fold of VDAC2 tyrosine-phosphorylation during the course of capacitation, it was close to 2 for *wt* sperm

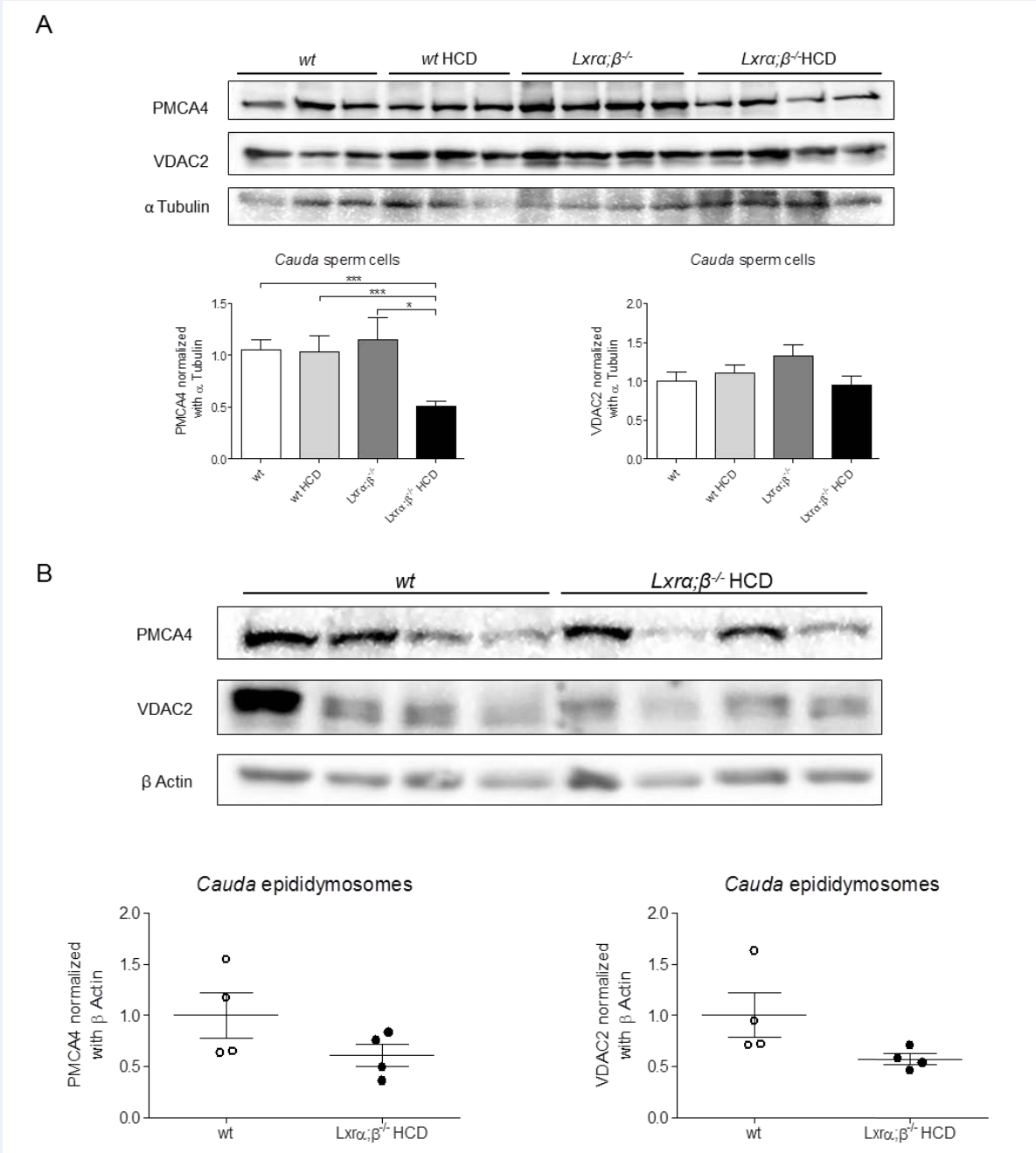



**Figure 5: PMCA4 and VDAC2 protein levels in *cauda* sperm and epididymosomes. (A)** Relative PMCA4 and VDAC2 protein levels in *cauda* sperm from *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ mice fed with control or HCD diet. Alpha-tubulin was used as a control of protein amount for quantification. Bar graphs display means ± SEM, n= 10 *wt*, 13 *wt* HCD, 11 *Lxrα;β*$^{-/-}$, 16 *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD. **(B)** Relative PMCA4 and VDAC2 protein levels in *cauda* epididymosomes from *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD (each point represents epididymosomes from 6 mice). Beta-actin was used as a control of protein amount for quantification. In scatter dot plots, horizontal bars represent means ± SEM, n=4. *$p<0.05$, ***$p<0.001$ between compared groups (Mann Whitney test).

whereas it was slightly above one for *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD males (Fig. 6B). PMCA4 also showed tyrosine phosphorylation at t0 but capacitation had no effect on its level (Fig. 6C,D). For these two proteins, a certain heterogeneity appeared between individuals.

Overall, these data showed that spermatozoa from *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD males had lower levels of PMCA4 than *wt* spermatozoa, and that the tyrosine phosphorylation of VDAC2 was altered at t0. The importance of these alterations in the dysregulations of the $[Ca^{2+}]_i$ will be discussed.

## DISCUSSION

Fat-rich regimens are mainly responsible for several serious and widespread illnesses such as obesity, diabetes and cardio-vascular diseases. It has also been demonstrated that the lipid imbalance can alter the male and female reproductive functions (Seli *et al.*, 2014; Katib, 2015). In the majority of reports concerning male reproductive function, these issues are addressed in terms of the impact of lipid-driven endocrine dysregulations on spermatogenesis whereas very few data are available regarding post-testicular sperm maturation. Very recent data have however pinpointed the epididymis and the post-testicular sperm maturation as an additional target of metabolic disorders, with the capacity to modify maturing sperm ultimately leading to the eventual transmission of the disorders to the offspring (Grandjean *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016). Our data are totally in accordance with the observation that structure and functions of accessory organs of the male genital tract are impaired by diet-induced lipid disorders. We show that, in our model of *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD fed mice, dyslipidemia alters the epididymal function, sperm lipid composition and dynamics as well as protein acquisition *via* epididymosomes. Ultimately, these alterations impair sperm capacitation and fertilizing ability.

In this model of *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD-fed mice, the high level of susceptibility of epididymis to dietary cholesterol overload is highlighted. We had previously shown that cholesterol overload resulted in serious epididymal phenotype, characterized by intra-epithelial lipid accumulation, epithelium degeneration and the creation of an inflammatory environment, leading to name this phenotype "epididymosclerosis" (Ouvrier *et al.*, 2011). Here we showed that epididymal maturation was disrupted with an impact on both sperm lipids and proteins. Lipid changes in *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD sperm were subtle but sufficient to increase the Chol/PL and PE/PC ratios, translating into membrane stiffening (Cooper, 1978; Devaux, 1991). We could also observe an overall decrease in the oxysterol content in these spermatozoa. This is in favor of membrane stiffening, as oxidized sterols are known to promote membrane fluidity by causing lateral membrane expansion (Olkkonen and Hynynen, 2009). Oxysterols have recently been described in bovine (Brouwers *et al.*, 2011), porcine and mouse sperm (Boerke *et al.*, 2013). They were shown to play a role in the capacitation process and to move more freely out of the sperm membrane. They bind to acceptor proteins such as albumin, due to their higher hydrophilic characteristics as compared to cholesterol (Aitken, 2011). Another *in vitro* study, conducted on liposomes, showed that the presence of oxysterols in a membrane increased the availability of cholesterol, making it less shielded by other membrane lipids (Bielska *et al.*, 2014). Taken together these data indicate that the dyslipidemia-induced increase of the Chol/PL and PE/PC ratios associated to the reduction of oxysterols in *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD sperm may result in a decrease in membrane fluidity limiting the sterol efflux that triggers capacitation. Our hypothesis is supported by the observation that increasing the availability of the extracellular cholesterol acceptor by raising BSA concentration in the capacitation medium partially restored the efficiency of capacitation, as measured by tyrosine phosphorylation.

Flow cytometry data confirmed the increase in membrane rigidity in *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD spermatozoa and revealed that a lower percentage of living sperm cells (dead sperm being excluded) were able to develop a high membrane fluidity during capacitation compared to *wt*. Furthermore, the overall membrane fluidity of living cells, as measured by the median value of merocyanine fluorescence, was lower for *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD sperm. These data attest that spermatozoa in this lipid-mediated abnormal context (*i.e.* the *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD) have difficulties to bring their plasma membrane to an optimal state of fluidity.

Mammalian spermatozoa are very peculiar cells as their genetic material is silent, due to its very high degree of compaction, enabling its protection during the journey towards the fertilization site. Molecular events occurring during post-testicular maturation are consequently highly dependent on

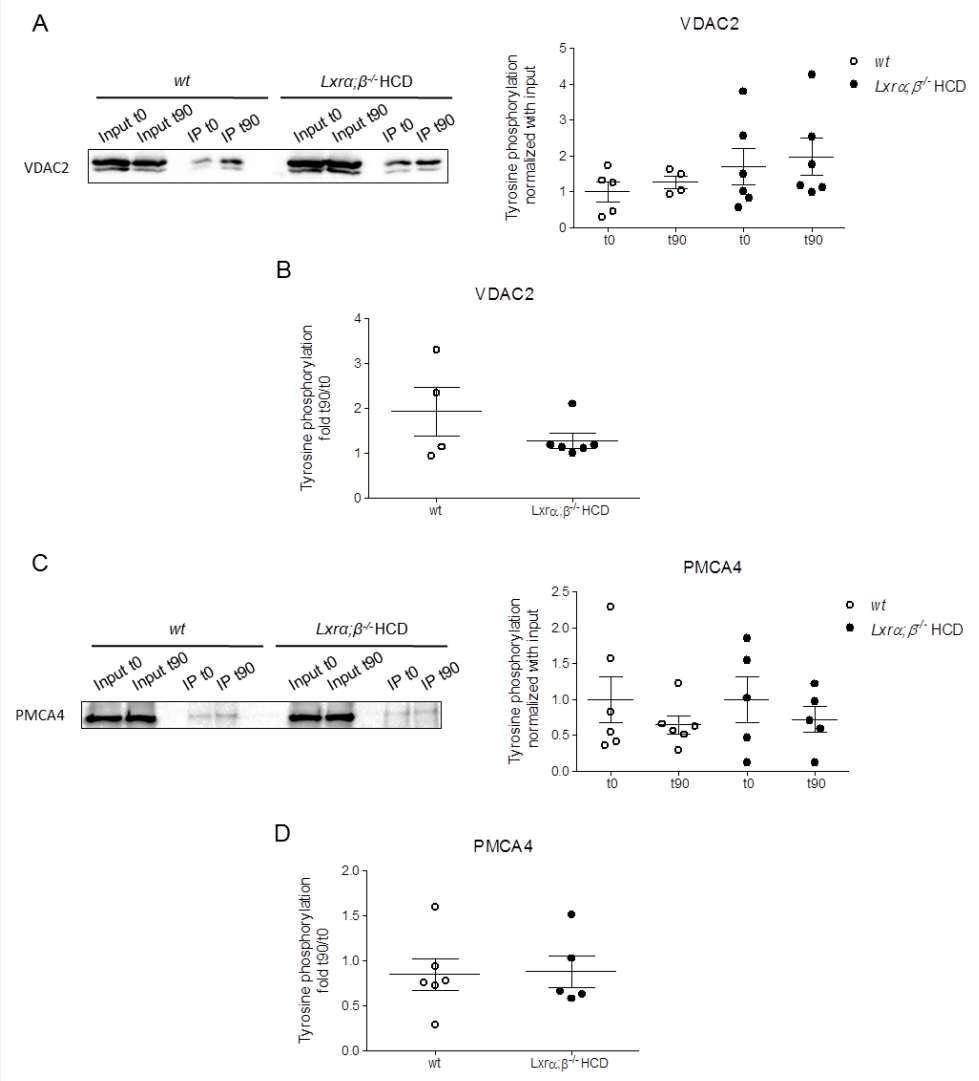



**Figure 6: Analysis of PMCA4 and VDAC2 tyrosine phosphorylation during capacitation.** Sperm from *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD mice were incubated during 0 or 90 minutes in capacitation medium 1. At each time total sperm proteins were extracted (40 millions) and subjected to tyrosine phosphorylated immunoprecipitation (IP). Input (representing a total protein amount before immunoprecipitation) and IP samples were subjected to SDS-PAGE and western blotting was performed against VDAC2 **(A)** and PMCA4 **(C)**. Scatter dot plots represent IP normalization with input. The increase of tyrosine phosphorylation for VDAC2 **(B)** and PMCA4 **(D)** during capacitation was calculated. In scatter dot plots, horizontal bars represent means ± SEM (PMCA4 n=6 *wt*, 5 *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD and VDAC2 n=4 *wt*, 6 *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD).

their membrane composition and dynamics. We demonstrated that the major problem for the *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD spermatozoa to achieve capacitation indeed resides at the plasma membrane level since the intracellular signaling events downstream of sAC and upstream of tyrosine kinases were perfectly normal. This was evidenced by the fact that a totally standard tyrosine phosphorylation profile could be obtained *in vitro* in all situations tested when using a classical (8-Bromo-cAMP + IBMX) capacitation medium known to provoke tyrosine phosphorylation in the absence of BSA (Visconti *et al.*, 1995).

Calcium fluxes have been described as essential for the regulation of capacitation (Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2012). Calcium is involved in the signaling cascade regulating capacitation by participating in the sAC activation (Jaiswal and Conti, 2003), in the acquisition of the sperm hyperactivation movement (Qi *et al.*, 2007; Navarrete *et al.*, 2015) and in the triggering of the acrosome reaction (Navarrete *et al.*, 2015). Sperm $[Ca^{2+}]_i$ is finely tuned by a set of ion channels (Darszon *et al.*, 2011; Lishko *et al.*, 2012), because calcium can have a dual role as both an activator or an inhibitor of capacitation (Navarrete *et al.*, 2015). During capacitation, fewer *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD sperm were able to acquire a high $[Ca^{2+}]_i$, showing dysregulations in capacitation-associated calcium influx. The observed dysregulations of $[Ca^{2+}]_i$ were more subtle than that as basal $[Ca^{2+}]_i$ was perturbed in *Lxrα;β*$^{-/-}$ with a tendency to be too elevated, and the calculated ratio of $[Ca^{2+}]_i$ increase during capacitation was significantly impaired only in *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD sperm. The most studied calcium channels in relation with capacitation and hyperactivation are the CatSper (cation channels of sperm) channels which are activated by the raise in intracellular pH during capacitation (Kirichok *et al.*, 2006). These channels have been proven as essential for male fertility based on the fact that male mice lacking any of the CatSper1–4 or δ genes are infertile, due to a lack of hyperactivated motility and capacitation defects (Ren *et al.*, 2001; Quill *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2011). However, CatSper1-null spermatozoa show a spontaneous dramatic increase in tyrosine phosphorylation, which is further enhanced upon capacitation (Chung *et al.*, 2014). This is not in accordance with our phenotype in which hypophosphorylation was described. In addition, to our knowledge Catsper channels have never been described as tyrosine phosphorylated during capacitation.

The regulation of sperm $[Ca^{2+}]_i$ depends on several important ion channels, a major one being the calcium pump PMCA4. PMCA are a family of enzymes that extrude calcium from the cytosol across the plasma membrane of eukaryotic cells. The tissue-specific expression pattern of different isoforms and splice variants of the pump in mammalian tissues strongly suggest a specific physiological function (Strehler and Zacharias, 2001). PMCA4-deficient mice have revealed the importance of this isoform in male fertility as males are infertile due to impaired sperm motility, associated with a $[Ca^{2+}]_i$ twice higher than in wild-type sperm (Okunade *et al.*, 2004; Prasad *et al.*, 2004; Schuh *et al.*, 2004). The decrease in PMCA4 protein accumulation we observed in our model could explain the tendency to increase the calcium concentration at t0 of capacitation. PMCA4 is partially acquired by spermatozoa during spermatogenesis in the testes, and is also transferred to sperm during epididymal transit *via* epididymosomes (Brandenburger *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2013). Our data showed that the decrease in the amount of sperm PMCA4 in *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD sperm was due to a lower epididymosome content and thus probably to a default in its acquisition by maturing sperm. This is supported by the fact that protein accumulation in testes or *caput* epididymis is not different among our four groups (Fig. S3). The difference observed for the *cauda* epididymis is in accordance with this hypothesis. The cause of PMCA4 decrease in spermatozoa remains elusive as it could be related to either a decrease in epididymosomes production, to an alteration of the PMCA4 transfer to spermatozoa, or both. However, it seems that it is not due to a decrease in the expression of the *pmca4* gene as shown by qPCR data presented on figure S4, where the expression level was similar between groups in all the tissues explored. A hypothesis could be that dyslipidemia-induced epididymal alterations may modify the lipid composition and thus the membrane structure of epididymosomes. Indeed these vesicles are characterized by a high cholesterol/phospholipids ratio and a sphingomyelin enrichment (Rejraji *et al.*, 2006). These two characteristics are signatures of lipid rafts microdomains and it was previously shown that PMCA pumps were concentrated in lipid rafts (Fujimoto, 1993; Schnitzer *et al.*, 1995). As it has also been shown that, during bovine epididymal maturation, proteins could be specifically trans-

ferred from rafts and non-rafts domains of epididymosomes to the corresponding sperm domains (Girouard *et al.*, 2009), it will be interesting to further investigate epididymosomes composition and structure in our model.

A possible link with PMCA4 function and its tyrosine phosphorylation was shown in sensory neurons in which PMCA4 was under tonic inhibition by a member of the Src family of tyrosine kinase [SFKs, (Ghosh *et al.*, 2011)]. SFKs did not appear to directly phosphorylate PMCA4 but instead activated focal adhesion kinase, FAK, which performs the PMCA4 tyrosine phosphorylation. These kinases are known to be involved during capacitation (Battistone *et al.*, 2014; Roa-Espitia *et al.*, 2016), implying that PMCA4 could also be regulated by tyrosine phosphorylation in this process. We tested this hypothesis using an immunoprecipitation technique of the tyrosine phosphorylated proteins during the course of capacitation and showed that PMCA4 was tyrosine phosphorylated in a basal state, *i.e.* at t0 of capacitation, but that this phosphorylation did not evolve during capacitation. PMCA4 does not seem to be regulated by tyrosine phosphorylation during sperm capacitation.

VDAC2 is another interesting candidate to explain the sperm $[Ca^{2+}]_i$ alterations. It is a voltage-dependent anion channel which forms pores originally identified in mitochondrial outer membranes of eukaryotic cells (Schein *et al.*, 1976). VDACs have also been characterized in the plasma membrane of different cell types [reviewed by Shoshan-Barmatz *et al.*, 2009)]. VDAC2 was localized by immunofluorescence on the plasma membrane of the sperm head in human (Liu *et al.*, 2011), mouse (Arcelay *et al.*, 2008) and bovine (Hinsch *et al.*, 2001). One of its functions is to transport calcium either into the cytoplasm or into the mitochondrial intermembrane space (Gincel *et al.*, 2001; Israelson *et al.*, 2007). Its precise role in male fertility is not elucidated yet but different studies have shown its importance in $[Ca^{2+}]_i$ regulation (Paradowska *et al.*, 2006; Triphan *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011; Petit *et al.*, 2013). VDAC2 was also shown as involved in the calcium influx regulation during mouse sperm capacitation (Kwon *et al.*, 2013) as its pharmacological inhibition limited the efficiency of this process. Moreover VDAC2 is known to be tyrosine phosphorylated during capacitation in human (Ficarro *et al.*, 2003), buffalo (Jagan Mohanarao and Atreja, 2012) and mouse (Arcelay *et al.*, 2008). In agreement with the literature, we showed that VDAC2 tyrosine phosphorylation had a tendency to increase during capacitation in *wt* sperm. This mechanism was altered in *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD sperm, with a higher basal level of VDAC2 tyrosine phosphorylation compared to *wt* sperm (Fig. 6). The link between VDAC2 tyrosine phosphorylation and its activity as a calcium channel is still not clear (Kerner *et al.*, 2012). However, as it was shown in several species, one could assume that the increase in VDAC2 tyrosine phosphorylation during the capacitation process could favor the opening of this channel and the raise in $[Ca^{2+}]_i$. This could link the basal hyperphosphorylation of VDAC2 to the high basal sperm $[Ca^{2+}]_i$ in *Lxrα;β*$^{-/-}$-HCD sperm, cumulated with the fact that the PMCA4 quantity is abnormally low. We also report here for the first time the presence of VDAC2 in mouse epididymosomes, which implies that it may also be transferred to spermatozoa during the epididymal transit, emphasizing its role in the capacitation process.

In conclusion, in our model, dyslipidemia-induced post-testicular infertility could reside at least partially in the alteration of the acquisition of $Ca^{2+}$-regulating proteins during sperm maturation *via* epididymosomes. The capacitation is consequently altered and the spermatozoa unable to fertilize. Lipids seem to play a central role in this process either by interfering with sperm membrane maturation, epididymosome production and composition, epididymosome-sperm interaction or all of these parameters together. Further investigations will be needed to test these hypothesizes. Epididymosomes appear as central elements for post-testicular maturation, and highly sensitive to metabolic disorders. Finally, characterization of sperm-specific molecules associated with dyslipidemia-induced infertility, such as PMCA4 or VDAC2, may open new areas to better understand unexplained male infertility associated with undiagnosed dyslipidemia.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the lipidomic platform “Metatoul” in Toulouse, Christelle Blavignac from the CICS (Centre Imagerie Cellulaire Santé – Clermont-Ferrand) for flow cytometry analyses, Sandrine Plantade, Kirrhedine Ouchen and Philippe Mazuel for animal facility management, the Chester team (GReD – Clermont-Ferrand) for the use of the

knockout mice, and Lucy Martine (UMR CSGA – Dijon) for her help in oxysterol analyses.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Experiments were designed by MW, AK, FS and JRD. Oxysterol dosages were performed by NA. Flow cytometry experiments were designed and performed by RG, MW and FS. All other experiments were performed by MW, JR and FS. Manuscript was written by MW and FS.

## FUNDINGS

MW was supported by the French Ministry of Higher Education and Research (MESR). AK, FS, RG and JRD received funds from INSERM, CNRS, and MESR. NA was funded by grants from French National Institute for Agricultural Research (INRA), Regional Council of Burgundy, and FEDER (European Funding for Regional Economic Development).

## REFERENCES

Aitken RJ. The Capacitation-Apoptosis Highway: Oxysterols and Mammalian Sperm Function. *Biol Reprod* 2011;**85**:9–12.

Aitken RJ, Nixon B, Lin M, Koppers AJ, Lee YH, Baker MA. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl* 2007;**9**:554–564.

Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 2008;**52**:463–472.

Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 1952;**170**:326.

Baker MA, Hetherington L, Aitken RJ. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J Cell Sci* 2006;**119**:3182–3192.

Battistone MA, Alvau A, Salicioni AM, Visconti PE, Da Ros VG, Cuasnicú PS. Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 2014;**20**:1054–1066.

Bielska AA, Olsen BN, Gale SE, Mydock-McGrane L, Krishnan K, Baker NA, Schlesinger PH, Covey DF, Ory DS. Side-Chain Oxysterols Modulate Cholesterol Accessibility through Membrane Remodeling. *Biochemistry (Mosc)* 2014;**53**:3042–3051.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;**37**:911–917.

Boerke A, Brouwers JF, Olkkonen VM, Lest CHA van de, Sostaric E, Schoevers EJ, Helms JB, Gadella BM. Involvement of Bicarbonate-Induced Radical Signaling in Oxysterol Formation and Sterol Depletion of Capacitating Mammalian Sperm During In Vitro Fertilization. *Biol Reprod* 2013;**88**:21.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248–254.

Brandenburger T, Strehler EE, Filoteo AG, Caride AJ, Aumüller G, Post H, Schwarz A, Wilhelm B. Switch of PMCA4 Splice Variants in Bovine Epididymis Results in Altered Isoform Expression during Functional Sperm Maturation. *J Biol Chem* 2011;**286**:7938–7946.

Brouwers JF, Boerke A, Silva PFN, Garcia-Gil N, Gestel RA van, Helms JB, Lest CHA van de, Gadella BM. Mass Spectrometric Detection of Cholesterol Oxidation in Bovine Sperm. *Biol Reprod* 2011;**85**:128–136.

Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951;**168**:697–698.

Chang MC. Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature* 1955;**175**:1036–1037.

Chávez JC, Hernández-González EO, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A, Treviño CL. Participation of the Cl−/HCO3− Exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl− Channel CFTR, and the Regulatory Factor SLC9A3R1 in Mouse Sperm Capacitation. *Biol Reprod* 2012;**86**:14.

Chen Q, Yan M, Cao Z, Li X, Zhang Y, Shi J, Feng G, Peng H, Zhang X, Zhang Y, *et al.* Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* 2016;**351**:397–400.

Chung J-J, Navarro B, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. A Novel Gene Required for Male Fertility and Functional CATSPER Channel Formation in Spermatozoa. *Nat Commun* 2011;**2**:153.

Chung J-J, Shim S-H, Everley RA, Gygi SP, Zhuang X, Clapham DE. Structurally Distinct Ca2+ Signaling Domains of Sperm Flagella Orchestrate Tyrosine Phosphorylation and Motility. *Cell* 2014;**157**:808–822.

Cooper RA. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct* 1978;**8**:413–430.

Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009;**15**:213–227.

Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998;**59**:7–11.

Dacheux J-L, Gatti JL, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* 2003;**61**:7–17.

Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol Rev* 2011;**91**:1305–1355.

Devaux PF. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry (Mosc)* 1991;**30**:1163–1173.

Ferrieres J. Prévalence des différentes dyslipidémies en France. *Rev Gén Risque Cardiovasc* 2008; [Internet]

Ficarro S, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F, Kalab P, Marto JA, Shabanowitz J, Herr JC, Hunt DF, *et al.* Phosphoproteome Analysis of Capacitated Human Sperm evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J Biol Chem* 2003;**278**:11579–

11589.
Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;**226**:497–509.
Fourgeux C, Martine L, Pasquis B, Maire M-A, Acar N, Creuzot-Garcher C, Bron A, Bretillon L. Steady-state levels of retinal 24S-hydroxycholesterol are maintained by glial cells intervention after elevation of intraocular pressure in the rat. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 2012;**90**:e560-567.
Frenoux J-M, Vernet P, Volle DH, Britan A, Saez F, Kocer A, Henry-Berger J, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro J-MA, Drevet JR. Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J Mol Endocrinol* 2004;**33**:361–375.
Fujimoto T. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* 1993;**120**:1147–1157.
Ghosh B, Li Y, Thayer SA. Inhibition of the Plasma Membrane Ca2+ Pump by CD44 Receptor Activation of Tyrosine Kinases Increases the Action Potential Afterhyperpolarization in Sensory Neurons. *J Neurosci* 2011;**31**:2361–2370.
Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* 2001;**358**:147–155.
Girouard J, Frenette G, Sullivan R. Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 2009;**80**:965–972.
Grandgirard A, Martine L, Joffre C, Juaneda P, Berdeaux O. Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxycholesterol derivatives application to a phytosterol-enriched food. *J Chromatogr A* 2004;**1040**:239–250.
Grandjean V, Fourré S, De Abreu DAF, Derieppe M-A, Remy J-J, Rassoulzadegan M. RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci Rep* 2015;**5**:.
Hinsch KD, Asmarinah null, Hinsch E, Konrad L. VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. *Biochim Biophys Acta* 2001;**1518**:329–333.
Israelson A, Abu-Hamad S, Zaid H, Nahon E, Shoshan-Barmatz V. Localization of the voltage-dependent anion channel-1 Ca2+-binding sites. *Cell Calcium* 2007;**41**:235–244.
Jagan Mohanarao G, Atreja SK. Identification of NO induced and capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa. *Res Vet Sci* 2012;**93**:618–623.
Jaiswal BS, Conti M. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci* 2003;**100**:10676–10681.
Joffres M, Falaschetti E, Gillespie C, Robitaille C, Loustalot F, Poulter N, McAlister FA, Johansen H, Baclic O, Campbell N. Hypertension prevalence, awareness, treatment and control in national surveys from England, the USA and Canada, and correlation with stroke and ischaemic heart disease mortality: a cross-sectional study. *BMJ Open* 2013;**3**:e003423.
Katib A. Mechanisms linking obesity to male infertility. *Cent Eur J Urol* 2015;**68**:79–85.
Kerner J, Lee K, Tandler B, Hoppel CL. VDAC proteomics: post-translation modifications. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1818**:1520–1525.
Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca2+ channel. *Nature* 2006;**439**:737–740.
Kwon W-S, Park Y-J, Mohamed E-SA, Pang M-G. Voltage-dependent anion channels are a key factor of male fertility. *Fertil Steril* 2013;**99**:354–361.
Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**:680–685.
Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung J-J, Clapham DE. The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *Annu Rev Physiol* 2012;**74**:453–475.
Liu B, Wang P, Wang Z, Zhang W. The Use of Anti-VDAC2 Antibody for the Combined Assessment of Human Sperm Acrosome Integrity and Ionophore A23187-Induced Acrosome Reaction. *PLoS ONE* 2011;**6**:.
Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Ferranti S de, Després J-P, Fullerton HJ, Howard VJ, *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update. *Circulation* 2015;**131**:e29–e322.
Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril* 1999;**71**:919–923.
Navarrete FA, García-Vázquez FA, Alvau A, Escoffier J, Krapf D, Sánchez-Cárdenas C, Salicioni AM, Darszon A, Visconti PE. Biphasic Role of Calcium in Mouse Sperm Capacitation Signaling Pathways. *J Cell Physiol* 2015;**230**:1758–1769.
Naz RK. Involvement of protein tyrosine phosphorylation of human sperm in capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding. *Front Biosci J Virtual Libr* 1996;**1**:d206-213.
Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T, *et al.* Targeted Ablation of Plasma Membrane Ca2+-ATPase (PMCA) 1 and 4 Indicates a Major Housekeeping Function for PMCA1 and a Critical Role in Hyperactivated Sperm Motility and Male Fertility for PMCA4. *J Biol Chem* 2004;**279**:33742–33750.
Olkkonen VM, Hynynen R. Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Mol Aspects Med* 2009;**30**:123–133.
Ouvrier A, Alves G, Damon-Soubeyrand C, Marceau G, Cadet R, Janny L, Brugnon F, Kocer A, Pommier A, Lobaccaro J-MA, *et al.* Dietary cholesterol-induced post-testicular infertility. *PloS One* 2011;**6**:e26966.
Ouvrier A, Cadet R, Vernet P, Laillet B, Chardigny J-M, Lobaccaro J-MA, Drevet JR, Saez F. LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. *J Lipid Res* 2009;**50**:1766–1775.
Paradowska A, Bohring C, Krause E, Krause W. Identification of Evolutionary Conserved Mouse Sperm Surface Antigens by Human Antisperm Antibodies (ASA) from Infertile Patients. *Am J Reprod Immunol* 2006;**55**:321–330.
Patel R, Al-Dossary AA, Stabley DL, Barone C, Galileo DS, Strehler EE, Martin-DeLeon PA. Plasma Membrane Ca2+-

ATPase 4 in Murine Epididymis: Secretion of Splice Variants in the Luminal Fluid and a Role in Sperm *Maturation*. *Biol Reprod* 2013;**89**:6.

Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998;**93**:693–704.

Petit FM, Serres C, Bourgeon F, Pineau C, Auer J. Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. *Hum Reprod* 2013;**28**:852–865.

Prasad V, Okunade GW, Miller ML, Shull GE. Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**322**:1192–1203.

Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci* 2007;**104**:1219–1223.

Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:14869–14874.

Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux J -M, Vericel E, Grizard G, Vernet P, Drevet JR. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod* 2006;**74**:1104–1113.

Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001;**413**:603–609.

Roa-Espitia AL, Hernández-Rendón ER, Baltiérrez-Hoyos R, Muñoz-Gotera JR, Cote-Vélez A, Jiménez I, González-Márquez H, Hernández-González EO. Focal adhesion kinase is required for actin polymerization and remodeling of the cytoskeleton during sperm capacitation. *Biol Open* 2016;bio.017558.

Robertson KM, Schuster GU, Steffensen KR, Hovatta O, Meaney S, Hultenby K, Johansson LC, Svechnikov K, Söder O, Gustafsson J-Å. The Liver X Receptor-β Is Essential for Maintaining Cholesterol Homeostasis in the Testis. *Endocrinology* 2005;**146**:2519–2530.

Saez F, Chabory E, Cadet R, Vernet P, Baron S, Lobaccaro J-MA, Drevet JR. Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. *Asian J Androl* 2007;**9**:574–582.

Saez F, Ouvrier A, Drevet JR. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J Androl* 2011;**13**:11–17.

Schein SJ, Colombini M, Finkelstein A. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J Membr Biol* 1976;**30**:99–120.

Schnitzer JE, Oh P, Jacobson BS, Dvorak AM. Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:1759–1763.

Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, Armesilla AL, Emerson M, Oceandy D, Knobeloch K-P, *et al.* Plasma Membrane Ca2+ ATPase 4 Is Required for Sperm Motility and Male Fertility. *J Biol Chem* 2004;**279**:28220–28226.

Seli E, Babayev E, Collins SC, Nemeth G, Horvath TL. Minireview: Metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2014;**28**:790–804.

Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, Belleannee C, Kucukural A, Serra RW, Sun F, *et al.* Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* 2016;**351**:391–396.

Shoshan-Barmatz V, Zakar M, Rosenthal K, Abu-Hamad S. Key regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase. *Biochim Biophys Acta* 2009;**1787**:421–430.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;**150**:76–85.

Strehler EE, Zacharias DA. Role of Alternative Splicing in Generating Isoform Diversity Among Plasma Membrane Calcium Pumps. *Physiol Rev* 2001;**81**:21–50.

Travis AJ, Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 2002;**110**:731–736.

Triphan X, Menzel VA, Petrunkina AM, Cassará MC, Wemheuer W, Hinsch K-D, Hinsch E. Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 2007;**455**:677–686.

Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS. Cholesterol Efflux-mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm β-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* 1999a;**274**:3235–3242.

Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Dev Camb Engl* 1995;**121**:1139–1150.

Visconti PE, Ning X, Fornés MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 1999b;**214**:429–443.

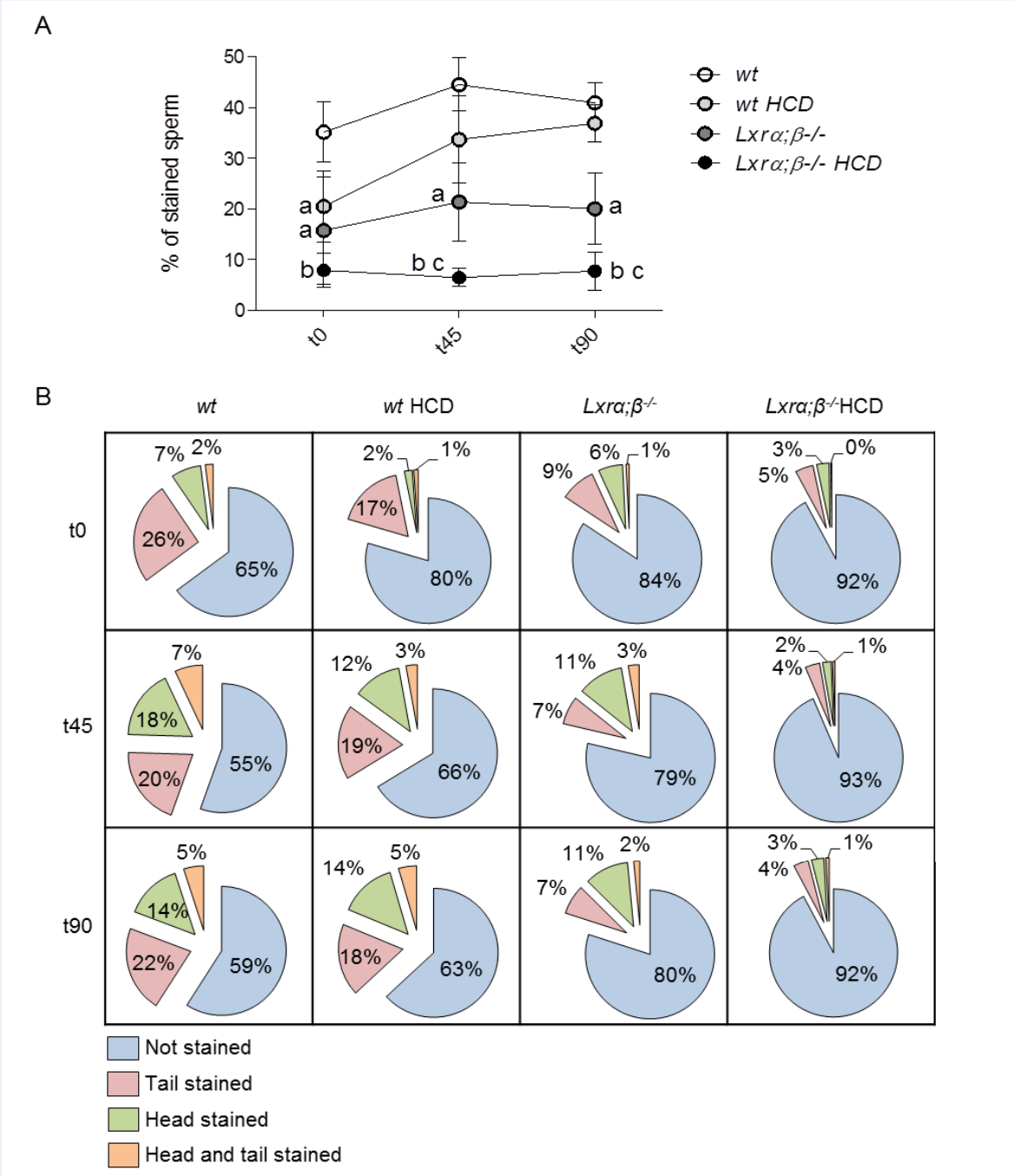
Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Déchelotte P, Sion B, Veyssière G, Benahmed M, Lobaccaro J-MA. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2007;**21**:1014–1027.

Wertheimer E, Krapf D, Vega-Beltran JL de la, Sanchez-Cardenas C, Navarrete F, Haddad D, Escoffier J, Salicioni AM, Levin LR, Buck J, *et al.* Compartmentalization of Distinct cAMP Signaling Pathways in Mammalian Sperm. *J Biol Chem* 2013;**288**:35307–35320.

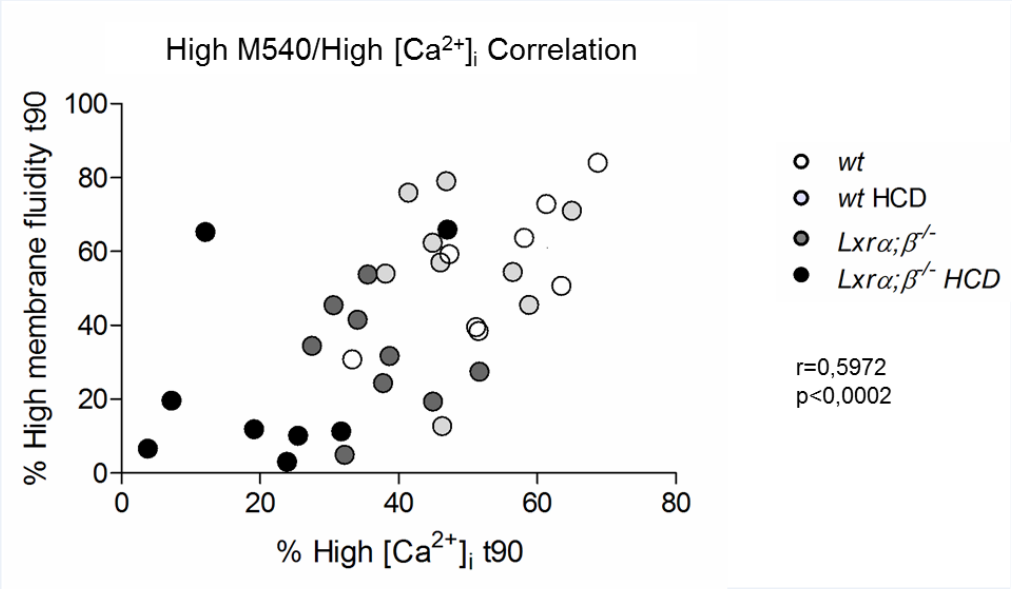
Whitfield M, Ouvrier A, Cadet R, Damon-Soubeyrand C, Guiton R, Janny L, Kocer A, Marceau G, Pons-Rejraji H, Trousson A, *et al.* Liver X Receptors (LXRs) Alpha and Beta Play Distinct Roles in the Mouse Epididymis. *Biol Reprod* 2016;**94**:55–55.

Whitfield M, Pollet-Villard X, Levy R, Drevet JR, Saez F. Posttesticular sperm maturation, infertility, and hyper-

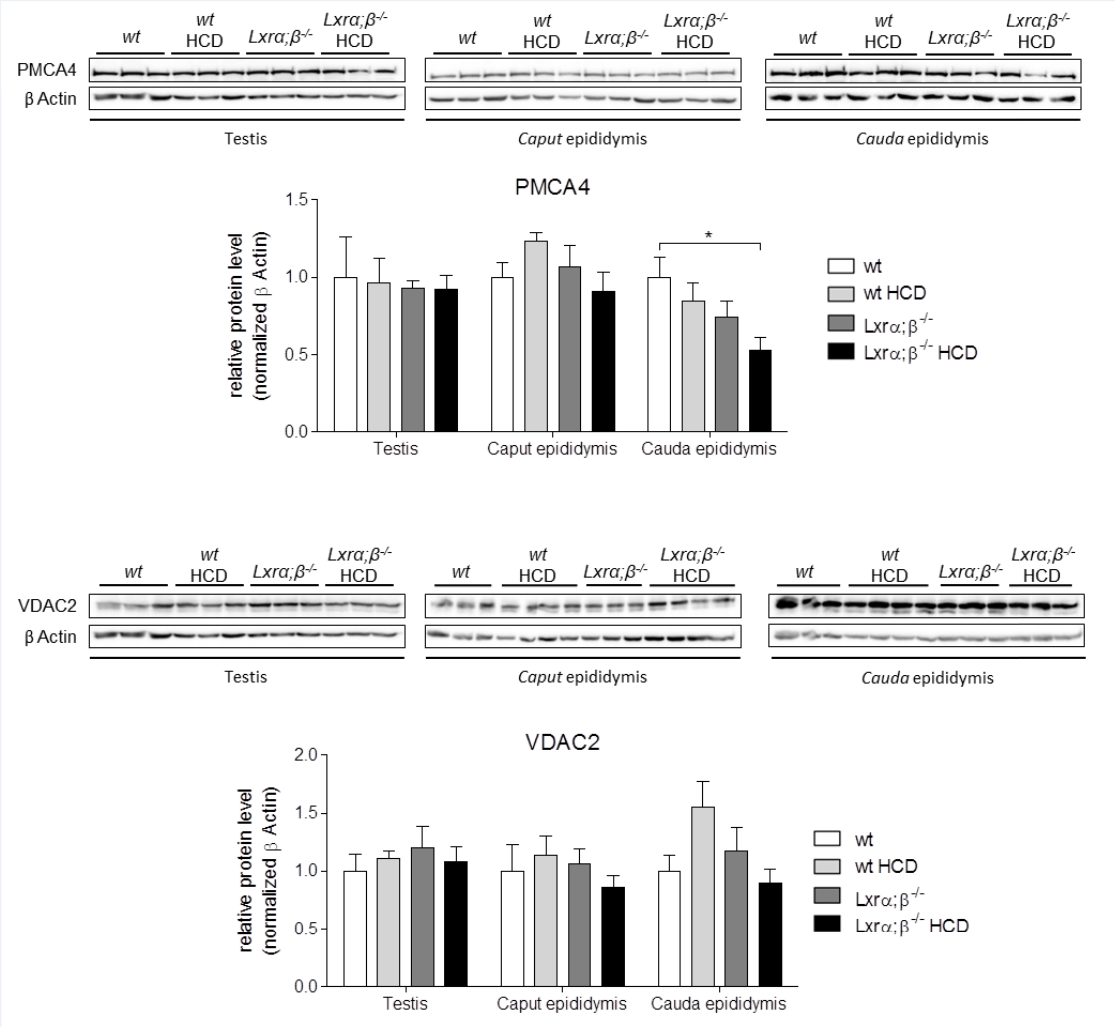
cholesterolemia. *Asian J Androl* 2015;**17**:742–748.
Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A, Horoszewicz K, Bełtowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postępy Hig Med Dośw Online* 2007;**61**:736–759.



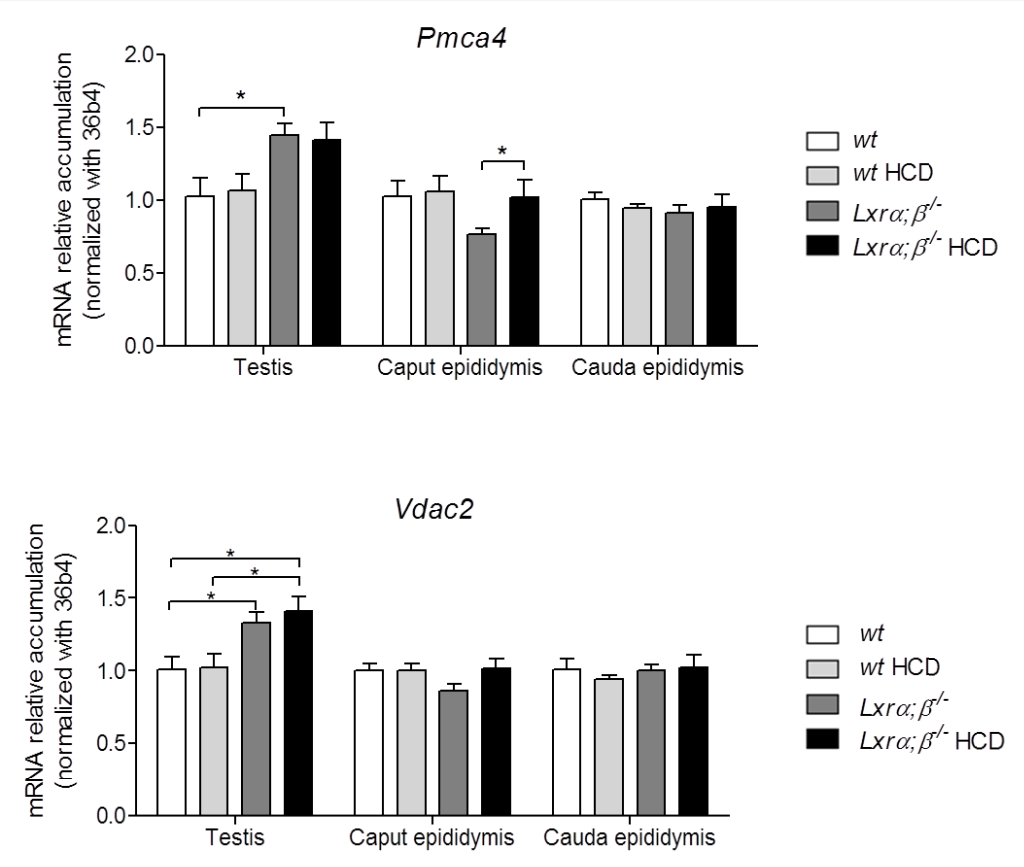

**Supplementary figure 1: Evaluation of the percentage of tyrosine phosphorylated sperm during capacitation.** Sperm from control diet and HCD fed *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ mice were incubated during 0, 45 or 90 minutes in capacitation medium 1 prior tyrosine phosphorylation immunostaining. **(A)** After counting, the percentage of tyrosine phosphorylated sperm was evaluated**.** The points are means ± SEM. **(B)** Representation of subcellular staining distribution (not stained, tail stained, head stained or both) in percentage for each group at each time of capacitation. At least 200 sperm were counted per experiment, n=4, a=p<0.05 *vs wt*, b=p<0.05 *vs wt* HCD, c=p<0.05 *vs Lxrα;β*$^{-/-}$ (Mann Whitney test).




**Supplementary figure 2: Correlation between high membrane fluidity and high intracellular calcium concentration sperm subpopulations at the end of capacitation (t90).** Percentages of spermatozoa with high membrane fluidity were plotted against percentages of spermatozoa with high $[Ca^{2+}]_i$ at t=90 min of capacitation. Spearman correlation was used to examine the association between these two subpopulations. r = 0.5972, p<0.0002 (***), significance was determined at a confidence level of 95%.




**Supplementary figure 3: PMCA4 and VDAC2 protein levels in testis, *caput* and *cauda* epididymis.** Testis, *caput* and *cauda* epididymis total protein extracts from control diet-and HCD-fed *wt* and *Lxrα;β*$^{-/-}$ mice were analyzed by western blot with anti-PMCA4 (upper panel) or anti-VDAC2 (lower panel) antibodies. Beta -actin was used as loading control for quantification. Bar graphs display means ± SEM, n= 5 *wt*, 5 *wt* HCD, 6 *Lxrα;β*$^{-/-}$, 6 *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD, *p<0.05 between compared groups (Mann Whitney test).




**Supplementary figure 4: Expression levels of *Pmca4* and *Vdac2* in testis, *caput* and *cauda* epididymis.** Relative gene expression levels (compared to *wt*) of *Pmca4* and *Vdac2* were measured by quantitative real-time PCR. The relative accumulation level of each mRNA was normalized using *36b4* mRNA as a standard. Data are means ± SEM, n= 4 *wt*, 4 *wt* HCD, 5 *Lxrα;β*$^{-/-}$, 5 *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD, *$p<0.05$ between compared groups (Mann Whitney test).

# *Discussion & Perspectives*

Les différents travaux conduits sur les LXRs et leurs effets sur la fertilité ont mis en évidence l'importance de ces facteurs de transcription, que ce soit au niveau testiculaire ou épididymaire. Les recherches menées sur le testicule et l'apport des modèles SKO révèlent des fonctions redondantes de chacune des isoformes mais également des fonctions particulières. Les études sur l'épididyme n'avaient pas permis de révéler de différence phénotypique entre les animaux invalidés pour l'une des isoformes des LXRs.

La première partie de mon travail de thèse a ainsi consisté en l'étude du phénotype épididymaire des souris mâles *Lxrα*$^{-/-}$ et *Lxrβ*$^{-/-}$ et a conduit aux observations suivantes :

- Les souris *Lxrα*$^{-/-}$ et *Lxrβ*$^{-/-}$ sont dyslipidémiques avec une augmentation des LDL plasmatiques.
- L'isoforme bêta est spécifiquement impliquée dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et des acides gras dans la tête de l'épididyme. Son invalidation conduit à une diminution de l'expression d'*Abca1*, *Abcg1*, *Idol*, *Hmgcr*, *Srebf1* et *Fasn* dans la tête de l'épididyme.
- Les données précédentes sont corrélées, chez le *Lxrβ*$^{-/-}$, à de fortes accumulations lipidiques intra-épithéliales, traversant parfois tout l'épithélium sous une forme pyramidale. Les accumulations lipidiques sont plus discrètes chez le *Lxrα*$^{-/-}$ et principalement péri-tubulaires ou à la base de l'épithélium.
- Un statut inflammatoire est présent dans les deux génotypes, comme démontré par l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires.
- L'isoforme alpha semble particulièrement impliquée dans le maintien de la stabilité de l'épithélium épididymaire. Son invalidation conduit chez les souris âgées, à la formation importante de « néotubules » évoluant parfois vers un phénotype proche de celui des DKO (amincissement de l'épithélium, élargissement des tubules).

- Dans les deux génotypes une diminution de la fertilité est mise en évidence, caractérisée par une diminution du nombre de femelles ayant une portée ainsi que du nombre de petits par portée.

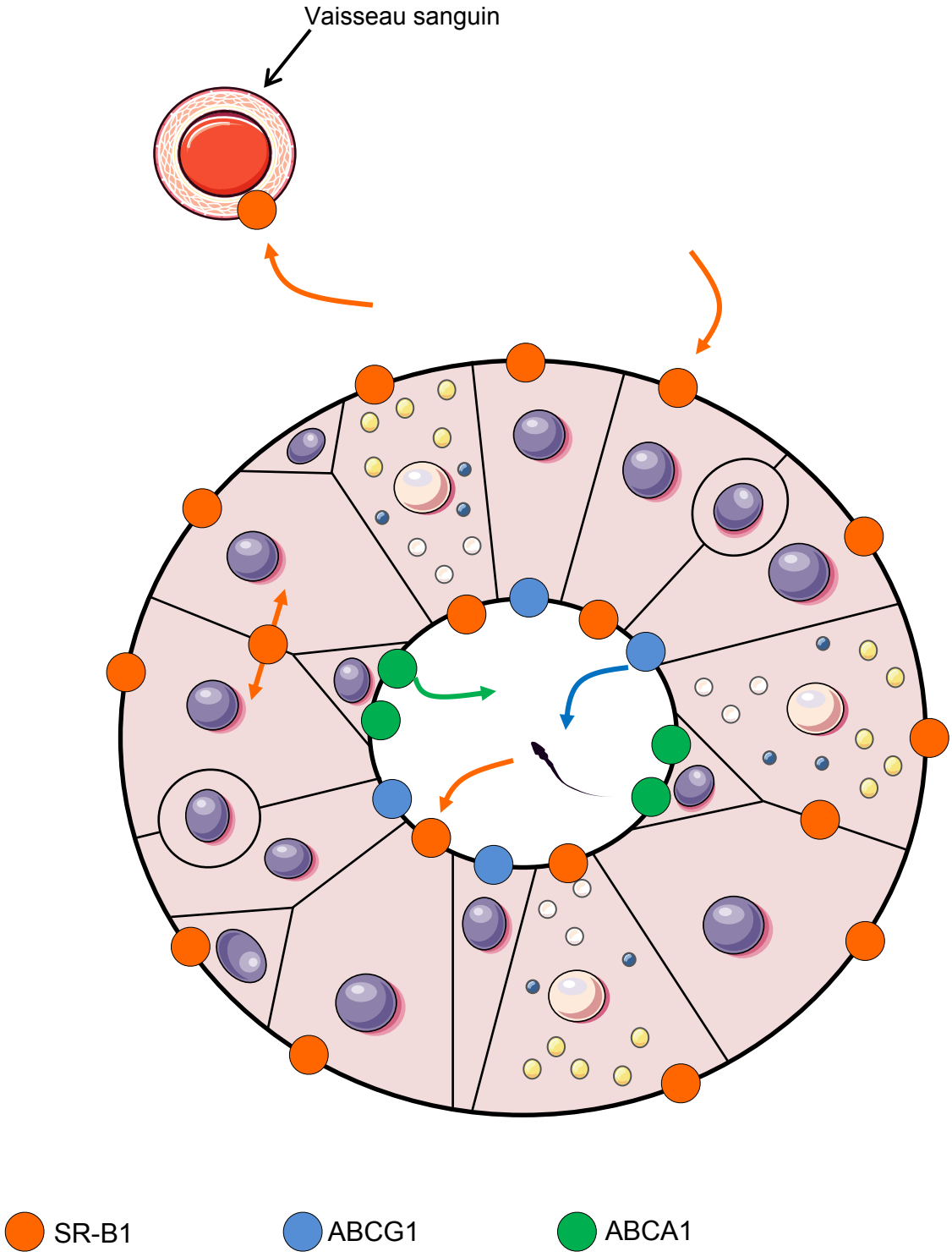
**Cette étude permet de démontrer que, comme dans le testicule, les isoformes des LXRs possèdent à la fois des rôles spécifiques mais également des rôles redondants dans l'épididyme.** En effet aucun des SKO n'affiche un phénotype identique à celui du DKO et le phénotype des SKO est beaucoup moins marqué. L'isoforme bêta est particulièrement impliquée dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol épididymaire tandis que l'isoforme alpha semble intervenir dans le maintien de l'épithélium. De plus, alors que dans les 2 génotypes SKO un statut inflammatoire est présent, les cytokines impliquées ne sont pas les mêmes, IL-1β étant spécifiquement augmentée chez le *Lxrα*$^{-/-}$ et IL-6 chez le *Lxrβ*$^{-/-}$. Les deux isoformes des LXRs semblent donc jouer un rôle immunitaire dans l'épididyme mais n'agissent pas forcément par les mêmes voies.

Le phénotype décrit semble avoir un impact sur la fertilité, ce qui est mis en évidence par une diminution du nombre de petits par portée. D'autres études montraient des résultats différents puisqu'aucune altération de la fertilité n'avait été mise en évidence chez les SKO (Robertson et al., 2005; Volle et al., 2007). Cependant, dans ces études, les femelles utilisées pour les tests de fertilité étaient du même génotype que les mâles ou de la souche sauvage correspondante. Nous avons choisi d'utiliser des femelles de souche CD-1 réputées pour être de bonnes reproductrices. Ainsi les tests de fertilité ne reflètent que le versant mâle et permettent de mettre en évidence des altérations discrètes de fertilité. Le nombre de spermatozoïdes augmente dans le SKO alpha et diminue légèrement dans le SKO bêta, en accord avec les perturbations testiculaires mises en évidence dans ce génotype (Volle et al., 2007). L'augmentation du nombre de gamètes cassés après transit épididymaire chez *Lxrβ*$^{-/-}$ témoigne d'une altération au cours du transit épididymaire. Un phénotype similaire a été observé chez les souris invalidées pour *Dicer1* dans l'épididyme (Björkgren et al., 2015). Chez ces souris l'homéostasie lipidique est également

perturbée dans l'épididyme et conduit à une altération de la composition lipidique des gamètes. Un défaut de maturation lipidique des gamètes lors du transit épididymaire pourrait donc être relié à l'augmentation et/ou au défaut d'élimination des spermatozoïdes cassés. Il est également possible que le système d'épuration soit « débordé » si la quantité de gamètes défectueux est trop importante. En revanche le nombre de gamètes décapités diminue chez le *Lxra*$^{-/-}$, démontrant que le « contrôle qualité » des gamètes est en partie fonctionnel.

L'origine de l'augmentation des « néo-tubules » dans le SKO alpha n'a pu être mise en évidence. La prolifération ou l'apoptose ne sont pas en cause dans ce phénotype. Un phénotype similaire a été observé chez les souris invalidées pour *Pten* dans la tête de l'épididyme (Xu et al., 2014). Dans ce modèle, l'activation de la voie AKT (ou PKB, Protéine Kinase B) semblait en cause mais aucune perturbation de cette dernière n'a pu être mise en évidence dans le modèle *Lxra*$^{-/-}$. L'origine de ces « néo-tubules » reste donc inexpliquée.

Ces recherches ont permis de faire progresser les connaissances concernant le rôle des LXRs dans l'épididyme. Cependant plusieurs interrogations restent en suspens. Les différences phénotypiques observées pourraient suggérer une différence de localisation des LXRs dans l'organe. Cette question n'a pu être traitée compte tenu de l'absence d'anticorps capables de distinguer les deux isoformes des LXRs chez la souris et de l'échec des expériences d'hybridation *in situ* mises en œuvre. Cette question a pu être adressée dans le testicule puisque les types cellulaires qui le composent (Sertoli, Leydig, germinales) sont très différents et peuvent facilement être isolés. Ceci permet, par une simple analyse des transcrits, de savoir quelle isoforme des LXRs est exprimée dans chaque type cellulaire. Une telle technique serait difficile à mettre en place dans l'épididyme compte tenu du nombre important de types cellulaires et du manque d'outils moléculaires permettant de les distinguer. **L'utilisation de lignées murines rapportrices pour les LXRs pourraient répondre à cette question. En effet des souris exprimant la GFP sous contrôle du promoteur de chacune des isoformes des LXRs pourraient être générer.**




**<u>Figure 58</u> : Modélisation des flux lipidiques dans l'épididyme murin.**

ABCA1 est principalement retrouvé au pôle apical des cellules apicales dans les segments proximaux de la tête de l'épididyme. ABCAG1 est retrouvé au niveau apical et basal de l'épithélium. SR-B1 est localisé à la base de l'épithélium, au niveau de l'endothélium et entre les cellules épithéliales. Les flèches représentent les flux probables de lipides. ABCA1/G1 : ATP binding cassette A1/G1, SR-B1 : Scavenger receptor class B1. D'après *Ouvrier et al., 2009*.

Les différentes localisations des accumulations lipidiques mises en évidence dans cet article, ainsi que les localisations particulières des transporteurs lipidiques démontrées précédemment (Ouvrier et al., 2009) font ressortir la complexité des flux de cholestérol dans l'épididyme (**Figure 58**). Comme nous l'avons détaillé en introduction, l'épididyme est le siège des modifications lipidiques du gamète mâle, il est donc primordial que ces flux lipidiques soient finement contrôlés pour garantir une maturation spermatique correcte. Afin de mieux comprendre ces flux, il serait intéressant de poursuivre les investigations concernant la localisation des différents transporteurs lipidiques. Cependant, les études immunohistologiques ne donnent qu'une information « statique » et ne permettent pas de comprendre réellement dans quel sens se font ces flux. **L'étude *in vivo* semble indispensable pour apporter des réponses à ce sujet, en injectant par exemple des lipoprotéines marquées dans la circulation sanguine, comme cela a été réalisé dans la rétine de rat** (Tserentsoodol et al., 2006).

La seconde partie du projet de thèse a consisté en l'étude du modèle murin invalidé pour les deux isoformes des LXRs et soumis à un régime riche en cholestérol. Les travaux antérieurs de l'équipe ont montré que l'hypercholestérolémie chez les *Lxra;β*$^{-/-}$ jeunes déclenche prématurément le phénotype épididymaire. Ce phénotype s'accompagne d'une infertilité totale et d'altérations spermatiques (baisse de mobilité, augmentation des réactions acrosomiques spontanées, augmentation des gamètes décapités - (Ouvrier et al., 2011). L'objectif était alors d'identifier précisément l'origine de cette infertilité. Compte tenu des fortes altérations épididymaires, en particulier en termes d'accumulations lipidiques, les recherches se sont orientées vers un défaut de maturation épididymaire pouvant lui-même être à l'origine d'un défaut de capacitation. Les expérimentations menées sur les spermatozoïdes des mâles *Lxra,β*$^{-/-}$-HCD ont conduit aux observations suivantes :

- Une augmentation des ratios Chol/PL et PE/PC et une diminution des oxystérols dans les spermatozoïdes de queues d'épididymes.

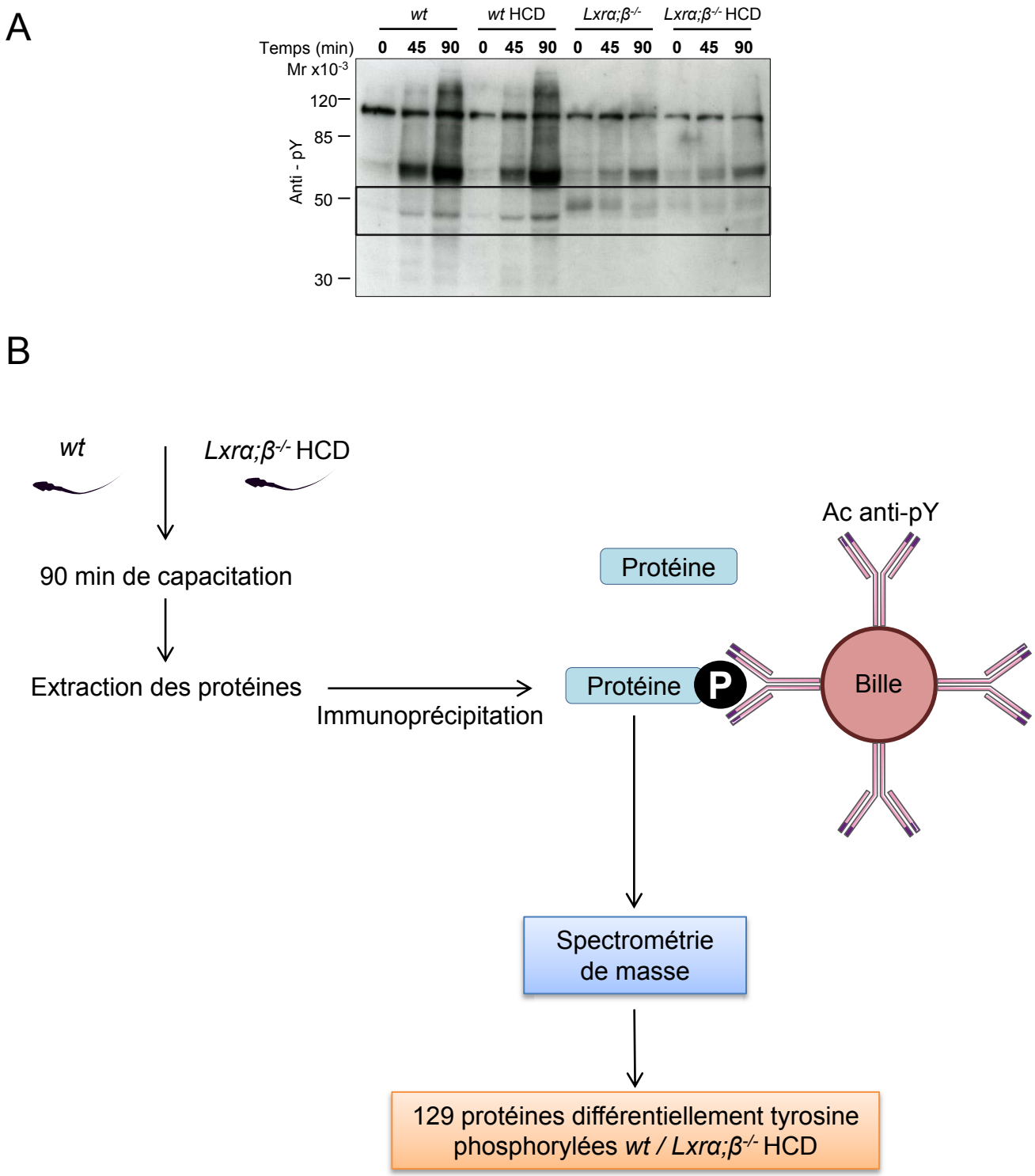
- Une altération de la capacitation qui est partiellement compensée lorsque l'efflux de cholestérol est favorisé, mettant en évidence un défaut des évènements membranaires de la capacitation.
- Une altération de la fluidité membranaire et des flux calciques au cours de la capacitation.
- Une altération de la tyrosine phosphorylation de VDAC2 au cours de la capacitation.
- Une diminution de la quantité de la protéine PMCA4 sur le spermatozoïde associée à sa diminution dans les épididymosomes.

**Cet article a permis de mettre en évidence que la maturation épididymaire est altérée dans ce modèle, tant au niveau lipidique que protéique.** Afin de confirmer l'origine épididymaire des modifications lipidiques mises en évidence, il serait intéressant de doser les différentes classes de lipides dans des spermatozoïdes issus de la tête de l'épididyme. De tels dosages seront difficiles à mettre en œuvre car ils nécessitent un nombre suffisant de gamètes. Malheureusement, le nombre de spermatozoïdes récupérés en tête d'épididyme est souvent faible et présente une contamination importante par les cellules épithéliales. La diminution de PMCA4 au niveau des spermatozoïdes reflète clairement une altération de son acquisition durant le transit épididymaire. Cependant l'origine de ce problème est pour l'instant inconnue. Une légère baisse de PMCA4 a été mise en évidence dans les épididymosomes, suggérant une altération de la formation de ces vésicules lipidiques. Cependant, comme nous l'avons précisé en introduction, les compositions lipidiques des épididymosomes et des spermatozoïdes doivent être adéquates pour permettre le transfert régionalisé de protéines au cours du transit. Les altérations lipidiques tissulaires pourraient entraîner la production d'épididymosomes à la composition lipidique défectueuse, perturbant le transfert de protéines. Dans le même ordre d'idée, une membrane spermatique trop rigide ou de composition anormale pourrait avoir un effet similaire. **Afin de clarifier ces points il serait important de déterminer la composition lipidique des épididymosomes dans le modèle *Lxrα,β*$^{-/-}$-HCD et d'étudier leur aspect en microscopie électronique à transmission (MET) afin de mettre en évidence une possible altération de**

**leur structure (taille, forme...). Nous pourrions également déterminer la composition lipidique des différentes régions rafts des spermatozoïdes et réaliser des marquages avec la CTB (*cholera toxin B subunit*) afin d'étudier leur répartition sur le gamète. Ces expérimentations pourraient permettre de mieux comprendre l'origine du défaut d'acquisition de protéines épididymaires.**

Ces défauts de maturation épididymaire entraînent une rigidification de la membrane délétère pour la capacitation. De plus le défaut d'acquisition de protéines comme PMCA4 altère la régulation des flux calciques au cours de la capacitation. L'importance de la régulation de ces flux a été détaillée en introduction. Ainsi, les dérégulations mises en évidence dans notre modèle doivent compromettre l'aptitude des gamètes à réaliser une capacitation correcte. Le modèle *Lxra,*$\beta^{-/-}$-HCD est une parfaite illustration de l'importance de la maturation épididymaire pour la capacitation et donc pour la fertilité au sens large. **La capacitation étant un prérequis à l'HAF, à la réaction acrosomique et à la fécondation, l'étude de ces différents paramètres dans le modèle *Lxrα,*$\beta^{-/-}$-HCD pourrait être intéressante.** Une altération de l'HAF, ou plus largement de la mobilité, pourrait être à l'origine de l'infertilité, puisque cela compromettrait la remontée des gamètes dans le tractus génital femelle et la pénétration de la zone pellucide. L'analyse de la mobilité spermatique avant et après capacitation par CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), fournirait des indications précieuses. Enfin, l'analyse en fécondation *in vitro* sur ovocytes avec ou sans cumulus et zone pellucide permettrait également de préciser à quelle étape la fécondation est compromise.

Les expérimentations réalisées indiquent aussi que la tyrosine phosphorylation de VDAC2 est altérée dans le modèle *Lxra,*$\beta^{-/-}$-HCD. En effet, VDAC2 a tendance à être plus tyrosine phosphorylé chez les *Lxra,*$\beta^{-/-}$-HCD mais sa tyrosine phosphorylation augmente moins au cours de la capacitation que chez les sauvages. La tyrosine phosphorylation de VDAC2 au cours de la




**<u>Figure 59</u> : Altération de la tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation.**

A- Le profil de tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation est altéré chez les souris *Lxrα;β*$^{-/-}$ (encadré noir). B- Protocole d'immunoprécipitation des phosphotyrosines. Après 90 minutes de capacitation les protéines des spermatozoïdes des souris *wt* et *Lxrα;β*$^{-/-}$ HCD sont extraites. Une immunoprécipitation est réalisée à l'aide de billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-phosphotyrosines. Les protéines tyrosine phosphorylées sont alors identifiées par spectrométrie de masse quantitative. wt : wild type, HCD : High Cholesterol Diet, pY : phosphotyrosine, Ac : anticorps, P : phosphorylation.

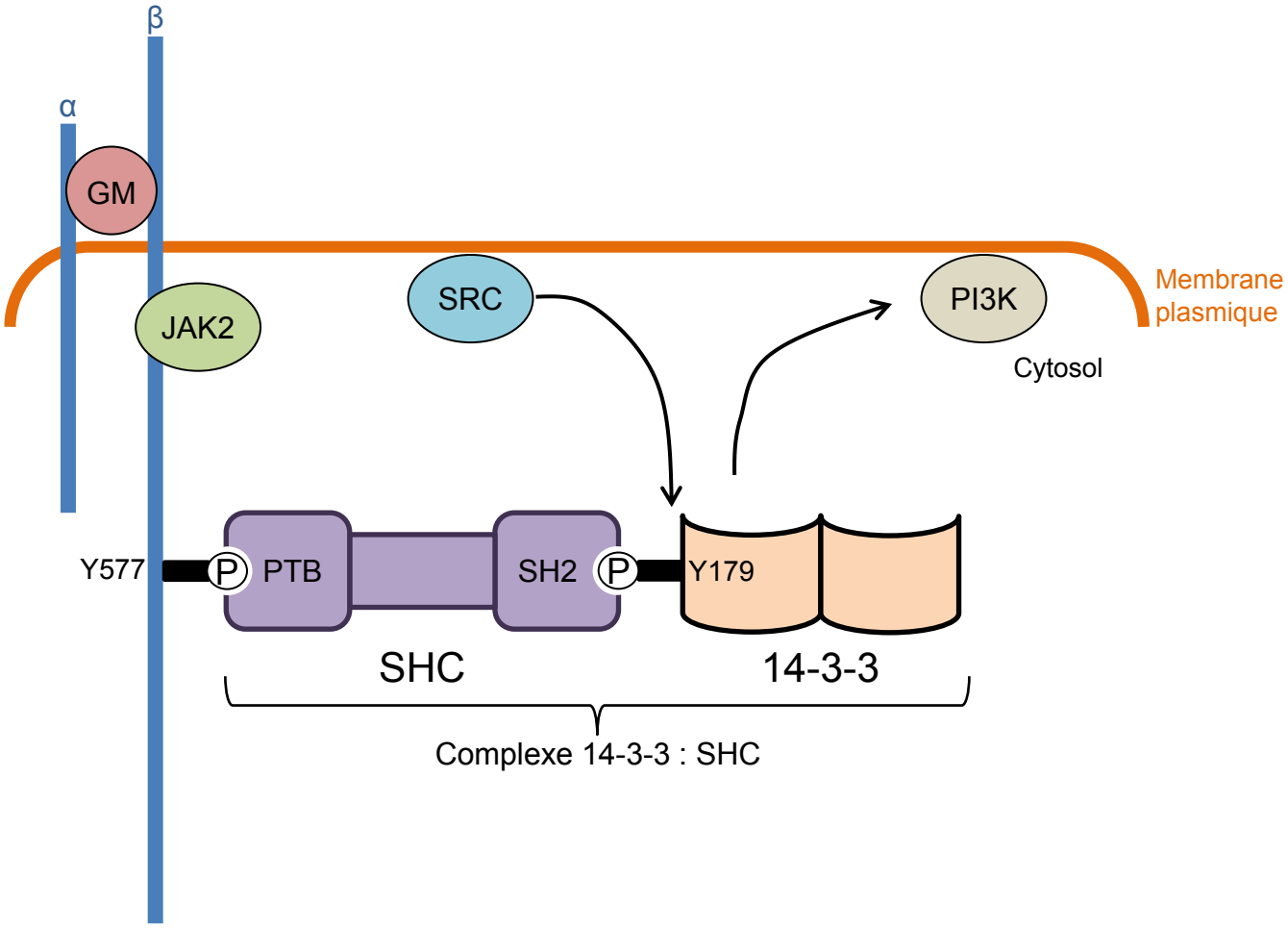
capacitation est bien décrite dans la littérature (Arcelay et al., 2008; Ficarro et al., 2003; Jagan Mohanarao and Atreja, 2012), bien que son impact sur sa fonction ou son activité ne soit pas connu. Ce résultat met cependant en évidence que l'altération de la capacitation dans notre modèle ne peut simplement être résumée à une diminution de la tyrosine phosphorylation. En effet, si l'on regarde attentivement les western blots anti-phosphotyrosine on remarque qu'au-delà de la baisse globale des niveaux de phosphorylation, le profil de protéines tyrosine phosphorylées est différent (**Figure 59 A**). **Ceci implique qu'en plus de présenter une tyrosine phosphorylation globalement moindre, l'identité même des protéines tyrosine phosphorylées au cours de la capacitation chez les spermatozoïdes des mâles *Lxrα,β*$^{-/-}$-HCD est altérée.** Pour mieux appréhender ces différences une analyse protéomique a été réalisée. Après capacitation, les protéines tyrosine phosphorylées ont été immunoprécipitées puis identifiées par spectrométrie de masse quantitative chez les sauvages contrôles (n=3) et les *Lxra,β*$^{-/-}$-HCD (n=5 - **Figure 59 B**). Les résultats de cette analyse sont intéressants à deux niveaux. Tout d'abord cette expérimentation a fourni une liste exhaustive des protéines tyrosine phosphorylées en fin de capacitation chez les sauvages. En effet, les études publiées jusque-là se basaient sur des analyses de gels d'électrophorèse bidimensionnelle. Cette technique fastidieuse et imprécise ne permettait pas d'identifier un nombre de protéine aussi important qu'avec la spectrométrie de masse. **Notre analyse présente donc un intérêt dans le domaine de la recherche fondamentale puisque 302 protéines ont été identifiées comme étant tyrosine phosphorylées après capacitation.** Cette étude pourrait faire progresser les connaissances concernant l'identité et le rôle des protéines tyrosine phosphorylées après capacitation.

De plus cette analyse protéomique revêt un intérêt particulier dans l'étude du lien entre dyslipidémie et infertilité puisque 129 protéines parmi ces 302, présentent une différence quantitative de tyrosine phosphorylation ($p<0,09$) entre les spermatozoïdes des souris sauvages et ceux des souris *Lxra;β*$^{-/-}$-HCD ont été identifiées. Parmi ces 129 protéines, les protéines VDAC2 et PMCA4 étudiées dans le deuxième article sont retrouvées. Dans l'analyse protéomique

VDAC2 est retrouvée 2,13 fois plus tyrosine phosphorylée chez les *Lxra,β*$^{/-}$-HCD après capacitation (p=0,0132). Cette augmentation de la tyrosine phosphorylation de VDAC2 a été confirmée par les expériences d'immunoprécipitation présentées dans le deuxième article. Cependant l'étude protéomique étant réalisée uniquement en fin de capacitation, l'augmentation de la tyrosine phosphorylation de VDAC2 chez les *Lxra,β*$^{/-}$-HCD avant capacitation n'avait pas été mise en évidence. La protéine PMCA4 est retrouvée 1,25 fois plus tyrosine phosphorylée chez les sauvages contrôles après capacitation dans l'étude protéomique (p=0,07). Les différentes expérimentations menées dans l'article 2 montrent que cette différence de tyrosine phosphorylation de PMCA4 n'est que le reflet d'une diminution de la quantité de protéine totale PMCA4 dans les spermatozoïdes chez les *Lxra,β*$^{/-}$-HCD. En effet, bien que PMCA4 soit tyrosine phosphorylée à l'état basal, cette tyrosine phosphorylation n'évolue pas au cours de la capacitation. Ces résultats mettent en évidence deux aspects qui nécessitent de considérer avec prudence les résultats de l'analyse protéomique :

- L'analyse en spectrométrie de masse a uniquement été réalisée sur les protéines tyrosine phosphorylées après capacitation. Elle ne permet donc pas d'évaluer la dynamique de tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation.
- L'analyse en spectrométrie de masse ne mesure que la fraction tyrosine phosphorylée d'une protéine. Ainsi, si une protéine est présente en moindre quantité sa forme tyrosine phosphorylée le sera également. Cependant une diminution de la tyrosine phosphorylation de cette protéine ne pourra être conclue puisque cette diminution ne sera que le reflet de la diminution de quantité de la protéine totale. Ce cas de figure est celui rencontré pour PMCA4.

**Afin de pallier à ces deux défauts, il serait judicieux de réaliser une analyse protéomique des protéines tyrosine phosphorylées immunoprécipitées avant et après capacitation. De plus, une analyse comparative en protéomique des protéines spermatiques totales entre les conditions sauvage contrôle et *Lxrα,β*$^{/-}$-HCD permettrait**

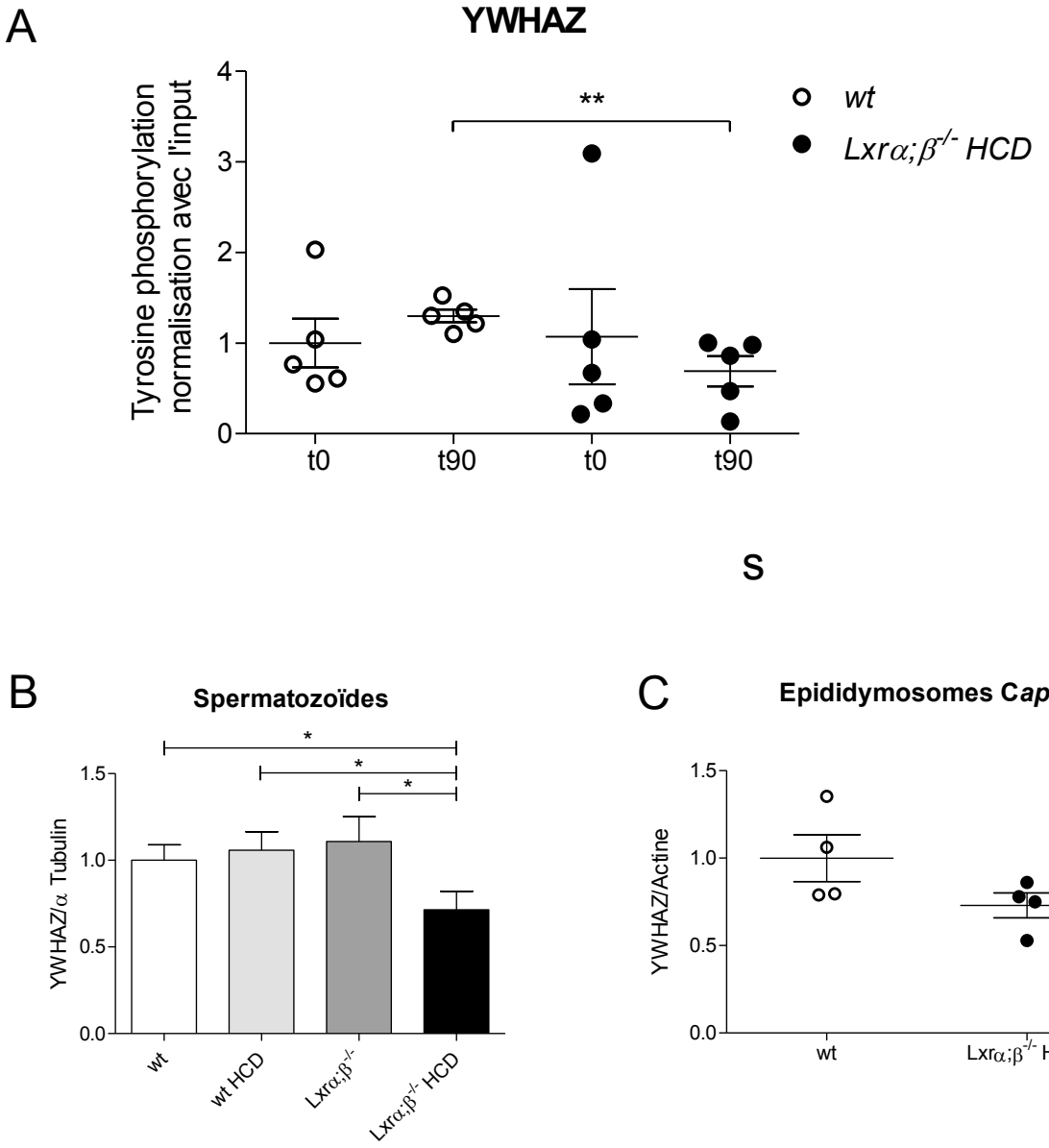



**<u>Figure 60</u> : Modèle d'assemblage du complexe 14-3-3 : SHC.**

La stimulation du récepteur GM-CSF entraîne l'activation des tyrosine kinases JAK2 et SRC. JAK phosphoryle la tyrosine 577 du récepteur tandis que SRC phosphoryle la tyrosine 179 de 14-3-3ζ. La phosphorylation de 14-3-3ζ produit un site compétent pour l'amarrage du domaine SH2 de SHC. Le complexe 14-3-3 : SHC peut alors lier la tyrosine 577 de la sous-unité β du récepteur ce qui permet l'activation de la voie PI3K/AKT. D'après *Barry et al., 2009*. GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, JAK2 : Janus Kinase 2, SRC : Sarcoma, SH2 : Src Homology 2, SHC : Src Homology 2 domain Containing, PTB : Phospho Tyrosine Binding, PI3K : PhosphoInositide 3 Kinase, P : phosphorylation.

**de mettre en évidence des variations d'accumulation de certaines protéines. Ces données seraient particulièrement pertinentes compte tenu des défauts d'acquisition de protéines épididymaires qui ont été décrites et pourraient être couplées à une étude protéomique sur les épididymosomes**.

L'analyse bioinformatique complète des données de protéomique déjà générées est actuellement en cours. Certaines protéines ont cependant attiré notre attention et notamment YWHAZ (*Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta* ou 14-3-3 ζ). Cette protéine appartient à la famille de chaperonnes 14-3-3 qui compte 7 membres codés par des gènes distincts (β, γ, ε, σ, ζ, τ et η). Ces protéines agissent en homo ou hétérodimère et peuvent lier une variété importante de protéines possédant des motifs spécifiques sérine ou thréonine phosphorylés. Les fonctions des 14-3-3 sont variées puisque leur liaison aux protéines cibles peut conduire à moduler l'activité enzymatique de ces dernières, à modifier leur localisation cellulaire, à prévenir leur déphosphorylation, à promouvoir leur stabilité protéique mais également à inhiber ou permettre leurs interactions avec d'autres protéines (Dougherty and Morrison, 2004). Les 14-3-3 forment donc de véritables « échafaud » puisqu'elles sont capables de mettre en relation des partenaires, comme des kinases et leurs substrats. Peu de données sont disponibles concernant la présence et le rôle des 14-3-3 dans le spermatozoïde. Une étude sur spermatozoïdes bovins a néanmoins démontré que 14-3-3 était capable de lier la phosphatase PP1γ2 lorsqu'elle était phosphorylée (Huang et al., 2004). La phosphorylation de PP1γ2 inhibe son activité catalytique (Dohadwala et al., 1994; Kwon et al., 1997) et dans le spermatozoïde, cette inhibition est requise pour l'acquisition de la mobilité et la capacitation. Les auteurs émettent l'hypothèse que la fixation de PP1γ2 aux protéines 14-3-3 pourrait réguler son activité catalytique, sa phosphorylation ou son interaction avec d'autres protéines (Chakrabarti et al., 2007). **De ce fait les protéines 14-3-3 pourraient être impliquées dans la régulation de la mobilité et de la capacitation en régulant notamment l'activité de PP1γ2.** Cette dernière fait effectivement partie des protéines identifiées dans notre analyse protéomique (1,33 fois plus tyrosine




**<u>Figure 61</u> : Analyse de YWHAZ dans le modèle *Lxrα;β-/-* HCD.**

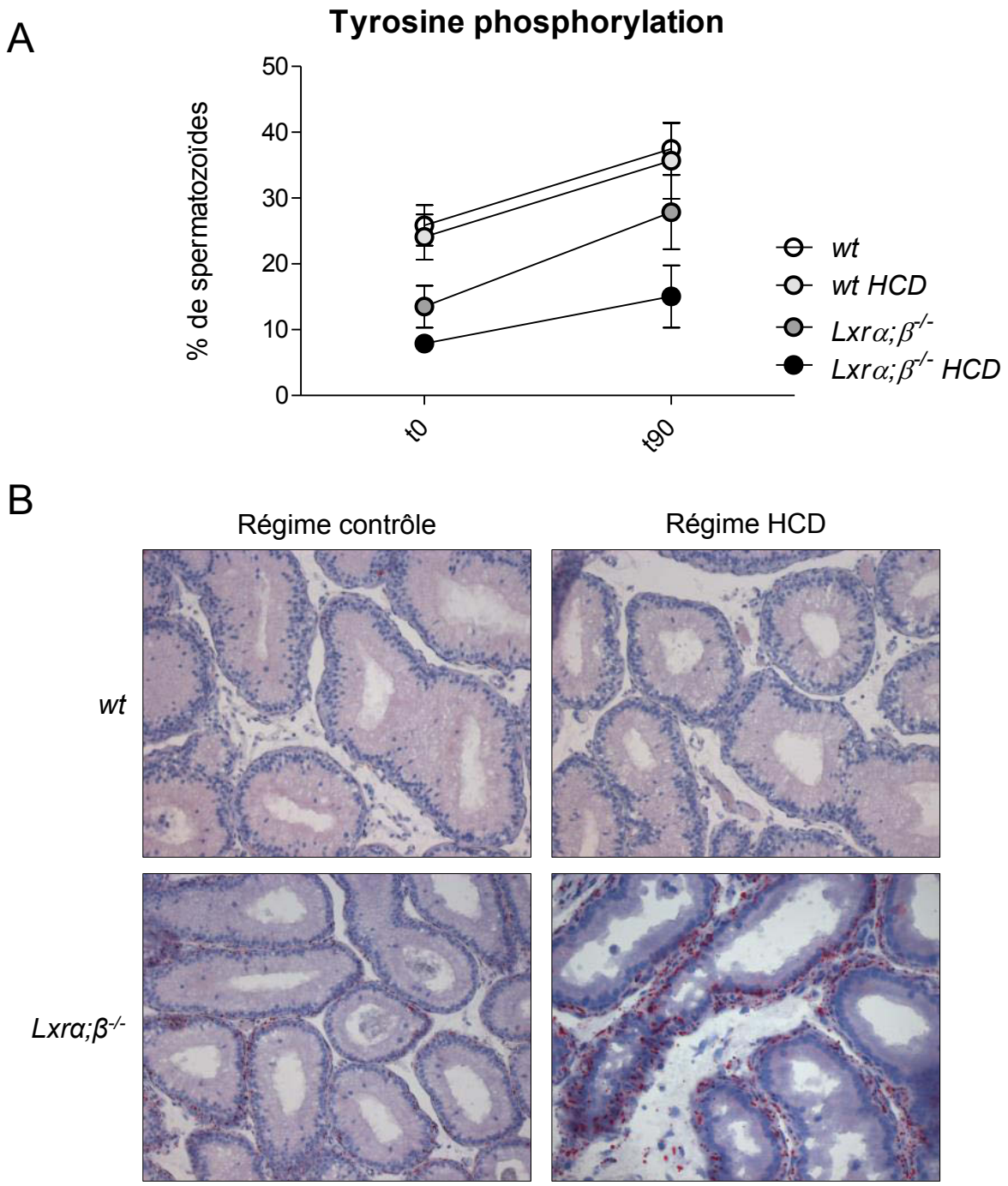
A- Les protéines des spermatozoïdes des souris sauvages et *Lxrα;β-/-* HCD sont extraites avant et après 90 minutes de capacitation. Les tyrosines phosphorylées sont ensuite immunoprécipitées et un western-blot dirigé contre YWHAZ est réalisé. L'intensité des bandes est quantifiée puis normalisée sur l'input. La barre horizontale représente la moyenne ± SEM. B- Quantité relative de YWHAZ dans les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme évaluée par western-blot. L'α-tubuline est utilisée comme contrôle de la quantité de protéines pour la quantification. Les histogrammes représentent la moyenne ± SEM (n=10 *wt*, 13 *wt* HCD, 11 *Lxrα;β-/-*, 16 *Lxrα;β-/-* HCD). C- Quantité relative de protéine YWHAZ dans les épididymosomes de queue d'épididyme de souris *wt* et *Lxrα;β-/-* HCD. L'actine est utilisée comme contrôle de la quantité de protéines pour quantification. La barre horizontale représente la moyenne ± SEM. Pour chaque point, 6 souris sont utilisées.

phosphorylée chez les *Lxra,β*$^{-/-}$-HCD). Plus de 100 protéines ont été décrites comme pouvant être partenaires des 14-3-3 dans les cellules somatiques, de nombreuses autres protéines partenaires pourraient donc être présentes dans le spermatozoïde (Jin et al., 2004). De plus une étude en culture cellulaire a démontré que YWHAZ était tyrosine phosphorylée en position 179. Cette tyrosine phosphorylation de YWHAZ permet la liaison de la protéine SHC (*Src Homology 2 domain Containing*) *via* son domaine SH2 (*Src Homology 2*, domaine capable de lier des tyrosine phosphorylées - **Figure 60**). L'assemblage YWHAZ-SH2 est alors requis pour le recrutement du complexe de signalisation PI3K (Barry et al., 2009). **Le fait de pouvoir lier à la fois des protéines sérine-thréonine phosphorylées et des domaines SH2 suggère que les 14-3-3 pourraient être à l'interface entre les voies de signalisation impliquant la phosphorylation des sérines-thréonines d'un côté et des tyrosines de l'autre. Un tel rôle pourrait être extrêmement approprié au cours de la capacitation.** De plus YWHAZ semble être tyrosine phosphorylée par SRC, une kinase déjà connue pour jouer un rôle au cours de la capacitation. Enfin une étude protéomique a mis en évidence la présence de YWHAZ sur les épididymosomes humains (Thimon et al., 2008), ce qui en fait une protéine de grand intérêt dans notre modèle.

Dans notre étude protéomique, la protéine YWHAZ tyrosine phosphorylée est retrouvée 1,22 fois plus chez les sauvages comparés aux *Lxra,β*$^{-/-}$-HCD ($p=0.07$). Nos résultats préliminaires permettent de montrer que la tyrosine phosphorylation de YWHAZ augmente au cours de la capacitation chez les sauvages et qu'en fin de capacitation elle est significativement plus faible chez le *Lxra,β*$^{-/-}$-HCD (**Figure 61 A**). Les données de la littérature suggérant son acquisition possible par les spermatozoïdes *via* les épididymosomes, nous avons également évalué sa quantité protéique dans les spermatozoïdes de queue d'épididyme et dans les épididymosomes. YWHAZ est significativement diminuée dans les spermatozoïdes des mâles *Lxra,β*$^{-/-}$-HCD (**Figure 61 B**) et sa quantité a également tendance à être plus faible dans les épididymosomes de tête et de queue d'épididyme des *Lxra,β*$^{-/-}$-HCD (**Figure 61 C**). Ces résultats indiquent que la quantité de YWHAZ et sa tyrosine phosphorylation sont altérées dans notre modèle. Si YWHAZ

agit effectivement comme un pont moléculaire entre les voies de la sérine/thréonine phosphorylation et de la tyrosine phosphorylation, les altérations décrites pourraient participer aux modifications de profil de tyrosine phosphorylation mises en évidence. En effet si YWHAZ est moins présente/fonctionnelle, l'adressage correct de protéines aux kinases adéquates pourrait être altéré. **Pour ces différentes raisons, l'étude de YWHAZ semble pertinente car elle pourrait permettre de comprendre l'origine des modifications de phosphorylation dans notre modèle mais pourrait également faire progresser les connaissances fondamentales sur la régulation de ces processus au cours de la capacitation.** En effet comme cela a été précisé en introduction, les mécanismes conduisant à la tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation sont encore très peu connus. Nous pourrions par exemple réaliser des expériences de co-immnuoprécipitation de YWHAZ afin d'identifier ses partenaires dans la cellule spermatique. **Enfin, les protéines identifiées au cours de cette étude protéomique, que ce soit en termes d'accumulation protéique ou de tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation, pourraient fournir des marqueurs intéressants d'infertilité masculine en lien avec une dyslipidémie.**

Le modèle de souris *Lxra;β*$^{-/-}$ nourries avec un régime riche en cholestérol a permis de démontrer les conséquences délétères d'une hypercholestérolémie sur la fertilité et en particulier sur la maturation post-testiculaire, un aspect encore peu abordé. Sous régime HCD, ces souris présentent 1,8 fois plus de LDLc plasmatique qu'une souris sauvage sous régime contrôle. Chez l'homme, l'hypercholestérolémie est considérée dès lors que le taux plasmatique de cholestérol total augmente de 1,6 fois. Notre modèle présente donc un avantage comparé à d'autres modèles animaux de dyslipidémie (Yin et al., 2012), puisque l'hypercholestérolémie reste dans une fourchette comparable à l'homme dyslipidémique, n'est pas associée à une hypertriglycéridémie (permettant d'étudier uniquement l'impact du cholestérol) et les animaux ne développent pas d'obésité. Néanmoins il serait intéressant d'évaluer le lien entre dyslipidémie et fertilité dans




**<u>Figure 62</u> : Analyse phénotypique des souris *wt* et *Lxrα;β*$^{-/-}$ après deux semaines de régime HCD.**

A- Evaluation de la tyrosine phosphorylation au cours de la capacitation par immunocytologie. Avant et après 90 minutes de capacitation, les spermatozoïdes sont fixés puis étalés sur lame. Une immunofluorescence dirigée contre les phosphotyrosines est réalisée puis 200 spermatozoïdes sont comptés par individu. Les points représentent des moyennes ± SEM, n=4 par génotype. B- Coloration à l'huile rouge de cryocoupes mettant en évidence les accumulations lipidiques.

d'autres modèles comme par exemple les souris *Apoe*$^{-/-}$. Ces souris présentent des taux de cholestérol total et de LDLc plasmatique augmentés respectivement de 3,2 et 8,4 fois par rapport aux normes chez la souris et sont obèses. Alors qu'un phénotype d'infertilité est décrit chez la femelle dans ce modèle, aucune donnée n'est disponible concernant la fertilité des mâles (Zhang et al., 2014). Comme nous l'avons décrit en introduction, un polymorphisme de *APOE* semble lié à l'infertilité chez l'homme, il serait donc intéressant d'étudier le phénotype reproducteur des mâles *Apoe*$^{-/-}$.

Afin de s'affranchir de l'effet systémique de l'invalidation des LXRs, un knock out conditionnel dans l'épididyme pourrait être envisagé en utilisant des souris « floxées » pour les allèles *Lxra* et *β* et une recombinase Cre sous dépendance du promoteur *Defb41*. Cependant cette Cre (utilisée pour générer les souris *Dicer1*$^{-/-}$ présentées en introduction) est exprimée uniquement dans la tête de l'épididyme et n'atteint pas tous les types cellulaires. Néanmoins un tel modèle aurait un grand intérêt puisque le régime entraînerait une dyslipidémie systémique (comme c'est le cas chez les sauvages) mais cette surcharge en cholestérol serait délétère uniquement au niveau de l'épididyme qui serait incapable d'assurer le transport inverse. **Ce modèle permettrait donc de cibler spécifiquement la maturation post-testiculaire puisque les LXRs resteraient fonctionnels dans le testicule.**

Des études préliminaires nous ont permis de mettre en évidence qu'après seulement 15 jours de régime riche en cholestérol la capacitation présentait déjà des signes d'altération chez les *Lxra;β*$^{-/-}$ (**Figure 62 A**). En seulement 2 semaines l'épididyme est également affecté puisqu'une augmentation des accumulations lipidiques et une altération de l'épithélium épididymaire sont observées (**Figure 62 B**). Un tel modèle permet de cibler spécifiquement le transit épididymaire puisque celui-ci est d'environ 10 jours chez la souris (Meistrich et al., 1975). Ainsi les spermatozoïdes récupérés en queue d'épididyme n'auront subi les conséquences du régime que lors de leur maturation épididymaire, permettant de s'affranchir d'un possible impact testiculaire du régime. Néanmoins il conviendra de vérifier quel est l'impact de ce temps de régime sur les

capacités de reproduction afin d'évaluer si les altérations mises en évidence sont suffisantes pour conduire à des défauts de fertilité. La mise en place d'une infertilité modérée permettrait de développer de nouveaux projets**. En effet, si les études protéomiques conduisent à l'identification de marqueurs pronostics nous pourrions corréler le niveau de fertilité du mâle à l'état du marqueur et ainsi confirmer sa pertinence.** Récemment l'importance des ARNs non codants portés par le spermatozoïde dans la transmission de maladies métaboliques à la descendance a été mise en évidence. **Si le modèle de régime 15 jours entraîne une infertilité modérée permettant la naissance d'une descendance, le phénotype de la progéniture devra être évalué. De plus, il a été démontré que les épididymosomes pouvaient constituer un vecteur d'acquisition d'ARNs non codants par les spermatozoïdes, ce qui renforce l'indication d'une telle étude dans notre modèle.**

L'apport alimentaire étant en cause dans la mise en place du phénotype dans le modèle *Lxra,β*$^{/-}$-HCD, nous avons émis l'hypothèse que le retour à une alimentation classique pourrait permettre une réversion du phénotype. Néanmoins les expérimentations menées n'ont pas été concluantes. En effet le protocole de mise en régime se termine lorsque les souris ont 4 mois. Le retour à un régime classique durant 1 mois nous conduit donc à un âge de 5 mois, âge auquel le phénotype testiculaire commence à apparaître chez les *Lxra,β*$^{/-}$. De ce fait, aucune réversion phénotypique n'a été mise en évidence, le phénotype épididymaire est même aggravé par rapport à une souris de 5 mois n'ayant pas été soumise au régime. Ces expériences pourraient néanmoins être réitérées en décalant l'âge de mise en régime d'un mois ce qui permettrait d'obtenir des animaux de 4 mois en fin de protocole. Enfin, pour confirmer que l'apport alimentaire excessif en cholestérol est à l'origine de l'infertilité, l'utilisation d'une molécule hypolipémiante pourrait également être envisagée. L'ézétimibe constituerait un bon candidat puisque cette molécule bloque l'absorption intestinale du cholestérol (contrairement aux statines qui inhibent la synthèse *de novo* du cholestérol) et est efficace dans des modèles murins d'athérosclérose (Davis et al., 2011). **Les effets de l'administration de ce traitement en parallèle du régime HCD**

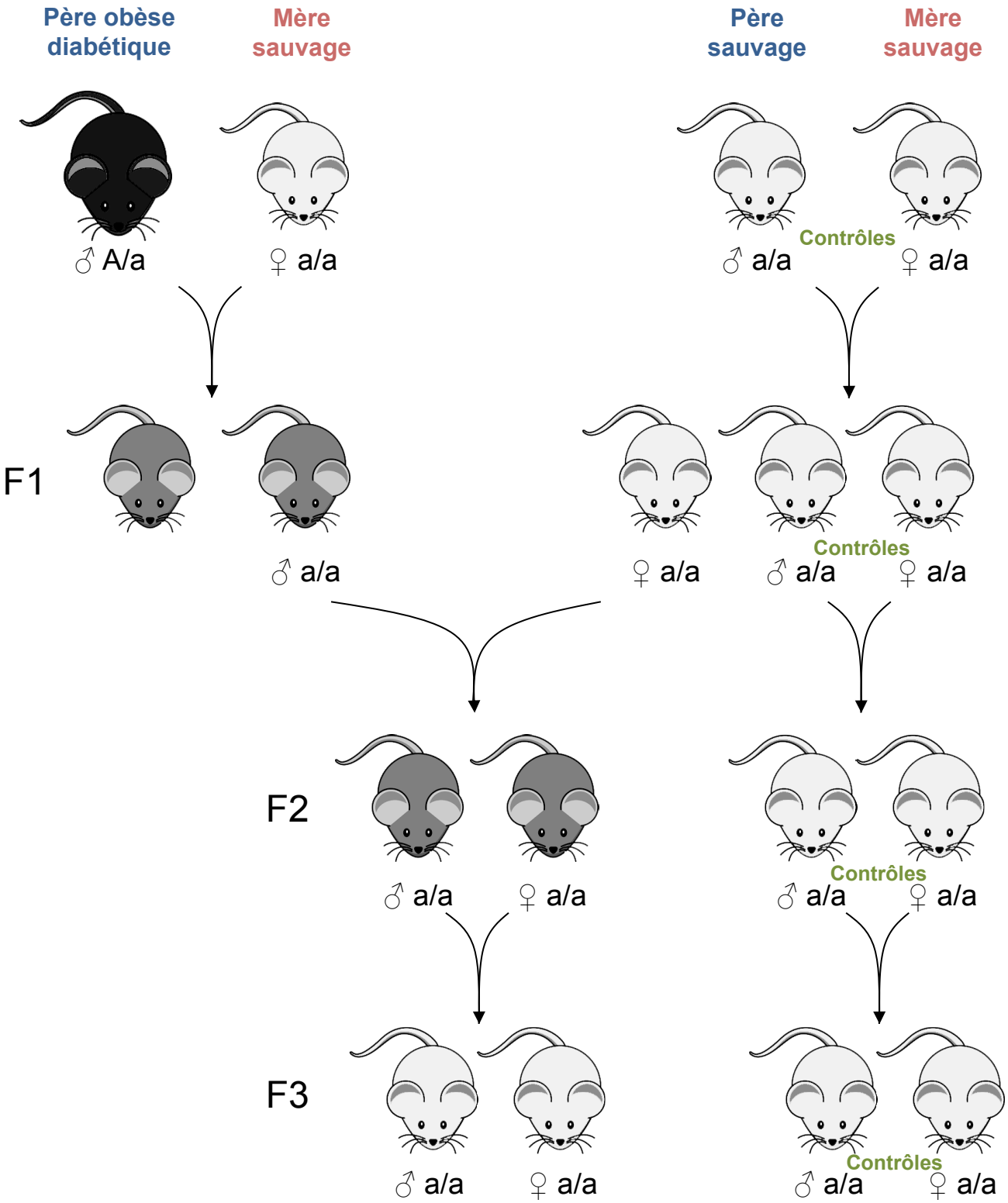
**pourront être évalués sur la fertilité, la capacitation et sur les marqueurs qui auront pu être identifiés grâce aux études protéomiques.**

A plus long terme, l'objectif sera de transposer ces travaux chez l'homme. Comme cela a été détaillé en introduction, un grand nombre d'infertilités masculines sont de cause inconnue. La moitié des hommes entre 30 et 54 ans en France souffrent d'une dyslipidémie, il est possible que dans un certain nombre de cas la dyslipidémie soit la cause ou participe à cette infertilité. Comme le bilan lipidique plasmatique ne fait pas partie des examens de routine en protocole de PMA ce possible lien est difficile à évaluer. De nombreuses études ont montré que l'indice de masse corporel chez l'homme était négativement corrélé à la qualité des paramètres spermatiques (Eisenberg et al., 2014) et à la réussite en procréation médicalement assistée (PMA - augmentation des infertilités chez les hommes obèses, augmentation du risque de grossesse non viable, taux de naissance vivante par cycle de PMA réduit - Campbell et al., 2015). Les dyslipidémies sont des pathologies fréquemment rencontrées chez les obèses, bien que certaines études montrent que l'IMC n'est pas toujours corrélé à la concentration sérique en cholestérol (Schisterman et al., 2014). Cependant, le tableau clinique des obèses est souvent complexe et plusieurs facteurs sont susceptibles d'altérer la fertilité indépendamment de la dyslipidémie (hypogonadisme, dérèglements hormonaux, dysfonction érectile, augmentation de la température scrotale - Chambers and Richard, 2015). La réalisation d'une étude permettant de corréler le bilan lipidique plasmatique de l'homme aux échecs ou réussites en protocole de procréation médicalement assistée fournirait donc des indications précieuses. Si la dyslipidémie est effectivement associée à de mauvais résultats de FIV ou d'ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*), **l'objectif sera alors de déterminer si une amélioration du bilan lipidique plasmatique (par des mesures médicamenteuses ou diététiques) améliore les résultats en protocole de PMA.**

En 2014, 3,1% des enfants nés en France sont issus de protocoles de procréation médicalement assistée, ce qui représente 25 208 enfants (soit 1 enfant sur 32, Rapport annuel 2015 de l'Agence de la Biomédecine). Parmi ces protocoles, les plus utilisés sont l'insémination intra-utérine (IIU 26,1%), la FIV (17,7%), l'ICSI (37,6%) et le transfert d'embryons congelés (TEC 18,6%). Ces protocoles sont lourds pour les couples, ne sont pas sans conséquence sur la santé et représentent un réel coût pour la sécurité sociale. En effet la prise en charge est de 100% dans la limite de 6 IIU et 4 FIV par femme de moins de 43 ans. En absence de pathologie orientant le protocole, les couples débutent le plus souvent avec les techniques les moins invasives comme l'IIU. Cependant comme les chiffres le démontrent le recours à l'ICSI est très important, en augmentation depuis ces 10 dernières années et de plus en plus associé à d'autres techniques comme l'IMSI (*Intracytoplasmic Morphologically Selected sperm Injection*). L'IMSI consiste à sélectionner les spermatozoïdes à injecter en se basant sur leur morphologie examinée à fort grossissement. Cette technique représente 9% des ICSI en 2014. Plusieurs problématiques sont associées à l'utilisation de ces protocoles. Tout d'abord les techniques consistant à sélectionner le spermatozoïde à injecter sont uniquement basées sur des paramètres morphologiques. Le « plus beau » spermatozoïde sera choisi et injecté. Environ 15% des hommes avec un spermogramme complétement normal présentent une infertilité, ce qui démontre les limites de ces protocoles (Evgeni et al., 2014). De plus, ces techniques ne permettent pas de sélectionner un spermatozoïde dont l'ADN est intact puisqu'aucune méthode fiable n'est capable de filtrer les spermatozoïdes à l'ADN oxydé ou fragmenté. Il est aujourd'hui admis que le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez l'homme est en augmentation. De plus le taux de fragmentation de l'ADN spermatique est corrélé à de faibles taux de fécondation en FIV (Aitken, 2004), à des défauts d'implantation (Saleh et al., 2003) et à une augmentation de l'incidence des avortements (Carrell et al., 2003), compromettant les chances de réussite en PMA. Au-delà de ces échecs, le taux de fragmentation de l'ADN spermatique est également associé à une augmentation des maladies chez la descendance (anomalies génétiques, malformations, cancers) compromettant également la

santé des enfants issus de ces spermatozoïdes à l'ADN altéré (Lewis et al., 2008). Une autre problématique se pose alors, puisque les techniques de PMA elles-mêmes peuvent être génératrices de dommages à l'ADN. En effet la manipulation des gamètes, leur exposition à la lumière, leur incubation dans différents milieux ou leur congélation génèrent des EOR qui peuvent entraîner une atteinte de l'ADN spermatique. **Il faut donc estimer la balance bénéfice/risque entre l'amélioration des protocoles de sélection des gamètes mâles et les dommages que peuvent entraîner ces mêmes protocoles.** C'est pourquoi les recherches doivent être poursuivies pour améliorer les techniques de sélection des spermatozoïdes et leur manipulation afin de préserver au mieux leur intégrité.

Malgré les avancées technologiques dans le domaine, les taux de réussite en PMA semblent plafonner depuis plusieurs années. L'ICSI donne les meilleurs résultats avec 20,2% de taux d'accouchements en 2014, suivi de la FIV avec 18,9%. Comme nous l'avons précisé auparavant, la fragmentation de l'ADN pourrait participer largement aux échecs de ces protocoles. Cependant l'ADN pourrait ne pas être le seul facteur à prendre en compte, le spermatozoïde apportant également avec lui des lipides, des protéines et des ARNs. Le nombre limité de FIV/ICSI remboursées conduit les praticiens à rapidement se tourner vers l'ICSI lorsque les FIV ne donnent pas de résultat. En effet, la FIV est soumise à plus de variables puisque le spermatozoïde doit être capable seul de lier et féconder l'ovocyte. Ces processus vont faire intervenir sa composition membranaire protéique et lipidique qui, comme nous l'avons vu, sont fortement dépendantes d'une maturation post-testiculaire efficace**. Des pathologies masculines, comme les dyslipidémies, pourraient altérer cette maturation et donc participer aux échecs de FIV.** L'ICSI permet à priori de s'affranchir de ces altérations. Néanmoins, comme nous l'avons évoqué, elle ne permet pas de sélectionner des spermatozoïdes à l'ADN intact. De plus, lors de l'injection, les ARNs présents dans le spermatozoïde vont également être insérés dans l'ovocyte. Cette information prend toute son importance au vu des récentes recherches mettant en évidence la transmission de pathologies métaboliques *via* les




**<u>Figure 63</u> : Transmission d'un phénotype métabolique acquis.**

Les mâles obèses A/a (noirs) sont croisés avec des femelles congéniques sauvages (blanches) pour générer la F1. Le phénotype est « masqué » chez la F1 et se révèle lorsque les souris sont soumises à un régime riche en graisses (souris grises). La F2 est générée en croisant les souris de la F1 de génotype a/a entre elles. Le phénotype masqué est transmis à la F2 même lorsque la F1 n'a pas été soumise à un régime riche en graisse. La F3 est générée en croisant les souris de la F2 entre elles. Le phénotype n'est jamais transmis à la F3. D'après *Cropley et al., 2016*. Pour plus de simplicité les souris F1 de génotype A/a ne sont pas représentées.

ARNs non codants portés par le gamète mâle. En effet, il a été démontré que l'exposition des mâles à des carences en protéines ou des régimes riches en graisses entraînait une transmission du phénotype à la descendance et que de petits ARN non codants présents dans le gamète mâle étaient à l'origine de cette transmission (Carone et al., 2010; Chen et al., 2016; Grandjean et al., 2015; Sharma et al., 2016). Une autre étude a également montré des résultats similaires. Dans cette étude, le phénotype (résistance à l'insuline, stockage hépatique de TG et surpoids) de la F1 était masqué et se révélait lorsque les souris étaient soumises à un régime riche en graisses. De manière étonnante ce phénotype « masqué » était également transmis à la F2 même en absence d'exposition de la F1 au régime (**Figure 63** - (Cropley et al., 2016). Cette transmission du phénotype métabolique de la F1 à la F2 était là encore associée à une altération du profil des petits ARNs portés par les spermatozoïdes des mâles F1. Comme cela avait été mis en évidence dans les autres publications, les tRFs (fragments d'ARNs de transfert) étaient particulièrement concernés. Les tRFs semblent donc particulièrement sensibles aux désordres métaboliques et sont impliqués dans leur transmission. Si les pathologies métaboliques sont concernées par ces transmissions trans-générationnelles impliquant des vecteurs épigénétiques, il pourrait en être de même pour d'autres pathologies. **L'utilisation de l'ICSI chez des hommes souffrant de dyslipidémies ou plus largement d'un syndrome métabolique non diagnostiqué pourrait donc entraîner la transmission de ces désordres à la descendance.**

Plus généralement, de nombreuses études rétrospectives sont réalisées actuellement et semblent mettre en évidence que les protocoles de PMA (FIV ou ICSI) ont une incidence sur la santé de la descendance. Les enfants issus de protocoles de PMA présentent significativement plus de risques de naître avant terme (notamment augmentation des grandes prématurités) et d'avoir un petit poids à la naissance (Hansen et al., 2002; Lu et al., 2013; Qin et al., 2016). Les malformations congénitales sont également augmentées avec notamment un risque accru de développer des malformations urogénitales (notamment un hypospadias) chez des enfants issus d'ICSI (Lu et al., 2013; Wennerholm et al., 2000). Les enfants issus de protocoles de PMA

présentent également significativement plus de risques de présenter des anomalies chromosomiques ou des défauts musculo-squelettiques (Hansen et al., 2002). Les cancers sont des maladies rares chez l'enfant, il est donc difficile d'évaluer un risque supplémentaire de développer une telle pathologie chez les enfants conçus avec l'aide de la PMA. Néanmoins des études ont démontré une augmentation du risque de développer un rétinoblastome (Moll et al., 2003) et un âge d'apparition plus précoce des leucémies (Petridou et al., 2012) chez les enfants issus de FIV. Enfin, une augmentation des maladies épigénétiques chez les enfants conçus avec l'aide de la PMA est observée, notamment des maladies liées à des défauts d'empreintes génétiques (syndrome de Prader-Willi, syndrome de Beckwith-Wiedmann, syndrome d'Angelman - (Laprise, 2009). Les procédures de PMA coïncident avec des évènements cruciaux de remaniements des empreintes génétiques, ce qui pourrait expliquer ces données. De plus les protocoles de PMA pourraient entraîner des changements subtils chez des enfants phénotypiquement « normaux », qui pourraient se révéler plus tard au cours de la vie de l'individu. En effet, des changements modestes des niveaux de méthylation d'îlots CpG au niveau de 700 gènes ont été retrouvés dans le sang de cordon et le placenta d'enfants conçus en PMA. Ces changements s'accompagnaient d'une altération de la transcription de gènes chez l'enfant dont certains sont impliqués dans des désordres métaboliques chroniques comme l'obésité ou le diabète de type II (Katari et al., 2009).

Ces études sont néanmoins à prendre avec précaution puisque de nombreuses autres démontrent au contraire qu'il n'y a pas d'augmentation du risque de développer ces pathologies pour les enfants issus de PMA (Lu et al., 2013). Ces différences peuvent s'expliquer de plusieurs manières. Tout d'abord la taille des cohortes étudiées varie énormément et de faibles différences pourront être masquées avec de petites cohortes. L'expression des résultats varie également selon l'étude puisqu'ils sont parfois normalisés avec l'âge de la mère ou le sexe de l'enfant. Les grossesses multiples sont connues pour présenter un risque plus élevé pour la santé de l'enfant et la fréquence de ces grossesses est plus importante lors de protocoles de PMA. Ainsi certaines

études excluent ces cas de leur analyse afin de ne pas biaiser les résultats, mais ce n'est pas le cas de toutes. Des auteurs évoquent également le fait que les grossesses après PMA sont plus surveillées ce qui pourrait artificiellement mettre en évidence plus de défauts. Néanmoins la majorité des pathologies évoquées sont graves et donc normalement diagnostiquées dans la population normale.

**Il semble relativement clair que l'utilisation de protocoles de PMA a des répercussions sur la santé des enfants qui en sont issus.** Néanmoins l'origine de ce lien reste compliquée à appréhender. Tout d'abord l'âge des mères en PMA est en moyenne plus élevé que celui des mères dans la population générale, ce qui augmente les risques pour la santé de l'enfant. Cependant comme de nombreuses études ajustent leurs résultats en fonction de l'âge des mères ce paramètre ne peut à lui seul expliquer l'augmentation des risques pour la descendance (Hansen et al., 2002). Les causes de l'infertilité des parents pourraient également avoir des répercussions sur la santé des enfants, indépendamment des protocoles de PMA. En effet il a été démontré que les malformations congénitales étaient également augmentées chez les enfants issus de couples présentant une hypofertilité et n'ayant pas bénéficié de protocole de PMA (Davies et al., 2012). Enfin les protocoles eux-mêmes pourraient être à l'origine de l'augmentation de ces problèmes de santé chez les enfants, que ce soit *via* les molécules servant à induire l'ovulation ou permettant de maintenir les premiers stades de la gestation, la composition et le temps d'incubation dans les milieux de culture ou la congélation/décongélation des gamètes et leur manipulation. **Il est donc aujourd'hui difficile de distinguer les effets dus à l'infertilité des couples des effets délétères potentiels engendrés par les protocoles de PMA.**

Au vu de ces différentes données, il semble essentiel de poursuivre ces études rétrospectives et de suivre la santé des adultes qui ont été conçus grâce à la PMA. Les protocoles de PMA devraient également être améliorés, pas seulement avec l'objectif de concevoir un enfant mais également de le concevoir en bonne santé. Compte tenu des conséquences délétères des

protocoles de PMA et/ou de l'infertilité des couples sur la santé de la descendance, les recherches sur les causes de ces infertilités doivent être poursuivies. Si ces recherches permettent d'identifier et de traiter de nouvelles causes d'infertilité, cela permettra de limiter le recours à ces protocoles ce qui sera bénéfique à la fois en terme de coût sociétal mais également en terme de santé. **Comme mis en évidence au cours de l'introduction bibliographique ou des résultats résumés dans ce manuscrit, les dyslipidémies pourraient avoir des conséquences délétères sur la fertilité masculine mais également pour la santé de leur descendance. Les désordres métaboliques étant en constante augmentation dans nos sociétés occidentales, leur impact sur la fertilité devra être pris en compte.**

# *Annexes*

**Asian Journal of Andrology (2015) 17,** 742–748
© 2015 AJA, SIMM & SJTU. All rights reserved 1008-682X
www.asiaandro.com; www.ajandrology.com

*Open Access*

**INVITED REVIEW**

Sperm Biology

# Posttesticular sperm maturation, infertility, and hypercholesterolemia

**Marjorie Whitfield[1,§], Xavier Pollet-Villard[2,3,4,§], Rachel Levy[2,3,4], Joël R Drevet[1], Fabrice Saez[1]**

**Cholesterol is a key molecule in the mammalian physiology of especial particular importance for the reproductive system as it is the common precursor for steroid hormone synthesis. Cholesterol is also a recognized modulator of sperm functions, not only at the level of gametogenesis. Cholesterol homeostasis regulation is crucial for posttesticular sperm maturation, and imbalanced cholesterol levels may particularly affect these posttesticular events. Metabolic lipid disorders (dyslipidemia) affect male fertility but are most of the time studied from the angle of endocrine/testicular consequences. This review will focus on the deleterious effects of a particular dyslipidemia, *i.e.,* hypercholesterolemia, on posttesticular maturation of mammalian spermatozoa.**
*Asian Journal of Andrology* (2015) **17**, 742–748; doi: 10.4103/1008-682X.155536; published online: 2 June 2015

**Keywords:** cholesterol; dyslipidemia; epididymis; fertility; posttesticular maturation; spermatozoa

## INTRODUCTION

Mammalian spermatozoa are very specialized and polarized cells, with a specific function: fertilizing their female counterpart, the oocyte. The capacity to fertilize an oocyte is acquired during a long-lasting multi-step process that can be defined as "posttesticular maturation." This maturation, enabling an infertile testicular spermatozoon to become fertile, starts during its epididymal transit[1] and ends in the upper female genital tract, in the vicinity of the oocyte, during the capacitation process.[2,3] During posttesticular maturation events, the modifications of sperm plasma membrane composition and dynamics are essential for fertility,[4,5] and cholesterol plays a crucial role. The importance of epididymal cholesterol homeostasis has been recently reviewed,[6] and this epididymal maturation process prepares sperm cells for the next important maturation step, capacitation, which is also highly dependent on the plasma membrane cholesterol content of the male gametes.[7–9] Even though the central role of cholesterol in male fertility has been known for a long time, few studies have been conducted on the impact of cholesterol metabolism impairment on posttesticular maturation, the emphasis of most being put on the endocrine effects.

Dysregulation of lipid metabolism (dyslipidemia) is increasingly present in occidental societies, with pathophysiological conditions such as obesity, metabolic syndrome and cardiovascular diseases (World Health Organization). Hypercholesterolemia is highly represented among dyslipidemic patients: over 30 million Americans older than 20 years have a high blood cholesterol level (>240 mg $dL^{-1}$, American Heart Association Statistical Fact sheet 2013). Another study has shown that a high proportion of men at the age for their partners to conceive (45.3% of men aged 30–54 years) were dyslipidemic without taking any treatment.[10] The influence of lipid metabolic disorders on fertility has now become a clinical problem[11,12] and this review will present the state-of-the-art on the impact hypercholesterolemia can have on male fertility, focusing on posttesticular maturation events and sperm functions.

## POSTTESTICULAR MATURATION AND CHOLESTEROL

The posttesticular maturation process particularly concerns membrane composition of gametes and begins in the epididymis. It involves remodeling of membrane proteins (relocalization, addition[13,14]) and changes in the lipid composition, in particular of phospholipids and sterols. Changes in the sperm cholesterol content during epididymal transit have been studied in several mammalian species,[6] and a significant decrease of approximately 50% has been found in the ram,[15] rat,[16] hamster,[17] and mouse.[18] The cholesterol loss causes a decrease in the cholesterol/phospholipid ratio, a membrane fluidity indicator, showing that sperm cells increase their membrane fluidity during epididymal transit, which facilitates the subsequent events of capacitation and membrane fusion during fertilization. The distribution of cholesterol in the membrane also appears to be important because the plasma membrane of spermatozoa shows abundant cholesterol-enriched microdomains (lipid rafts), the real organizing centers of cell signaling.[19] These lipid rafts modify the local membrane dynamics and are essential for the regionalized transfer of proteins to the male gamete during epididymal maturation. Indeed, a study in bulls showed that the zona pellucida recognition (P25b) protein was specifically transferred to the sperm lipid rafts *via* lipid rafts found on small lipid vesicles (epididymosomes) emitted by the epididymal epithelium.[20] Moreover, three different subtypes of lipid rafts have been previously characterized in mouse sperm cells, each with a different protein profile as

[1]Team "Mechanisms of post-testicular infertility", Génétique Reproduction et Développement, UMR CNRS 6293, INSERM U1103, Clermont Université, 24 Avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France; [2]Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique-CECOS, Hôpital Jean Verdier (AP-HP), Avenue du 14 Juillet, 93143 Bondy, France; [3]Service de Médecine de la Reproduction, Hôpital Tenon (AP-HP), 4 Rue de la Chine, 75020, Paris, France; [4]Unité de Recherche en Epidémiologie Nutritionnelle, INSERM U557, INRA, CNAM, Université Paris 13, CRNH IdF, 93017 Bobigny, France.
[§]Both authors contributed equally.
Correspondence: Prof. JR Drevet (joel.drevet@univ-bpclermont.fr)
This article was presented at the 6th International Conference on the Epididymis in Shanghai, Oct 31-Nov 3, 2014.

determined by proteomic analysis.[21] Many of these proteins are acquired by sperm cells during epididymal transit, showing the importance of the lipid composition of gametes for the proper acquisition and localization of proteins during posttesticular maturation.

The next posttesticular maturation step occurs in the female genital tract during the capacitation process. The lipid composition of sperm cells issuing from the epididymis is crucial in most species, as cholesterol efflux from the plasma membrane is the early event triggering capacitation. The consecutive decrease of the cholesterol/phospholipid ratio modifies plasma membrane dynamics,[7,22] thereby increasing membrane permeability to bicarbonate and calcium ions,[23,24] allowing activation of a soluble adenylyl cyclase (sAC,[25]) and increase in cAMP production. The Ser/Thr kinase PKA (protein kinase A) is also activated, resulting in the initiation of a signaling cascade.[26,27] PKA phosphorylates, among other proteins, SRC kinase, leading to phosphorylation of specific tyrosine residues in sperm proteins.[28] Although phosphorylation of tyrosine residues of proteins during capacitation is well described today, the roles of these proteins in the capacitation process remain poorly understood.[9] Ultimately, with capacitation gametes acquire a hyperactivated motility,[29] the ability to bind to the zona pellucida and to undergo the acrosome reaction.[30]

The proper lipid composition of gametes is thus essential for fertilization, and transgenic mouse models have shown that dysregulation of cholesterol metabolism may act at different levels of male fertility.

## CHOLESTEROL AND INFERTILITY – THE CONTRIBUTION OF TRANSGENIC MOUSE MODELS

Transgenic mouse models have been used to investigate the physiological importance of cholesterol homeostasis regulators (**Table 1**). In some models, male fertility studies have only been performed for regarding testicular disturbances (Retinoid X Receptor, *Rxr*$^{-/-}$ mice[31] – ATP-binding cassette, *Abca1*$^{-/-}$ mice[32]) and will not be developed here. In other cases, an epididymal phenotype was revealed but not in direct relation to cholesterol homeostasis. The *ApoER2*$^{-/-}$ (Apolipoprotein E receptor 2) mice, for example, suffered from infertility, but no alterations were detected in testicular or epididymal structures and sperm production was normal.[33] Even though ApoER2 is a member of the LDL receptor family, highly expressed in the principal cells of epididymal proximal segment,[34] no clear phenotype related to cholesterol homeostasis was described, the infertility being due to functional defects of the sperm mitochondria and cell volume dysregulation.

In other models, the authors concluded that the infertility was due to testicular abnormalities while their results also strongly suggested posttesticular maturation disturbances. For example, male mice heterozygous for a null apolipoprotein B allele (*Apo B*$^{+/-}$), a structural component of several classes of lipoproteins (chylomicron, VLDL, IDL, LDL), have reduced fertility associated with a decreased cholesterol plasma level.[35] The urogenital tract appears normal, but the sperm count is mildly reduced, motility is decreased, and spermatozoa are unable to fertilize an oocyte in the presence of its zona pellucida.[36] The authors only evoked the hypothesis of an unknown role of ApoB in spermatogenesis. However, today the importance of epididymal maturation is well-demonstrated for the acquisition of mobility and zona pellucida recognition, and ApoB is also expressed in the epididymis.[36] Defects could thus come from posttesticular events. Since this work, the authors have not pursued their investigation on this model.

**Table 1: Transgenic mice used for genes involved in cholesterol-related biological processes and their associated male fertility phenotypes**

| *Gene name* | *Gene product* | *Biological process related to cholesterol* | *Model/reference* | *Phenotype* |
|---|---|---|---|---|
| *Abca1* | ATP-binding cassette, subfamily A, member 1 | Cholesterol efflux and reverse transport | *Abca1*$^{-/-}$ mice<br>Selva *et al.*[32] 2004 | Fertility is decreased by 21%<br>Lipid accumulation in Sertoli cells<br>No sperm abnormalities |
| *ApoB* | Apolipoprotein B | Cholesterol transport and positive regulation of storage | *ApoB*$^{+/-}$ mice<br>Huang *et al.*[36] 1996 | No abnormalities in the testis<br>Decrease in sperm motility<br>Unable to fertilize an oocyte with zona pellucida |
| ***Dicer1*** | Dicer1, ribonuclease type III | Maturation of pre-microRNA | *Dicer1*$^{-/-}$ mice<br>Björkgren *et al.* 2012–2014 | Increased sperm immotility and broken cells<br>Increased cholesterol/PUFA ratio in sperm<br>Alteration of lipid homeostasis in epididymis<br>Decrease in ability to bind and fertilize an oocyte |
| *Lrp8* | Low-density lipoprotein receptor-related protein 8, Apolipoprotein E receptor | Receptor for Reelin and apoE | *Apoer2*$^{-/-}$ mice<br>Andersen *et al.*[33] 2003 | Abnormal sperm morphology and immotility<br>Cell volume dysregulation<br>Mitochondrial abnormalities<br>Decrease of the PHGPx protein in sperm |
| *Npc1* | Niemann-Pick type C1 | Cholesterol efflux | *Npc1*$^{-/-}$ mice<br>Fan *et al.*[38] 2006 | Decreased sperm count<br>Abnormal sperm morphology<br>Unable to fertilize an oocyte with zona pellucida<br>Defect in epididymal maturation of some proteins of the ADAM family |
| ***Npc2*** | Niemann-Pick type C2 | Abundant component of the epididymal fluid<br>Cholesterol binding activity *in vitro* | *Npc2*$^{-/-}$ mice<br>Busso *et al.*[54] 2014 | Decreased sperm cholesterol content<br>Defect in capacitation<br>Unable to fertilize an oocyte with zona pellucida |
| ***Nr1 h2* (LXRα)**<br>***Nr1 h3* (LXRβ)** | Nuclear receptor subfamily 1, group H, members 2 and 3 | Negative regulation of cholesterol storage<br>Positive regulation of cholesterol efflux and transport | *Lxrα;β*$^{-/-}$ mice with high cholesterol diet<br>Ouvrier *et al.*[49] 2011 | Decreased sperm motility and viability<br>Increased premature acrosome reaction and sperm abnormalities<br>Alteration of lipid homeostasis in epididymis<br>Trans-differentiation of smooth muscle cells into foam cells |
| *Rxrb* | Retinoid X receptor β | Transcription factor | *Rxrβ*$^{-/-}$ mice<br>Kastner *et al.*[31] 1996 | Oligo-astheno-teratozoospermia<br>Lipid accumulation in Sertoli cells<br>Degeneration of the seminiferous tubules |

Inactivation of these genes in mouse models results in reduced fertility or infertility. Phenotypes indicated in bold are due to an alteration of the posttesticular maturation.
PUFA: polyunsaturated fatty acid; PHGPx: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase

The Niemann-Pick C1 (NPC1) protein regulates the trafficking of low-density lipoprotein-mediated endocytosed cholesterol.[37] *Npc1*$^{-/-}$ male mice are infertile mostly because of a partial arrest of spermatogenesis.[38] Furthermore, spermatozoa show morphological head abnormalities and are unable to fertilize an oocyte *in vitro*.[38] These gametes also have a fault in a disintegrin and metalloprotease (ADAM) family protein maturation, in particular ADAM 3 (cyritestin), known to be essential for fertilization.[39] This protein must be cleaved during epididymal transit to be functional[40] and sperm cells of *Npc1*$^{-/-}$ mice show a defect in this cleavage, demonstrating a lack of epididymal maturation, however the authors did not discuss this point.

In these models, the posttesticular sperm defects were often not considered, even though several studies have demonstrated the deleterious impact of dyslipidemia on the posttesticular maturation of gametes and therefore fertility.

The impact of hypercholesterolemia on gamete epididymal maturation has regained some interest since our group has developed a model of diet-induced posttesticular infertility. This model combines knock-out mice for Liver X Receptors (LXRs) with a high cholesterol diet. The transcription factors LXRα (LXRα – *Nr1h3*) and LXRβ (LXRβ – *Nr1h2*) are activated by oxidized forms of cholesterol and have been shown to control the expression of genes involved in cholesterol homeostasis, differentiation, proliferation, inflammation, and reproduction.[41–45] Male mice deficient for the two LXR isoforms become totally infertile at 8–9 months, showing a composite phenotype: testicular[44] and epididymal (restricted to the proximal caput epididymis[46–48]). Young LXR-deficient male mice (3–4 months) are fertile and do not show any phenotype at all.[44,46] However, when young males are fed for 1 month with a high cholesterol diet (HCD, which provokes a large elevation of plasma LDL cholesterol or LDL-C), infertility is triggered and only the epididymal phenotype appears, showing the sensitivity of this organ to a cholesterol overload.[49] These animals recapitulate the epididymal phenotype of old mice: accumulation of cholesteryl esters in the proximal caput epididymidis, and disruption of the proximal epididymal segments (S1 and S2) with a reduction in the height of the epithelium. These mice present an "epididymosclerotic" phenotype characterized by a global loss of smooth muscle cells accompanied by trans-differentiation of these cells into "foam cells". These cells appeared to migrate towards and infiltrate the epididymal epithelium, which was corroborated by the presence of the matrix metalloproteinase MMP9. Testes showed no alteration, but the gametes were strongly affected. Motility and viability were decreased, and broken sperm cells were increased, showing a weakness of the head/flagellum junction. Premature acrosomal reactions were also increased and could result from an alteration in the membrane composition. This work clearly showed that, in this model, the epididymis is an early target of lipid-induced infertility. Given the importance of gamete lipid maturation during epididymal transit, we strongly suspect that infertility in this model is caused by an alteration in the membrane lipid composition of spermatozoa. This lipid composition will be crucial especially during capacitation, and this aspect is currently being studied.

Cholesterol homeostasis involves different proteins regulating intracellular trafficking. Niemann-Pick C2 (NPC2) is a lysosomal, soluble protein shown to be a cholesterol-binding protein relevant for the efflux of cholesterol from this organelle.[50] This protein has been shown to be one of the most abundant proteins in human epididymal fluid[51] and seems to participate in cholesterol efflux from spermatozoa during epididymal maturation.[52,53] NPC2 deficient mice (*Npc2*$^{-/-}$), a model for Niemann-Pick disease type C2 (neurological disease), are also infertile because they do not mate (locomotor dysfunction). However, given the abundance of NPC2 in the epididymis, it was of interest to check whether the spermatozoa of these males were able to fertilize an oocyte. The authors showed that *IVF* rates were significantly lower with spermatozoa from these mice than with those from the wild type.[54] Spermatozoa appeared normal in count, morphology, viability and mobility. After vasectomy and even after a vaso-vasostomy, NPC2 expression in the human epididymis is selectively down-regulated, and the sperm cholesterol content is increased,[53] confirming the functional role of NPC2 in cholesterol efflux. In bulls, purified NPC2 is able to reduce the cholesterol content of spermatozoa and to dissociate a large part of P25b molecules from lipid rafts, suggesting that NPC2 is involved in sperm membrane organization.[52] Unexpectedly, in the mouse, the lack of NPC2 appears to cause a decrease in sperm plasma cholesterol. Spermatozoa of *Npc2*$^{-/-}$ animals show reduced capacitation-induced cholesterol efflux, highlighted by a defect in tyrosine phosphorylation. The lower cholesterol content, with increasing membrane fluidity, may alter the distribution of molecules in noncapacitated spermatozoa. Indeed, as mentioned previously, lipid rafts (enriched in cholesterol) allow regionalized acquisition of proteins.[21] An impairment of this process, by a reduction in membrane cholesterol content, could ultimately affect the formation of capacitation-related signaling complexes during incubation under capacitation conditions.[54] Changes in sperm cholesterol content, either an increase or a decrease in these animals, have a direct impact on capacitation and thus on the ability to fertilize an oocyte.

More recently, a specific model of invalidation of Dicer1 in the caput epididymidis was generated (Dicer 1 cKO[55]) by using a mouse line expressing *iCre* under the Defensin beta 41 (*Defb41*) promoter.[56] Dicer1 is the RNAse III enzyme required for processing pre-microRNAs into their mature forms. These male mice were infertile, and the epithelial layer of both initial segment (IS) and caput epididymidis was disorganized. With age, the Dicer1 cKO IS morphologically resembled that of an undifferentiated prepubertal epididymis. Moreover, the authors showed a decrease in segment-specific gene expression and altered sex steroid receptor ratio.[55] Further examination of these Dicer1 cKO mice sperm showed that 33% of sperm cells were broken and that there was an increased spontaneous loss of the acrosome. Eventually, 80% of the spermatozoa were immotile. Such defects could be caused by membrane instability coming from the abnormal lipid composition of these gametes. The authors showed that under capacitating conditions Dicer1 cKO mouse spermatozoa did not lose cholesterol as did wild-type spermatozoa, leading to ineffective capacitation (only a small increase in tyrosine phosphorylation levels). Furthermore, the polyunsaturated fatty acid (PUFA) level was decreased compared with the wild type, consequently increasing the cholesterol/PUFA ratio and, therefore, the membrane rigidity. In the epididymis, expression levels of genes involved in the biosynthesis (*Hmgcr*, *Hsd17b7,* and *Dhcr24*) and transport (*Abca1* and *Abcg1*) of cholesterol were up-regulated.[57] This is in accordance with the lack of DICER1, thus strongly reducing the presence of all mature miRNAs from the cells, and ultimately giving rise to up-regulation of target genes. MicroRNAs have previously been shown to be involved in the regulation of lipid metabolism: miR-33 inhibits the expression of *Abca1* and *Abcg1*[58] in mice and miR-122 inhibits *Hmgcr*.[59] In the Dicer1 cKO, these miRNAs may not be matured, thus explaining the increase in their target gene expression levels, but this hypothesis will need confirmation. This original KO has brought new evidence regarding the importance of cholesterol homeostasis and miRNAs in the epididymis for proper maturation of spermatozoa.

## MODELS OF DIET-INDUCED MALE INFERTILITY

Besides transgenic mouse models, hypercholesterolemia can also be diet-induced, mimicking nutritional dyslipidemia. The rabbit is a useful model because hypercholesterolemia can be easily triggered with cholesterol- or fat-enriched diets.[60,61] The observed diet effects vary depending on diet composition and duration. The main sperm modifications triggered by hypercholesterolemia are (1) an increase in the cholesterol content and the percentage of morphologically abnormal spermatozoa, (2) a decrease in sperm motility and the progesterone-induced acrosome reaction and (3) a constant sperm count.[62,63] The observed higher cholesterol content is an indicator of decreased membrane fluidity, a fact in accordance with an inhibition of capacitation shown by a reduced ability of spermatozoa to reach normal tyrosine phosphorylation levels. The link was established using a cell-permeant synthetic cAMP analog and phosphodiesterase inhibitors, which artificially increase intracellular cAMP levels and lead to a direct activation of PKA, bypassing the early membrane events of capacitation. Under these conditions, phosphotyrosine profiles are restored showing that the capacitation defect is associated with membrane-related events.[63]

The rat model has been less used for the reason that rats can physiologically manage a cholesterol overload.[61] Several studies with high cholesterol[64,65] or high fat-fed rats show quite similar results to what has been described in the rabbit:[66] decreased sperm motility, viability and sometimes sperm numbers,[64,65] and usually the percentage of morphologically abnormal sperm cells is increased.[65,66] In all these cases, testicular histology was disrupted, with a decrease in the seminiferous tubule diameter,[64] testicular atrophy[65] or a decrease in the number of Leydig and Sertoli cells.[66] These models are thus not appropriate to study the impact of hypercholesterolemia on epididymal sperm maturation.

## CLINICAL DATA LINKING CHOLESTEROL PLASMA LEVELS AND POSTTESTICULAR MATURATION EVENTS

The first report linking modification of cholesterol metabolism and semen parameters in the human was published in 1993 by Dobs and colleagues. A statistically significant decrease in sperm motility was evident in a subset of 14 male patients included in a Randomized Control Trial (RCT) assessing the efficiency of pravastatin compared with cholestyramine.[67] Interestingly, these LDL-lowering drugs act through independent mechanisms. Pravastatin belongs to the statin family of lipid-altering agents. They are competitive inhibitors of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) reductase (HMGR), the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis, which irreversibly reduces 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) to mevalonate. By occupying a portion of the binding site of HMG-CoA to the enzyme, they block the access of the substrate to the catalytic site of HMGR, which results in a decrease in intracellular cholesterol. The total cholesterol- and low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C)-lowering effect of statins is then explained by their ability to decrease cholesterol production in the liver. [68]

Cholestyramine belongs to the family of Bile Acid Sequestrants (BAS). They consist of large polymers that are able to bind to bile salts in the intestine, preventing their reabsorption from the gut and increasing their fecal excretion. Increased fecal excretion leads to a subsequent shift in bile salt *de novo* synthesis from liver cholesterol at the expense of LDL-C synthesis, which results in a lowering of blood LDL-C levels.[69] In the initial Dobs *et al.* study, a decrease in sperm motility was found 6 and 12 months after treatment indicating that this adverse event was the result of a lowering of total cholesterol and LDL-C, and not a specific side effect of a particular treatment. This finding could also not be linked to an alteration of steroid metabolism suggesting that LDL-cholesterol lowering could be acting on posttesticular events, such as epididymal sperm maturation, as epididymides are involved in the acquisition of sperm motility. The authors also noticed a significant decrease in semen volume and sperm count at 6 months, but it returned to baseline after 12 months. This may reflect a transient decrease in testosterone levels since testosterone is essential for normal spermatogenesis and the function of the male accessory glands (epididymides, prostate, and seminal vesicles). However, that testosterone levels and testosterone responses to hCG were not significantly affected during the study, which ruled out this hypothesis.

Interestingly, one blind trial evaluating the impact on testicular function of simvastatin, another molecule of the statin family, found no differences in sperm count or motility after 14 weeks of treatment.[70]

The long-term effect of pravastatin was further evaluated in eight hypercholesterolemic patients, and no significant changes in values of semen parameters, including motility, were found after 6 months of effective treatment.[71] Another RCT comparing the effect of two statins, pravastatin ($n$ = 39), simvastatin ($n$ = 41) and placebo ($n$ = 39) on testicular function and androgen production in hypercholesterolemic patients was published by the same author who first identified a decrease in sperm motility after lowering of LDL-cholesterol.[72] This time, no significant changes in semen quality were found after 12 and 24 weeks of treatment and testicular steroid secretion was not altered.

Very recently, a prospective noncontrolled pilot assay aimed at evaluating the impact of a 5-month therapy with atorvastatin on semen parameters of 17 healthy, normo-cholesterolaemic and normozoospermic patients.[73] Treatment was significantly associated with a decrease in sperm number, sperm vitality, and seminal concentration of epididymal (neutral alpha 1–4 glucosidase, L-carnitine) and prostatic (acid phosphatase) markers. Sperm morphology was significantly altered in the head, neck, and midpiece regions, and the Multiple Anomalies Index was moderately increased. The percentage of acrosome-reacted spermatozoa was significantly decreased after treatment, but the cholesterol and phospholipid content and ratio in spermatozoa and seminal plasma were unchanged. Surprisingly, sperm motility was significantly but slightly increased at the end of the 5-month treatment. The authors concluded that atorvastatin treatment impaired the fertility potential of the volunteers at the testicular, epididymal and prostatic levels, and that this effect was independent of an alteration of the hypothalamic pituitary testicular axis, as plasma gonadotropin and testosterone levels remained stable during the study. Hypotheses were made on a direct effect of atorvastatin on gonadal, epididymal, and prostatic functions, as some factors identified as determinants of male fertility are classically decreased by statin molecules. This is the case for coenzyme Q10, a provitamin with antioxidant properties synthesized by HMGR. However, a direct effect of total cholesterol- and LDL-C- lowering on epididymides could also be responsible for some of the findings described in the study, especially as total cholesterol and LDL-C were normal before treatment onset. Even though to our knowledge, there are no links between hypocholesterolemia and male infertility in the current scientific literature, this aspect should not be ignored and future studies evaluating the effect of statins on male fertility should include a control group treated with unrelated lipid-lowering drugs.

Interestingly, the same team have previously linked hypercholesterolemia with an increase in seminal carnitine, a biomarker of epididymal function implicated in sperm maturation, metabolism, and motility.[74] Neither changes in sperm or seminal plasma lipid content nor an alteration of other male accessory gland

function (prostate and seminal vesicle markers) or testosterone levels were found, suggesting that hypercholesterolemia acted solely on carnitine production by the epididymides. Interestingly, there was also no significant difference in basic semen parameter values between hypercholesterolemic ($n = 11$) and control men ($n = 11$), although the number of subjects was too low to be clinically relevant.

Taken together, these results suggest that hypercholesterolemia may act on human epididymides by increasing L-carnitine secretion, and that total cholesterol- and LDL-C- lowering could impede sperm motility in previously hypercholesterolemic patients, although available studies have shown contradictory results for the latter finding.

In previously normocholesterolemic and normozoospermic volunteers, total cholesterol- and LDL-C- lowering after 5 months of atorvastatin treatment were associated with a decrease in sperm count, epididymal and prostatic seminal markers, combined with an increase in sperm motility. Even if atorvastatin toxicity through direct or off-target effects could explain these results, a direct action of cholesterol-lowering on epididymides should not be ruled out.

## INSIGHTS ON HUMAN FERTILITY OBTAINED FROM TRANSGENIC ANIMAL MODELS

As stated above, in a murine KO model, LDL-C can act on epididymal function through its interaction with ApoER2, a member of the LDL receptor family acting both in endocytosis and in signal transduction through the SRC kinase and Phosphatidyl Inositol-3 kinase pathways. ApoER2 null mice are infertile and present with an alteration of sperm motility and morphology.[33] Abnormal morphology consists of tail coiling, bending, angulation, and midpiece deformation involving axonemal structures. These impairments are the results of posttesticular maturation events taking place in the initial portion of the mouse epididymis and involve a decrease in Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PHGPX) protein levels. PHGPH (or GPx4) is a selenoprotein belonging to the family of glutathione peroxidases. In spermatozoa, PHGPX is located in the midpiece and catalyzes the reduction of lipid peroxides, conferring a protective effect against ROS generation by the mitochondrial respiratory chain and subsequent sperm lipid peroxidation. Interestingly, a decrease in sperm PHGPX expression has been found in human males presenting with idiopathic asthenozoospermia.[75–77] It has also been implicated in the postthaw survival of human spermatozoa.[78] However, the alteration of PHGPX expression could not be linked to mutations in the gene, or with single nucleotide polymorphisms of the 5'-untranslated region of the related mRNA,[79] and so the mechanism linking ApoE2R and PHGPX expression still remains unclear.

As described above, hypocholesterolemic $ApoB^{+/-}$ mice are infertile with a decrease in sperm count, motility and zona binding, suggesting an alteration of epididymal maturation. The phenotype is partially reversed by using human ApoB as a transgene. Genetic association studies have been subsequently performed in humans. Initial work reported a significant association between a 3-codon deletion polymorphism in the ApoB signal peptide gene and infertility in Slovene Caucasian patients presenting with oligo-astheno-teratozoospermia.[80] However, no correlation was found between the polymorphisms and basic semen parameter values, and such an association was not significant when a population of non-Caucasian Indian males was studied for the same deletion.[81]

In the murine model, Dicer 1 has been implicated in initial segment and caput epididymidis homeostasis, and associated with a dramatic decrease in sperm motility, capacitation, and an abnormal phospholipid/cholesterol ratio causing sperm membrane rigidity. This finding could be explained by the absence of mature miRNAs controlling the translation of genes implicated in cholesterol metabolism, such as *Abca1*, *Abcg1,* and *Hmgcr*, as reviewed above. In humans, polymorphism in key enzymes of miRNA pathways, Dicer1 and Drosha, have been associated with semen quality in a Chinese population. But after Bonferroni correction, the association only persisted with oligozoospermia for a polymorphism in Dicer1,[82] which does not favor an alteration of posttesticular maturation events. Specific miRNAs profiles have also been described in distinct segments of human epididymides[83] and in epididymosomes,[84] suggesting an important role of epididymal miRNAs in sperm maturation, as well as a possible uptake of these miRNAs by spermatozoa during epididymal transit. Very recently, it has been demonstrated that a sperm protein, cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2), involved in modulation of sperm motility, acrosome reaction, and gamete fusion, is regulated by miR-27b, a miRNA that has been described as one of 18 seminal plasma miRNAs specifically present in epididymosomes[84] and which is differentially expressed in the human epididymal corpus.[83] Indeed, a decrease of CRISP2 protein level in spermatozoa from asthenozoospermic patients has been linked to an increase of miR-27b. Furthermore, in a retrospective study, high miR-27b expression or low CRISP2 protein expression was significantly associated with low sperm progressive motility, abnormal morphology, and infertility.[85] MiR-27b was earlier described as a regulator of adipocyte differentiation, as expression of miR-27 resulted in blockade of expression of PPARγ and C/EBPα, the two master regulators of adipogenesis[86] and thus could represent a link between lipid metabolism, sperm epididymal maturation, and male infertility in humans.

## CONCLUSION

Human clinical data linking hypercholesterolemia and epididymal function are scarce, and often based on studies evaluating the safety of cholesterol-lowering drugs, as cholesterol is a key player in steroid metabolism. However, some studies showed an association between alterations of total cholesterol and LDL-C levels, and markers of epididymal function, but no modifications of sperm membrane lipid content or capacitation were observed. Furthermore, transgenic animal models have identified several possible molecular targets involved in cholesterol metabolism that are implicated in alteration of posttesticular maturation events. Some, but not all of these molecular targets have already been studied in humans, such as PHGPX, NPC2, and ApoB. The effect of hypercholesterolemia on posttesticular maturation has also been described in animals fed with high-fat diets. The inability to reproduce these results in hypercholesterolemic humans could be due to the impossibility of reproducing such a diet, to the low number of subjects included in these studies or to a lesser sensitivity of the human than mouse epididymis to high cholesterol content. Thus, large comparative and prospective studies assessing basic and extended semen parameter values, as well as capacitation, fertilization biomarkers, and IVF data in hypercholesterolemic compared with control patients are needed to comprehend better the effect of hypercholesterolemia on human male fertility and the implications for future medical intervention.

## REFERENCES

1 Orgebin-Crist MC. Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature* 1967; 216: 816–8.
2 Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 1952; 170: 326.
3 Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 697–8.
4 Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during

capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci* 1996; 1: d189–205.
5 Martínez P, Morros A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci* 1996; 1: d103–17.
6 Saez F, Ouvrier A, Drevet JR. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J Androl* 2011; 13: 11–7.
7 Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998; 59: 7–11.
8 Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 473–80.
9 Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* 2011; 13: 395–405.
10 Ferrieres J. Prévalence des différentes dyslipidémies en France. *Rev Gén Risque Cardiovasc* 2008; Availalble from: http://www.realites-cardiologiques.com. [Last accessed on 2015 May 14].
11 Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 2008; 29: 251–9.
12 Maqdasy S, Baptissart M, Vega A, Baron S, Lobaccaro JM, *et al*. Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted? *Mol Cell Endocrinol* 2013; 368: 30–46.
13 Aitken RJ, Nixon B, Lin M, Koppers AJ, Lee YH, *et al*. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl* 2007; 9: 554–64.
14 Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 7–17.
15 Parks JE, Hammerstedt RH. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod* 1985; 32: 653–68.
16 Hall JC, 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.
17 Awano M, Kawaguchi A, Mohri H. Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 375–83.
18 Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, *et al*. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod* 2006; 74: 1104–13.
19 Travis AJ, Merdiushev T, Vargas LA, Jones BH, Purdon MA, *et al*. Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Dev Biol* 2001; 240: 599–610.
20 Girouard J, Frenette G, Sullivan R. Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 2009; 80: 965–72.
21 Asano A, Nelson JL, Zhang S, Travis AJ. Characterization of the proteomes associating with three distinct membrane raft sub-types in murine sperm. *Proteomics* 2010; 10: 3494–505.
22 Travis AJ, Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 2002; 110: 731–6.
23 Lee MA, Storey BT. Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol Reprod* 1986; 34: 349–56.
24 Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, *et al*. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995; 121: 1129–37.
25 Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, *et al*. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol* 2006; 296: 353–62.
26 Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, *et al*. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995; 121: 1139–50.
27 Visconti PE, Ning X, Fornés MW, Alvarez JG, Stein P, *et al*. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 1999; 214: 429–43.
28 Baker MA, Hetherington L, Aitken RJ. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J Cell Sci* 2006; 119: 3182–92.
29 Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, *et al*. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril* 1999; 71: 919–23.
30 Naz RK. Involvement of protein tyrosine phosphorylation of human sperm in capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding. *Front Biosci* 1996; 1: d206–13.
31 Kastner P, Mark M, Leid M, Gansmuller A, Chin W, *et al*. Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev* 1996; 10: 80–92.
32 Selva DM, Hirsch-Reinshagen V, Burgess B, Zhou S, Chan J, *et al*. The ATP-binding cassette transporter 1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility. *J Lipid Res* 2004; 45: 1040–50.
33 Andersen OM, Yeung CH, Vorum H, Wellner M, Andreassen TK, *et al*. Essential role of the apolipoprotein E receptor-2 in sperm development. *J Biol Chem* 2003; 278: 23989–95.
34 Stockinger W, Brandes C, Fasching D, Hermann M, Gotthardt M, *et al*. The reelin receptor ApoER2 recruits JNK-interacting proteins-1 and -2. *J Biol Chem* 2000; 275: 25625–32.
35 Huang LS, Voyiaziakis E, Markenson DF, Sokol KA, Hayek T, *et al*. apo B gene knockout in mice results in embryonic lethality in homozygotes and neural tube defects, male infertility, and reduced HDL cholesterol ester and apo A-I transport rates in heterozygotes. *J Clin Invest* 1995; 96: 2152–61.
36 Huang LS, Voyiaziakis E, Chen HL, Rubin EM, Gordon JW. A novel functional role for apolipoprotein B in male infertility in heterozygous apolipoprotein B knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 10903–7.
37 Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, *et al*. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 1997; 277: 228–31.
38 Fan J, Akabane H, Graham SN, Richardson LL, Zhu GZ. Sperm defects in mice lacking a functional Niemann-Pick C1 protein. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 1284–91.
39 Shamsadin R, Adham IM, Nayernia K, Heinlein UA, Oberwinkler H, *et al*. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol Reprod* 1999; 61: 1445–51.
40 Cho C. Testicular and epididymal ADAMs: expression and function during fertilization. *Nat Rev Urol* 2012; 9: 550–60.
41 El-Hajjaji FZ, Oumeddour A, Pommier AJ, Ouvrier A, Viennois E, *et al*. Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 974–81.
42 Jamroz-Wisniewska A, Wójcicka G, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; 61: 760–85.
43 Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, *et al*. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998; 93: 693–704.
44 Volle DH, Lobaccaro JM. 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: 183–9.
45 Wójcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; 61: 736–59.
46 Frenoux JM, Vernet P, Volle DH, Britan A, Saez F, *et al*. Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J Mol Endocrinol* 2004; 33: 361–75.
47 Ouvrier A, Cadet R, Vernet P, Laillet B, Chardigny JM, *et al*. LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. *J Lipid Res* 2009; 50: 1766–75.
48 Saez F, Chabory E, Cadet R, Vernet P, Baron S, *et al*. Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. *Asian J Androl* 2007; 9: 574–82.
49 Ouvrier A, Alves G, Damon-Soubeyrand C, Marceau G, Cadet R, *et al*. Dietary cholesterol-induced post-testicular infertility. *PLoS One* 2011; 6: e26966.
50 Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HJ, Brown MS, *et al*. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15287–92.
51 Kirchhoff C, Osterhoff C, Young L. Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. *Biol Reprod* 1996; 54: 847–56.
52 Girouard J, Frenette G, Sullivan R. Seminal plasma proteins regulate the association of lipids and proteins within detergent-resistant membrane domains of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 2008; 78: 921–31.
53 Légaré C, Thabet M, Gatti JL, Sullivan R. HE1/NPC2 status in human reproductive tract and ejaculated spermatozoa: consequence of vasectomy. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 461–8.
54 Busso D, Oñate-Alvarado MJ, Balboa E, Castro J, Lizama C, *et al*. Spermatozoa from mice deficient in Niemann-Pick disease type C2 (NPC2) protein have defective cholesterol content and reduced *in vitro* fertilising ability. *Reprod Fertil Dev* 2014; 26: 609–21.
55 Björkgren I, Saastamoinen L, Krutskikh A, Huhtaniemi I, Poutanen M, *et al*. Dicer1 ablation in the mouse epididymis causes dedifferentiation of the epithelium and imbalance in sex steroid signaling. *PLoS One* 2012; 7: e38457.
56 Jalkanen J, Huhtaniemi I, Poutanen M. Discovery and characterization of new epididymis-specific beta-defensins in mice. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1730: 22–30.
57 Björkgren I, Gylling H, Turunen H, Huhtaniemi I, Strauss L, *et al*. Imbalanced lipid homeostasis in the conditional Dicer1 knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. *FASEB J* 2015; 29: 433–42.
58 Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, *et al*. miR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328: 1570–3.
59 Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, *et al*. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting. *Cell Metab* 2006; 3: 87–98.
60 Kolodgie FD, Katocs AS Jr, Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, *et al*. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1454–64.

61 Russell JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2006; 15: 318–30.
62 Marchiani S, Vignozzi L, Filippi S, Gurrieri B, Comeglio P, *et al.* Metabolic syndrome-associated sperm alterations in an experimental rabbit model: relation with metabolic profile, testis and epididymis gene expression and effect of tamoxifen treatment. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 401: 12–24.
63 Saez Lancellotti TE, Boarelli PV, Monclus MA, Cabrillana ME, Clementi MA, *et al.* Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. *PLoS One* 2010; 5: e13457.
64 Bataineh HN, Nusier MK. Effect of cholesterol diet on reproductive function in male albino rats. *Saudi Med J* 2005; 26: 398–404.
65 Shalaby MA, el-Zorba HY, Kamel GM. Effect of alpha-tocopherol and simvastatin on male fertility in hypercholesterolemic rats. *Pharmacol Res* 2004; 50: 137–42.
66 Mortazavi M, Salehi I, Alizadeh Z, Vahabian M, Roushandeh AM. Protective Effects of Antioxidants on Sperm Parameters and Seminiferous Tubules Epithelium in High Fat-fed Rats. *J Reprod Infertil* 2014; 15: 22–8.
67 Dobs AS, Sarma PS, Schteingart D. Long-term endocrine function in hypercholesterolemic patients treated with pravastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Metabolism* 1993; 42: 1146–52.
68 Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001; 292: 1160–4.
69 Out C, Groen AK, Brufau G. Bile acid sequestrants: more than simple resins. *Curr Opin Lipidol* 2012; 23: 43–55.
70 Purvis K, Tollefsrud A, Rui H, Haug E, Norseth J, *et al.* Short-term effects of treatment with simvastatin on testicular function in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 42: 61–4.
71 Bernini GP, Brogi G, Argenio GF, Moretti A, Salvetti A. Effects of long-term pravastatin treatment on spermatogenesis and on adrenal and testicular steroidogenesis in male hypercholesterolemic patients. *J Endocrinol Invest* 1998; 21: 310–7.
72 Dobs AS, Miller S, Neri G, Weiss S, Tate AC, *et al.* Effects of simvastatin and pravastatin on gonadal function in male hypercholesterolemic patients. *Metabolism* 2000; 49: 115–21.
73 Pons-Rejraji H, Brugnon F, Sion B, Maqdasy S, Gouby G, *et al.* Evaluation of atorvastatin efficacy and toxicity on spermatozoa, accessory glands and gonadal hormones of healthy men: a pilot prospective clinical trial. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12: 65.
74 Grizard G, Sion B, Jouanel P, Benoit P, Boucher D. Cholesterol, phospholipids and markers of the function of the accessory sex glands in the semen of men with hypercholesterolaemia. *Int J Androl* 1995; 18: 151–6.
75 Diaconu M, Tangat Y, Böhm D, Kühn H, Michelmann HW, *et al.* Failure of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in oligoasthenozoospermia and mutations in the PHGPx gene. *Andrologia* 2006; 38: 152–7.
76 Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, *et al.* Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol Reprod* 2001; 64: 674–83.
77 Shen S, Wang J, Liang J, He D. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World J Urol* 2013; 31: 1395–401.
78 Meseguer M, Garrido N, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J Androl* 2004; 25: 773–80.
79 Liu SY, Zhang CJ, Si XM, Yao YF, Shi L, *et al.* Association between single nucleotide polymorphisms of 5'-untranslated region of GPx4 gene and male infertility. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2011; 28: 270–4.
80 Peterlin B, Zorn B, Volk M, Kunej T. Association between the apolipoprotein B signal peptide gene insertion/deletion polymorphism and male infertility. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 777–9.
81 Khattri A, Pandey RK, Gupta NJ, Chakravarty B, Deenadayal M, *et al.* APOB gene signal peptide deletion polymorphism is not associated with infertility in Indian men. *J Androl* 2009; 30: 734–8.
82 Qin Y, Xia Y, Wu W, Han X, Lu C, *et al.* Genetic variants in microRNA biogenesis pathway genes are associated with semen quality in a Han-Chinese population. *Reprod Biomed Online* 2012; 24: 454–61.
83 Belleannée C, Calvo E, Thimon V, Cyr DG, Légaré C, *et al.* Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis. *PLoS One* 2012; 7: e34996.
84 Belleannée C, Légaré C, Calvo E, Thimon V, Sullivan R. microRNA signature is altered in both human epididymis and seminal microvesicles following vasectomy. *Hum Reprod* 2013; 28: 1455–67.
85 Zhou JH, Zhou QZ, Lyu XM, Zhu T, Chen ZJ, *et al.* The expression of cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) and its specific regulator miR-27b in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia. *Biol Reprod* 2015; 92: 28.
86 Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, Ye J, Yun Z. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J* 2009; 276: 2348–58.

# *Références Bibliographiques*

Abe, K., Takano, H., and Ito, T. (1983). Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. Arch. Histol. Jpn. Nihon Soshikigaku Kiroku *46*, 51–68.

Abe, K., Takano, H., and Ito, T. (1984). Interruption of the luminal flow in the epididymal duct of the corpus epididymidis in the mouse, with special reference to differentiation of the epididymal epithelium. Arch. Histol. Jpn. Nihon Soshikigaku Kiroku *47*, 137–147.

Abi Nahed, R., Martinez, G., Escoffier, J., Yassine, S., Karaouzène, T., Hograindleur, J.-P., Turk, J., Kokotos, G., Ray, P.F., Bottari, S., et al. (2016). Progesterone-induced Acrosome Exocytosis Requires Sequential Involvement of Calcium-independent Phospholipase A2β (iPLA2β) and Group X Secreted Phospholipase A2 (sPLA2). J. Biol. Chem. *291*, 3076–3089.

Adamali, H.I., and Hermo, L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. J. Androl. *17*, 208–222.

Agarwal, A., and Hoffer, A.P. (1989). Ultrastructural Studies on the Development of the Blood-Epididymis Barrier in Immature Rats. J. Androl. *10*, 425–431.

Aiello, R.J., Brees, D., and Francone, O.L. (2003). ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *23*, 972–980.

Aitken, R.J. (2004). Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. Reprod. Fertil. Dev. *16*, 655–664.

Aitken, R.J. (2011). The Capacitation-Apoptosis Highway: Oxysterols and Mammalian Sperm Function. Biol. Reprod. *85*, 9–12.

Aitken, R.J., and Baker, M.A. (2004). Oxidative stress and male reproductive biology. Reprod. Fertil. Dev. *16*, 581–588.

Akpovi, C.D., Yoon, S.R., Vitale, M.L., and Pelletier, R.-M. (2006). The predominance of one of the SR-BI isoforms is associated with increased esterified cholesterol levels not apoptosis in mink testis. J. Lipid Res. *47*, 2233–2247.

Aksoy, Y., Aksoy, H., Altinkaynak, K., Aydin, H.R., and Ozkan, A. (2006). Sperm fatty acid composition in subfertile men. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids *75*, 75–79.

Alberti, S., Schuster, G., Parini, P., Feltkamp, D., Diczfalusy, U., Rudling, M., Angelin, B., Björkhem, I., Pettersson, S., and Gustafsson, J.A. (2001). Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. J. Clin. Invest. *107*, 565–573.

Alvarez, J.G., and Storey, B.T. (1983). Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. Biol. Reprod. *29*, 548–555.

Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L., and Storey, B.T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. J. Androl. *8*, 338–348.

Alvarez de la Rosa, D., Canessa, C.M., Fyfe, G.K., and Zhang, P. (2000). Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. Annu. Rev. Physiol. *62*, 573–594.

Alvau, A., Battistone, M.A., Gervasi, M.G., Navarrete, F.A., Xu, X., Sánchez-Cárdenas, C., De la Vega-Beltran, J.L., Da Ros, V.G., Greer, P.A., Darszon, A., et al. (2016). The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. Dev. Camb. Engl. *143*, 2325–2333.

Andersen, J.M., Rønning, P.O., Herning, H., Bekken, S.D., Haugen, T.B., and Witczak, O. (2016). Fatty acid composition of spermatozoa is associated with BMI and with semen quality. Andrology *4*, 857–865.

Aonuma, S., Okabe, M., Kawaguchi, M., and Kishi, Y. (1981). Zinc effects on mouse spermatozoa and in-vitro fertilization. J. Reprod. Fertil. *63*, 463–466.

Arcelay, E., Salicioni, A.M., Wertheimer, E., and Visconti, P.E. (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. Int. J. Dev. Biol. *52*, 463–472.

Armstrong, V.L., Clulow, J., Murdoch, R.N., and Jones, R.C. (1994). Intracellular signal transduction mechanisms of rat epididymal spermatozoa and their relationship to motility and metabolism. Mol. Reprod. Dev. *38*, 77–84.

Arnoult, C., Cardullo, R.A., Lemos, J.R., and Florman, H.M. (1996). Activation of mouse sperm T-type Ca2+ channels by adhesion to the egg zona pellucida. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 13004–13009.

Arnoult, C., Kazam, I.G., Visconti, P.E., Kopf, G.S., Villaz, M., and Florman, H.M. (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 6757–6762.

Asano, A., Selvaraj, V., Buttke, D.E., Nelson, J.L., Green, K.M., Evans, J.E., and Travis, A.J. (2009). Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: Identification of three distinct sub-types of membrane rafts. J. Cell. Physiol. *218*, 537–548.

Asano, A., Nelson, J.L., Zhang, S., and Travis, A.J. (2010). Characterization of the proteomes associating with three distinct membrane raft sub-types in murine sperm. Proteomics *10*, 3494–3505.

Auboeuf, D., Rieusset, J., Fajas, L., Vallier, P., Frering, V., Riou, J.P., Staels, B., Auwerx, J., Laville, M., and Vidal, H. (1997). Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. Diabetes *46*, 1319–1327.

Aumüller, G., Renneberg, H., Schiemann, P.J., Wilhelm, B., Seitz, J., Konrad, L., and Wennemuth, G. (1997). The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. Adv. Exp. Med. Biol. *424*, 193–219.

Austin, C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res. Ser B Biol. Sci. *4*, 581–596.

Austin, C.R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. Nature *170*, 326.

Aveldaño, M.I., Rotstein, N.P., and Vermouth, N.T. (1992). Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. Biochem. J. *283 (Pt 1)*, 235–241.

Awano, M., Kawaguchi, A., and Mohri, H. (1993). Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. J. Reprod. Fertil. *99*, 375–383.

Awda, B.J., and Buhr, M.M. (2010). Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa. Biol. Reprod. *83*, 750–758.

Babcock, D.F., Rufo, G.A., and Lardy, H.A. (1983). Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *80*, 1327–1331.

Baker, M.A., and Aitken, R.J. (2004). The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. Mol. Cell. Endocrinol. *216*, 47–54.

Baker, M.A., Hetherington, L., and Aitken, R.J. (2006). Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. J. Cell Sci. *119*, 3182–3192.

Barry, E.F., Felquer, F.A., Powell, J.A., Biggs, L., Stomski, F.C., Urbani, A., Ramshaw, H., Hoffmann, P., Wilce, M.C., Grimbaldeston, M.A., et al. (2009). 14-3-3:Shc scaffolds integrate phosphoserine and phosphotyrosine signaling to regulate phosphatidylinositol 3-kinase activation and cell survival. J. Biol. Chem. *284*, 12080–12090.

Battistone, M.A., Da Ros, V.G., Salicioni, A.M., Navarrete, F.A., Krapf, D., Visconti, P.E., and Cuasnicú, P.S. (2013). Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. Mol. Hum. Reprod. *19*, 570–580.

Battistone, M.A., Alvau, A., Salicioni, A.M., Visconti, P.E., Da Ros, V.G., and Cuasnicú, P.S. (2014). Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation. Mol. Hum. Reprod. *20*, 1054–1066.

Baumgarten, H.G., Holstein, A.F., and Rosengren, E. (1971). Arrangement, ultrastructure, and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens of man. Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria 1948 *120*, 37–79.

Baxendale, R.W., and Fraser, L.R. (2005). Mammalian sperm phosphodiesterases and their involvement in receptor-mediated cell signaling important for capacitation. Mol. Reprod. Dev. *71*, 495–508.

Bearer, E.L., and Friend, D.S. (1990). Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. J. Electron Microsc. Tech. *16*, 281–297.

Beaulieu, V., Da Silva, N., Pastor-Soler, N., Brown, C.R., Smith, P.J.S., Brown, D., and Breton, S. (2005). Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H+-ATPase recycling. J. Biol. Chem. *280*, 8452–8463.

Belén Herrero, M., Chatterjee, S., Lefièvre, L., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2000). Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. Free Radic. Biol. Med. *29*, 522–536.

Belleannée, C., Thimon, V., and Sullivan, R. (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. Cell Tissue Res. *349*, 717–731.

Belleannée, C., Légaré, C., Calvo, E., Thimon, V., and Sullivan, R. (2013a). microRNA signature is altered in both human epididymis and seminal microvesicles following vasectomy. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *28*, 1455–1467.

Belleannée, C., Calvo, É., Caballero, J., and Sullivan, R. (2013b). Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. Biol. Reprod. *89*, 30.

Beuckmann, C.T., Sinton, C.M., Miyamoto, N., Ino, M., and Yanagisawa, M. (2003). N-type calcium channel alpha1B subunit (Cav2.2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 6793–6797.

Bi, J., Li, Y., Sun, F., Saalbach, A., Klein, C., Miller, D.J., Hess, R., and Nowak, R.A. (2013). Basigin null mutant male mice are sterile and exhibit impaired interactions between germ cells and Sertoli cells. Dev. Biol. *380*, 145–156.

Bielska, A.A., Olsen, B.N., Gale, S.E., Mydock-McGrane, L., Krishnan, K., Baker, N.A., Schlesinger, P.H., Covey, D.F., and Ory, D.S. (2014). Side-Chain Oxysterols Modulate Cholesterol Accessibility through Membrane Remodeling. Biochemistry (Mosc.) *53*, 3042–3051.

Björkgren, I., Saastamoinen, L., Krutskikh, A., Huhtaniemi, I., Poutanen, M., and Sipilä, P. (2012). Dicer1 ablation in the mouse epididymis causes dedifferentiation of the epithelium and imbalance in sex steroid signaling. PloS One *7*, e38457.

Björkgren, I., Gylling, H., Turunen, H., Huhtaniemi, I., Strauss, L., Poutanen, M., and Sipilä, P. (2015). Imbalanced lipid homeostasis in the conditional Dicer1 knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *29*, 433–442.

Blobel, C.P. (2000). Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. Rev. Reprod. *5*, 75.

Blobel, C.P., Myles, D.G., Primakoff, P., and White, J.M. (1990). Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. J. Cell Biol. *111*, 69–78.

Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., and White, J.M. (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. Nature *356*, 248–252.

Boerke, A., Brouwers, J.F., Olkkonen, V.M., Lest, C.H.A. van de, Sostaric, E., Schoevers, E.J., Helms, J.B., and Gadella, B.M. (2013). Involvement of Bicarbonate-Induced Radical Signaling in Oxysterol Formation and Sterol Depletion of Capacitating Mammalian Sperm During In Vitro Fertilization. Biol. Reprod. *88*, 21.

Branham, M.T., Mayorga, L.S., and Tomes, C.N. (2006). Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. J. Biol. Chem. *281*, 8656–8666.

Braun, T., and Dods, R.F. (1975). Development of a Mn-2+-sensitive, "soluble" adenylate cyclase in rat testis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *72*, 1097–1101.

Breckenridge, W.C., Gombos, G., and Morgan, I.G. (1972). The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta *266*, 695–707.

Breitbart, H., and Etkovitz, N. (2011). Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction. Asian J. Androl. *13*, 106–110.

Breitbart, H., and Finkelstein, M. (2015). Regulation of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction by PIP 2 and Actin Modulation. Asian J. Androl. *17*, 597–600.

Breitbart, H., and Spungin, B. (1997). The biochemistry of the acrosome reaction. Mol. Hum. Reprod. *3*, 195–202.

Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N.D., Naruse, M., Krähling, M., Müller, A., Kaupp, U.B., and Strünker, T. (2012). The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. EMBO J. *31*, 1654–1665.

Brooks, D.E. (1981). Metabolic activity in the epididymis and its regulation by androgens. Physiol. Rev. *61*, 515–555.

Brouwers, J.F., Boerke, A., Silva, P.F.N., Garcia-Gil, N., Gestel, R.A. van, Helms, J.B., Lest, C.H.A. van de, and Gadella, B.M. (2011). Mass Spectrometric Detection of Cholesterol Oxidation in Bovine Sperm. Biol. Reprod. *85*, 128–136.

Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M.J., and Levin, L.R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 79–84.

Buffone, M.G., Verstraeten, S.V., Calamera, J.C., and Doncel, G.F. (2009). High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. J. Androl. *30*, 552–558.

Burton, K.A., and McKnight, G.S. (2007). PKA, germ cells, and fertility. Physiol. Bethesda Md *22*, 40–46.

Busso, D., Oñate-Alvarado, M.J., Balboa, E., Castro, J., Lizama, C., Morales, G., Vargas, S., Härtel, S., Moreno, R.D., and Zanlungo, S. (2014). Spermatozoa from mice deficient in Niemann-Pick disease type C2 (NPC2) protein have defective cholesterol content and reduced in vitro fertilising ability. Reprod. Fertil. Dev. *26*, 609–621.

Caballero, J.N., Frenette, G., Belleannée, C., and Sullivan, R. (2013). CD9-Positive Microvesicles Mediate the Transfer of Molecules to Bovine Spermatozoa during Epididymal Maturation. PLoS ONE *8*.

Cai, X., and Clapham, D.E. (2008). Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSpers and CatSperbeta. PloS One *3*, e3569.

Campbell, J.M., Lane, M., Owens, J.A., and Bakos, H.W. (2015). Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. Reprod. Biomed. Online *31*, 593–604.

Capkova, J., Margaryan, H., Kubatova, A., Novak, P., and Peknicova, J. (2015). Target antigens for Hs-14 monoclonal antibody and their various expression in normozoospermic and asthenozoospermic men. Basic Clin. Androl. *25*, 11.

Carlson, A.E., Quill, T.A., Westenbroek, R.E., Schuh, S.M., Hille, B., and Babcock, D.F. (2005). Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. J. Biol. Chem. *280*, 32238–32244.

Carnegie, G.K., Means, C.K., and Scott, J.D. (2009). A-kinase anchoring proteins: from protein complexes to physiology and disease. IUBMB Life *61*, 394–406.

Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Zamore, P.D., Meissner, A., et al. (2010). Paternally-induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. Cell *143*, 1084–1096.

Carr, D.W., Usselman, M.C., and Acott, T.S. (1985). Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. Biol. Reprod. *33*, 588–595.

Carr, D.W., Fujita, A., Stentz, C.L., Liberty, G.A., Olson, G.E., and Narumiya, S. (2001). Identification of sperm-specific proteins that interact with A-kinase anchoring proteins in a manner similar to the type II regulatory subunit of PKA. J. Biol. Chem. *276*, 17332–17338.

Carrell, D.T., Liu, L., Peterson, C.M., Jones, K.P., Hatasaka, H.H., Erickson, L., and Campbell, B. (2003). Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. Arch. Androl. *49*, 49–55.

Carrera, A., Gerton, G.L., and Moss, S.B. (1994). The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. Dev. Biol. *165*, 272–284.

Carrera, A., Moos, J., Ning, X.P., Gerton, G.L., Tesarik, J., Kopf, G.S., and Moss, S.B. (1996). Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. Dev. Biol. *180*, 284–296.

Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-Berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F., and Drevet, J.R. (2010). Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. J. Anim. Sci. *88*, 1321–1331.

Chakrabarti, R., Cheng, L., Puri, P., Soler, D., and Vijayaraghavan, S. (2007). Protein phosphatase PP1 gamma 2 in sperm morphogenesis and epididymal initiation of sperm motility. Asian J. Androl. *9*, 445–452.

Chambers, T.J.G., and Richard, R.A. (2015). The impact of obesity on male fertility. Horm. Athens Greece *14*, 563–568.

Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature *168*, 697–698.

Chavarro, J.E., Toth, T.L., Wright, D.L., Meeker, J.D., and Hauser, R. (2010). Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. Fertil. Steril. *93*, 2222–2231.

Chávez, J.C., Hernández-González, E.O., Wertheimer, E., Visconti, P.E., Darszon, A., and Treviño, C.L. (2012). Participation of the Cl−/HCO3− Exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl− Channel CFTR, and the Regulatory Factor SLC9A3R1 in Mouse Sperm Capacitation. Biol. Reprod. *86*, 14.

Chen, Q., Yan, M., Cao, Z., Li, X., Zhang, Y., Shi, J., Feng, G., Peng, H., Zhang, X., Zhang, Y., et al. (2016). Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. Science *351*, 397–400.

Chen, W.Y., Xu, W.M., Chen, Z.H., Ni, Y., Yuan, Y.Y., Zhou, S.C., Zhou, W.W., Tsang, L.L., Chung, Y.W., Höglund, P., et al. (2009). Cl− Is Required for HCO3− Entry Necessary for Sperm Capacitation in Guinea Pig: Involvement of a Cl−/HCO3− Exchanger (SLC26A3) and CFTR. Biol. Reprod. *80*, 115–123.

Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R., and Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. Science *289*, 625–628.

Cheng, C.Y., and Boettcher, B. (1979). Effects of cholera toxin and 5'-guanylylimidodiphosphate on human spermatozoal adenylate cyclase activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. *91*, 1–9.

Cherr, G.N., Lambert, H., Meizel, S., and Katz, D.F. (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. Dev. Biol. *114*, 119–131.

Cho, C., Bunch, D.O., Faure, J.E., Goulding, E.H., Eddy, E.M., Primakoff, P., and Myles, D.G. (1998). Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. Science *281*, 1857–1859.

Choi, S., Na, H.S., Kim, J., Lee, J., Lee, S., Kim, D., Park, J., Chen, C.-C., Campbell, K.P., and Shin, H.-S. (2007). Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)3.2 T-type channels. Genes Brain Behav. *6*, 425–431.

Christova, Y., James, P.S., Cooper, T.G., and Jones, R. (2002). Lipid Diffusion in the Plasma Membrane of Mouse Spermatozoa: Changes During Epididymal Maturation, Effects of pH, Osmotic Pressure, and Knockout of the c-ros Gene. J. Androl. *23*, 384–392.

Chung, J.-J., Navarro, B., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (2011). A Novel Gene Required for Male Fertility and Functional CATSPER Channel Formation in Spermatozoa. Nat. Commun. *2*, 153.

Chung, J.-J., Shim, S.-H., Everley, R.A., Gygi, S.P., Zhuang, X., and Clapham, D.E. (2014). Structurally Distinct Ca2+ Signaling Domains of Sperm Flagella Orchestrate Tyrosine Phosphorylation and Motility. Cell *157*, 808–822.

Cobellis, G., Cacciola, G., Scarpa, D., Meccariello, R., Chianese, R., Franzoni, M.F., Mackie, K., Pierantoni, R., and Fasano, S. (2006). Endocannabinoid system in frog and rodent testis: type-1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase activity in male germ cells. Biol. Reprod. *75*, 82–89.

Cohen, J.P., Hoffer, A.P., and Rosen, S. (1976). Carbonic anhydrase localization in the epidimymis and testis of the rat: histochemical and biochemical analysis. Biol. Reprod. *14*, 339–346.

Cohen, R., Buttke, D.E., Asano, A., Mukai, C., Nelson, J.L., Ren, D., Miller, R.J., Cohen-Kutner, M., Atlas, D., and Travis, A.J. (2014). Lipid modulation of calcium flux through CaV2.3 regulates acrosome exocytosis and fertilization. Dev. Cell *28*, 310–321.

Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kölle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M., and Bornkamm, G.W. (2005). The nuclear form of phospholipid

hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. Mol. Cell. Biol. *25*, 7637–7644.

Cooper, T.G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. J. Reprod. Fertil. Suppl. *53*, 119–136.

Cooper, T.G., and Yeung, C.-H. (2003). Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. Microsc. Res. Tech. *61*, 28–38.

Cooper, T.G., Yeung, C.-H., Jones, R., Orgebin-Crist, M.-C., and Robaire, B. (2002). Rebuttal of a role for the epididymis in sperm quality control by phagocytosis of defective sperm. J. Cell Sci. *115*, 5–7.

Crabo, B. (1965). STUDIES ON THE COMPOSITION OF EPIDIDYMAL CONTENT IN BULLS AND BOARS. Acta Vet. Scand. *22*, SUPPL 5:1-94.

Cropley, J.E., Eaton, S.A., Aiken, A., Young, P.E., Giannoulatou, E., Ho, J.W.K., Buckland, M.E., Keam, S.P., Hutvagner, G., Humphreys, D.T., et al. (2016). Male-lineage transmission of an acquired metabolic phenotype induced by grand-paternal obesity. Mol. Metab. *5*, 699–708.

Cyr, D.G., Robaire, B., and Hermo, L. (1995). Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. Microsc. Res. Tech. *30*, 54–66.

Dacheux, J.-L., and Dacheux, F. (2014). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. Reproduction *147*, R27–R42.

Dacheux, J.-L., Gatti, J.L., and Dacheux, F. (2003). Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. Microsc. Res. Tech. *61*, 7–17.

Dalen, K.T., Ulven, S.M., Bamberg, K., Gustafsson, J.-A., and Nebb, H.I. (2003). Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. J. Biol. Chem. *278*, 48283–48291.

D'Amours, O., Frenette, G., Bordeleau, L.-J., Allard, N., Leclerc, P., Blondin, P., and Sullivan, R. (2012). Epididymosomes Transfer Epididymal Sperm Binding Protein 1 (ELSPBP1) to Dead Spermatozoa During Epididymal Transit in Bovine. Biol. Reprod. *87*, 94.

Darszon, A., Acevedo, J.J., Galindo, B.E., Hernández-González, E.O., Nishigaki, T., Treviño, C.L., Wood, C., and Beltrán, C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. Reproduction *131*, 977–988.

Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., and Treviño, C.L. (2011). Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. Physiol. Rev. *91*, 1305–1355.

Davies, M.J., Moore, V.M., Willson, K.J., Van Essen, P., Priest, K., Scott, H., Haan, E.A., and Chan, A. (2012). Reproductive technologies and the risk of birth defects. N. Engl. J. Med. *366*, 1803–1813.

Davis, H.R., Lowe, R.S., and Neff, D.R. (2011). Effects of ezetimibe on atherosclerosis in preclinical models. Atherosclerosis *215*, 266–278.

Della Giovampaola, C., Flori, F., Sabatini, L., Incerti, L., La Sala, G.B., Rosati, F., and Focarelli, R. (2001). Surface of human sperm bears three differently charged CD52 forms, two of which remain stably bound to sperm after capacitation. Mol. Reprod. Dev. *60*, 89–96.

Demarco, I.A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De La Vega-Beltran, J.L., Hockensmith, J.W., Kopf, G.S., Darszon, A., and Visconti, P.E. (2003). Involvement of a Na+/HCO-3 cotransporter in mouse sperm capacitation. J. Biol. Chem. *278*, 7001–7009.

Demott, R.P., and Suarez, S.S. (1992). Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. Biol. Reprod. *46*, 779–785.

Diekman, A.B. (2003). Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? Cell. Mol. Life Sci. CMLS *60*, 298–308.

Diekman, A.B., Norton, E.J., Klotz, K.L., Westbrook, V.A., and Herr, J.C. (1999). Evidence for a unique N-linked glycan associated with human infertility on sperm CD52: a candidate contraceptive vaccinogen. Immunol. Rev. *171*, 203–211.

Dohadwala, M., da Cruz e Silva, E.F., Hall, F.L., Williams, R.T., Carbonaro-Hall, D.A., Nairn, A.C., Greengard, P., and Berndt, N. (1994). Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 6408–6412.

Dougherty, M.K., and Morrison, D.K. (2004). Unlocking the code of 14-3-3. J. Cell Sci. *117*, 1875–1884.

Duan, B., Davis, R., Sadat, E.L., Collins, J., Sternweis, P.C., Yuan, D., and Jiang, L.I. (2010). Distinct roles of adenylyl cyclase VII in regulating the immune responses in mice. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 335–344.

Dufaure, J.P., Lareyre, J.J., Schwaab, V., Mattei, M.G., and Drevet, J.R. (1996). Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie *319*, 559–568.

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. Biochimie *86*, 839–848.

Ehrenwald, E., Foote, R.H., and Parks, J.E. (1990). Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. Mol. Reprod. Dev. *25*, 195–204.

Eisenberg, M.L., Kim, S., Chen, Z., Sundaram, R., Schisterman, E.F., and Buck Louis, G.M. (2014). The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *29*, 193–200.

Ekstedt, E., Holm, L., and Ridderstråle, Y. (2004). Carbonic Anhydrase in Mouse Testis and Epididymis; Transfer of Isozyme IV to Spermatozoa During Passage. J. Mol. Histol. *35*, 167–173.

Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., et al. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. Cell Metab. *3*, 87–98.

Escoffier, J., Jemel, I., Tanemoto, A., Taketomi, Y., Payre, C., Coatrieux, C., Sato, H., Yamamoto, K., Masuda, S., Pernet-Gallay, K., et al. (2010). Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. J. Clin. Invest. *120*, 1415–1428.

Escoffier, J., Krapf, D., Navarrete, F., Darszon, A., and Visconti, P.E. (2012). Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. J. Cell Sci. *125*, 473–485.

Esposito, G., Jaiswal, B.S., Xie, F., Krajnc-Franken, M.A.M., Robben, T.J.A.A., Strik, A.M., Kuil, C., Philipsen, R.L.A., van Duin, M., Conti, M., et al. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 2993–2998.

Evans, R.W., and Setchell, B.P. (1979). Lipid changes in boar spermatozoa during epididymal maturation with some observations on the flow and composition of boar rete testis fluid. J. Reprod. Fertil. *57*, 189–196.

Evans, R.W., Weaver, D.E., and Clegg, E.D. (1980). Diacyl, alkenyl, and alkyl ether phospholipids in ejaculated, in utero-, and in vitro-incubated porcine spermatozoa. J. Lipid Res. *21*, 223–228.

Evgeni, E., Charalabopoulos, K., and Asimakopoulos, B. (2014). Human Sperm DNA Fragmentation and its Correlation with Conventional Semen Parameters. J. Reprod. Infertil. *15*, 2–14.

Ferrieres, J. (2008). Prévalence des différentes dyslipidémies en France. Rev Gén Risque Cardiovasc.

Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V.A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., Marto, J.A., Shabanowitz, J., Herr, J.C., Hunt, D.F., et al. (2003). Phosphoproteome Analysis of Capacitated Human Sperm evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. J. Biol. Chem. *278*, 11579–11589.

Fisch, J.D., Behr, B., and Conti, M. (1998). Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *13*, 1248–1254.

Fleming, A.D., and Yanagimachi, R. (1984). Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. J. Exp. Zool. *229*, 485–489.

Florman, H.M., and Storey, B.T. (1982). Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. Dev. Biol. *91*, 121–130.

Florman, H.M., Jungnickel, M.K., and Sutton, K.A. (2004). Regulating the acrosome reaction. Int. J. Dev. Biol. *52*, 503–510.

Forte, L.R., Bylund, D.B., and Zahler, W.L. (1983). Forskolin does not activate sperm adenylate cyclase. Mol. Pharmacol. *24*, 42–47.

Fraser, L.R. (1987). Minimum and maximum extracellular Ca2+ requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. J. Reprod. Fertil. *81*, 77–89.

Fraser, L.R., and Dudley, K. (1999). New insights into the t-complex and control of sperm function. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *21*, 304–312.

Frenette, G., Lessard, C., and Sullivan, R. (2002). Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. Biol. Reprod. *67*, 308–313.

Frenette, G., Lessard, C., and Sullivan, R. (2004). Polyol pathway along the bovine epididymis. Mol. Reprod. Dev. *69*, 448–456.

Frenette, G., Girouard, J., and Sullivan, R. (2006). Comparison Between Epididymosomes Collected in the Intraluminal Compartment of the Bovine Caput and Cauda Epididymidis. Biol. Reprod. *75*, 885–890.

Frenoux, J.-M., Vernet, P., Volle, D.H., Britan, A., Saez, F., Kocer, A., Henry-Berger, J., Mangelsdorf, D.J., Lobaccaro, J.-M.A., and Drevet, J.R. (2004). Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. J. Mol. Endocrinol. *33*, 361–375.

Friend, D.S., and Gilula, N.B. (1972). VARIATIONS IN TIGHT AND GAP JUNCTIONS IN MAMMALIAN TISSUES. J. Cell Biol. *53*, 758–776.

Fujinoki, M., Kawamura, T., Toda, T., Ohtake, H., Ishimoda-Takagi, T., Shimizu, N., Yamaoka, S., and Okuno, M. (2003). Identification of 36-kDa flagellar phosphoproteins associated with hamster sperm motility. J. Biochem. (Tokyo) *133*, 361–369.

Furland, N.E., Oresti, G.M., Antollini, S.S., Venturino, A., Maldonado, E.N., and Aveldaño, M.I. (2007). Very long-chain polyunsaturated fatty acids are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. J. Biol. Chem. *282*, 18151–18161.

Gadella, B.M., and Boerke, A. (2016). An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. Theriogenology *85*, 113–124.

Gadella, B.M., and Harrison, R.A. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. Dev. Camb. Engl. *127*, 2407–2420.

Gadella, B.M., Tsai, P.-S., Boerke, A., and Brewis, I.A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. Int. J. Dev. Biol. *52*, 473–480.

Galantino-Homer, H.L., Visconti, P.E., and Kopf, G.S. (1997). Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. Biol. Reprod. *56*, 707–719.

Garbers, D.L., Tubb, D.J., and Hyne, R.V. (1982). A requirement of bicarbonate for Ca2+-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. J. Biol. Chem. *257*, 8980–8984.

Garcia, M.A., and Meizel, S. (1999). Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na+/H+ exchanger. Mol. Reprod. Dev. *52*, 189–195.

Gatti, J.-L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V., and Dacheux, J.-L. (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. Anim. Reprod. Sci. *82–83*, 321–339.

Gerdes, L.U., Gerdes, C., Hansen, P.S., Klausen, I.C., and Faergeman, O. (1996). Are men carrying the apolipoprotein epsilon 4- or epsilon 2 allele less fertile than epsilon 3 epsilon 3 genotypes? Hum. Genet. *98*, 239–242.

Gervasi, M.G., and Visconti, P.E. (2016). Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. Mol. Reprod. Dev.

van Gestel, R.A., Brewis, I.A., Ashton, P.R., Helms, J.B., Brouwers, J.F., and Gadella, B.M. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. Mol. Hum. Reprod. *11*, 583–590.

Geussova, G., Kalab, P., and Peknicova, J. (2002). Valosine containing protein is a substrate of cAMP-activated boar sperm tyrosine kinase. Mol. Reprod. Dev. *63*, 366–375.

Gilks, C.B., Reid, P.E., Clement, P.B., and Owen, D.A. (1989). Histochemical changes in cervical mucus-secreting epithelium during the normal menstrual cycle. Fertil. Steril. *51*, 286–291.

Gincel, D., Zaid, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. Biochem. J. *358*, 147–155.

Girouard, J., Frenette, G., and Sullivan, R. (2009). Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. Biol. Reprod. *80*, 965–972.

Girouard, J., Frenette, G., and Sullivan, R. (2011). Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. Int. J. Androl. *34*, e475-486.

Gliozzi, T.M., Zaniboni, L., Maldjian, A., Luzi, F., Maertens, L., and Cerolini, S. (2009). Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. Theriogenology *71*, 910–919.

González-Fernández, L., Macías-García, B., Loux, S.C., Varner, D.D., and Hinrichs, K. (2013). Focal adhesion kinases and calcium/calmodulin-dependent protein kinases regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. Biol. Reprod. *88*, 138.

González-Martínez, M.T. (2003). Induction of a Sodium-dependent Depolarization by External Calcium Removal in Human Sperm. J. Biol. Chem. *278*, 36304–36310.

Goodson, S.G., Qiu, Y., Sutton, K.A., Xie, G., Jia, W., and O'Brien, D.A. (2012). Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. Biol. Reprod. *87*, 75.

Gopalakrishnan, B., and Shaha, C. (1998). Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. FEBS Lett. *422*, 296–300.

Gorgas, K., Teigler, A., Komljenovic, D., and Just, W.W. (2006). The ether lipid-deficient mouse: tracking down plasmalogen functions. Biochim. Biophys. Acta *1763*, 1511–1526.

Grandjean, V., Fourré, S., De Abreu, D.A.F., Derieppe, M.-A., Remy, J.-J., and Rassoulzadegan, M. (2015). RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. Sci. Rep. *5*.

Greger, R., Schreiber, R., Mall, M., Wissner, A., Hopf, A., Briel, M., Bleich, M., Warth, R., and Kunzelmann, K. (2001). Cystic fibrosis and CFTR. Pflugers Arch. *443 Suppl 1*, S3-7.

Griffiths, G.S., Galileo, D.S., Reese, K., and Martin-Deleon, P.A. (2008). Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. Mol. Reprod. Dev. *75*, 1627–1636.

Griffiths, G.S., Galileo, D.S., Aravindan, R.G., and Martin-DeLeon, P.A. (2009). Clusterin facilitates exchange of glycosyl phosphatidylinositol-linked SPAM1 between reproductive luminal fluids and mouse and human sperm membranes. Biol. Reprod. *81*, 562–570.

Griveau, J.F., Renard, P., and Le Lannou, D. (1994). An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. Int. J. Androl. *17*, 300–307.

Guggino, W.B., and Stanton, B.A. (2006). New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 426–436.

Haidl, G., and Opper, C. (1997). Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *12*, 2720–2723.

Hammoud, A.O., Gibson, M., Peterson, C.M., Meikle, A.W., and Carrell, D.T. (2008). Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. Fertil. Steril. *90*, 897–904.

Hansen, M., Kurinczuk, J.J., Bower, C., and Webb, S. (2002). The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. N. Engl. J. Med. *346*, 725–730.

Harrison, R. a. P. (2004). Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. Mol. Reprod. Dev. *67*, 337–352.

Hermo, L., Dworkin, J., and Oko, R. (1988). Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. Am. J. Anat. *183*, 107–124.

Hermo, L., Oko, R., and Morales, C.R. (1994). Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. Int. Rev. Cytol. *154*, 106–189.

Hermo, L., Chong, D.L., Moffatt, P., Sly, W.S., Waheed, A., and Smith, C.E. (2005). Region- and cell-specific differences in the distribution of carbonic anhydrases II, III, XII, and XIV in the adult rat epididymis. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *53*, 699–713.

Hernández-González, E.O., Sosnik, J., Edwards, J., Acevedo, J.J., Mendoza-Lujambio, I., López-González, I., Demarco, I., Wertheimer, E., Darszon, A., and Visconti, P.E. (2006). Sodium and Epithelial Sodium Channels Participate in the Regulation of the Capacitation-associated Hyperpolarization in Mouse Sperm. J. Biol. Chem. *281*, 5623–5633.

Hernández-González, E.O., Treviño, C.L., Castellano, L.E., Vega-Beltrán, J.L. de la, Ocampo, A.Y., Wertheimer, E., Visconti, P.E., and Darszon, A. (2007). Involvement of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Mouse Sperm Capacitation. J. Biol. Chem. *282*, 24397–24406.

Herrero, M.B., Goin, J.C., Boquet, M., Canteros, M.G., Franchi, A.M., Perez Martinez, S., Polak, J.M., Viggiano, J.M., and Gimeno, M.A. (1997). The nitric oxide synthase of mouse spermatozoa. FEBS Lett. *411*, 39–42.

Hess, K.C., Jones, B.H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T.S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J.H., Kopf, G.S., Suarez, S.S., et al. (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. Dev. Cell *9*, 249–259.

Hess, R.A., Bunick, D., Lee, K.H., Bahr, J., Taylor, J.A., Korach, K.S., and Lubahn, D.B. (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. Nature *390*, 509–512.

Hildebrand, M.S., Avenarius, M.R., Fellous, M., Zhang, Y., Meyer, N.C., Auer, J., Serres, C., Kahrizi, K., Najmabadi, H., Beckmann, J.S., et al. (2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. Eur. J. Hum. Genet. EJHG *18*, 1178–1184.

Hillman, P., Ickowicz, D., Vizel, R., and Breitbart, H. (2013). Dissociation between AKAP3 and PKARII promotes AKAP3 degradation in sperm capacitation. PloS One *8*, e68873.

Hino, T., Muro, Y., Tamura-Nakano, M., Okabe, M., Tateno, H., and Yanagimachi, R. (2016). The Behavior and Acrosomal Status of Mouse Spermatozoa In Vitro, and Within the Oviduct During Fertilization after Natural Mating. Biol. Reprod. *95*, 50.

Hinsch, K.D., Hinsch, E., Meinecke, B., Töpfer-Petersen, E., Pfisterer, S., and Schill, W.B. (1994). Identification of mouse ZP3 protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZP3 peptides. Biol. Reprod. *51*, 193–204.

Hinsch, K.D., Asmarinah, null, Hinsch, E., and Konrad, L. (2001). VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. Biochim. Biophys. Acta *1518*, 329–333.

Hinsch, K.-D., De Pinto, V., Aires, V.A., Schneider, X., Messina, A., and Hinsch, E. (2004). Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. J. Biol. Chem. *279*, 15281–15288.

Hinton, B.T. (1985). Physiological aspects of the blood-epididymis barrier. In Male fertility and its regulation (Boston: Lobl TJ, Hafez ESE).

Hinton, B.T., and Palladino, M.A. (1995). Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. Microsc. Res. Tech. *30*, 67–81.

Hinton, B.T., Lan, Z.J., Rudolph, D.B., Labus, J.C., and Lye, R.J. (1998). Testicular regulation of epididymal gene expression. J. Reprod. Fertil. Suppl. *53*, 47–57.

Hoffer, A.P., Hamilton, D.W., and Fawcett, D.W. (1973). The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. Anat. Rec. *175*, 169–201.

Holland, M.K., and Orgebin-Crist, M.C. (1988). Characterization and hormonal regulation of protein synthesis by the murine epididymis. Biol. Reprod. *38*, 487–496.

von Horsten, H.H., Derr, P., and Kirchhoff, C. (2002). Novel antimicrobial peptide of human epididymal duct origin. Biol. Reprod. *67*, 804–813.

Huang, L.S., Voyiaziakis, E., Markenson, D.F., Sokol, K.A., Hayek, T., and Breslow, J.L. (1995). apo B gene knockout in mice results in embryonic lethality in homozygotes and neural tube defects, male infertility, and reduced HDL cholesterol ester and apo A-I transport rates in heterozygotes. J. Clin. Invest. *96*, 2152–2161.

Huang, L.S., Voyiaziakis, E., Chen, H.L., Rubin, E.M., and Gordon, J.W. (1996). A novel functional role for apolipoprotein B in male infertility in heterozygous apolipoprotein B knockout mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 10903–10907.

Huang, S.J., Leung, A.Y., Fu, W.O., Chung, Y.W., Zhou, T.S., Chan, P.S., and Wong, P.Y. (1992). Electrophysiological studies of anion secretion in cultured human epididymal cells. J. Physiol. *455*, 455–469.

Huang, S.J., Fu, W.O., Chung, Y.W., Zhou, T.S., and Wong, P.Y. (1993). Properties of cAMP-dependent and Ca(2+)-dependent whole cell Cl- conductances in rat epididymal cells. Am. J. Physiol. *264*, C794-802.

Huang, Z., Myers, K., Khatra, B., and Vijayaraghavan, S. (2004). Protein 14-3-3zeta binds to protein phosphatase PP1gamma2 in bovine epididymal spermatozoa. Biol. Reprod. *71*, 177–184.

Ickowicz, D., Finkelstein, M., and Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. Asian J. Androl. *14*, 816–821.

Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A.M., and Okabe, M. (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. J. Clin. Invest. *120*, 984–994.

Infante, R.E., Wang, M.L., Radhakrishnan, A., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2008). NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 15287–15292.

Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., and Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. Nature *434*, 234–238.

Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M., and Yanagimachi, R. (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 20008–20011.

Itach, S.B.-S., Finklestein, M., Etkovitz, N., and Breitbart, H. (2012). Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by Phospholipase D-dependent actin polymerization. Dev. Biol. *362*, 154–161.

Jafaroghli, M., Abdi-Benemar, H., Zamiri, M.J., Khalili, B., Farshad, A., and Shadparvar, A.A. (2014). Effects of dietary n-3 fatty acids and vitamin C on semen characteristics, lipid composition of sperm and blood metabolites in fat-tailed Moghani rams. Anim. Reprod. Sci. *147*, 17–24.

Jagan Mohanarao, G., and Atreja, S.K. (2011). Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (Bubalus bubalis) and cattle spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. *123*, 40–47.

Jagan Mohanarao, G., and Atreja, S.K. (2012). Identification of NO induced and capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa. Res. Vet. Sci. *93*, 618–623.

Jaiswal, B.S., and Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. *100*, 10676–10681.

Jalkanen, J., Huhtaniemi, I., and Poutanen, M. (2005). Discovery and characterization of new epididymis-specific beta-defensins in mice. Biochim. Biophys. Acta *1730*, 22–30.

Jensen, L.J., Schmitt, B.M., Berger, U.V., Nsumu, N.N., Boron, W.F., Hediger, M.A., Brown, D., and Breton, S. (1999). Localization of sodium bicarbonate cotransporter (NBC) protein and messenger ribonucleic acid in rat epididymis. Biol. Reprod. *60*, 573–579.

Jimenez, T., Sánchez, G., Wertheimer, E., and Blanco, G. (2010). Activity of the Na,K-ATPase alpha4 isoform is important for membrane potential, intracellular Ca2+, and pH to maintain motility in rat spermatozoa. Reprod. Camb. Engl. *139*, 835–845.

Jimenez, T., McDermott, J.P., Sánchez, G., and Blanco, G. (2011). Na,K-ATPase alpha4 isoform is essential for sperm fertility. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 644–649.

Jimenez, T., Sánchez, G., and Blanco, G. (2012). Activity of the Na,K-ATPase α4 isoform is regulated during sperm capacitation to support sperm motility. J. Androl. *33*, 1047–1057.

Jin, J., Smith, F.D., Stark, C., Wells, C.D., Fawcett, J.P., Kulkarni, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Taylor, P., Taylor, L., et al. (2004). Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. Curr. Biol. CB *14*, 1436–1450.

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K., and Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 4892–4896.

Joffres, M., Shields, M., Tremblay, M.S., and Connor Gorber, S. (2013). Dyslipidemia prevalence, treatment, control, and awareness in the Canadian Health Measures Survey. Can J Public Health *104*, e252–7.

Johnson, A.L., and Howards, S.S. (1975). Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after vasectomy. Am. J. Physiol. *228*, 556–564.

Johnston, D.S., Jelinsky, S.A., Bang, H.J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G.S., and Turner, T.T. (2005). The Mouse Epididymal Transcriptome: Transcriptional Profiling of Segmental Gene Expression in the Epididymis. Biol. Reprod. *73*, 404–413.

Jones, R. (2002). Plasma membrane composition and organisation during maturation of spermatozoa in the epididymis. In: The epididymis: from molecules to clinical practice. (B. Robaire and B.T. Hinton).

Jones, R., Mann, T., and Sherins, R.J. (1978). Adverse Effects of Peroxidized Lipid on Human Spermatozoa. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. *201*, 413–417.

Jones, R., Brown, C.R., Von Glós, K.I., and Parker, M.G. (1980). Hormonal regulation of protein synthesis in the rat epididymis. Characterization of androgen-dependent and testicular fluid-dependent proteins. Biochem. J. *188*, 667–676.

Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N., et al. (2002). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 7604–7609.

Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. Nat. Med. *9*, 213–219.

Kalaany, N.Y., Gauthier, K.C., Zavacki, A.M., Mammen, P.P.A., Kitazume, T., Peterson, J.A., Horton, J.D., Garry, D.J., Bianco, A.C., and Mangelsdorf, D.J. (2005). LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. Cell Metab. *1*, 231–244.

Kalab, P., Peknicová, J., Geussová, G., and Moos, J. (1998). Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. Mol. Reprod. Dev. *51*, 304–314.

Kasturi, S.S., Tannir, J., and Brannigan, R.E. (2008). The metabolic syndrome and male infertility. J. Androl. *29*, 251–259.

Katari, S., Turan, N., Bibikova, M., Erinle, O., Chalian, R., Foster, M., Gaughan, J.P., Coutifaris, C., and Sapienza, C. (2009). DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. Hum. Mol. Genet. *18*, 3769–3778.

Keber, R., Rozman, D., and Horvat, S. (2013). Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. J. Lipid Res. *54*, 20–33.

Kelley, N.S., Yoshida, Y., and Erickson, K.L. (2014). Do n-3 polyunsaturated fatty acids increase or decrease lipid peroxidation in humans? Metab. Syndr. Relat. Disord. *12*, 403–415.

Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldán, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., and Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. Cell Metab. *1*, 121–131.

Kerns, K., Morales, P., and Sutovsky, P. (2016). Regulation of Sperm Capacitation by the 26S Proteasome: An Emerging New Paradigm in Spermatology. Biol. Reprod. *94*, 117.

Kim, D., and Steward, M.C. (2009). The role of CFTR in bicarbonate secretion by pancreatic duct and airway epithelia. J. Med. Investig. JMI *56 Suppl*, 336–342.

Kim, B., Roy, J., Shum, W.W.C., Da Silva, N., and Breton, S. (2015). Role of testicular luminal factors on Basal cell elongation and proliferation in the mouse epididymis. Biol. Reprod. *92*, 9.

Kirchhoff, C. (1996). CD52 is the "major maturation-associated" sperm membrane antigen. Mol. Hum. Reprod. *2*, 9–17.

Kirchhoff, C., and Schröter, S. (2001). New insights into the origin, structure and role of CD52: a major component of the mammalian sperm glycocalyx. Cells Tissues Organs *168*, 93–104.

Kirchhoff, C., Habben, I., Ivell, R., and Krull, N. (1991). A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. Biol. Reprod. *45*, 350–357.

Kirchhoff, C., Osterhoff, C., and Young, L. (1996). Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. Biol. Reprod. *54*, 847–856.

Kirichok, Y., Navarro, B., and Clapham, D.E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca2+ channel. Nature *439*, 737–740.

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem. J. *351 Pt 2*, 289–305.

Kolodgie, F.D., Katocs, A.S., Largis, E.E., Wrenn, S.M., Cornhill, J.F., Herderick, E.E., Lee, S.J., and Virmani, R. (1996). Hypercholesterolemia in the Rabbit Induced by Feeding Graded Amounts of Low-Level Cholesterol Methodological Considerations Regarding Individual Variability in Response to Dietary Cholesterol and Development of Lesion Type. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *16*, 1454–1464.

Kota, V., Dhople, V.M., and Shivaji, S. (2009). Tyrosine phosphoproteome of hamster spermatozoa: role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in sperm capacitation. Proteomics *9*, 1809–1826.

Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E.V., Sanjay, A., Pilder, S.H., Salicioni, A.M., and Visconti, P.E. (2010). Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. J. Biol. Chem. *285*, 7977–7985.

Krisfalusi, M., Miki, K., Magyar, P.L., and O'Brien, D.A. (2006). Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. Biol. Reprod. *75*, 270–278.

Kujala, M., Hihnala, S., Tienari, J., Kaunisto, K., Hästbacka, J., Holmberg, C., Kere, J., and Höglund, P. (2007). Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. Reprod. Camb. Engl. *133*, 775–784.

Kumar, P.N., Aruldhas, M.M., and Juneja, S.C. (1996). Influence of hyperthyroidism induced at prepuberty on the epididymal lipids, number and motility of spermatozoa in rats. Reprod. Fertil. Dev. *8*, 373–378.

Kumar, R., Singh, V.K., and Atreja, S.K. (2014). Glutathione-S-transferase: role in buffalo (Bubalus bubalis) sperm capacitation and cryopreservation. Theriogenology *81*, 587–598.

Kusumi, A., and Suzuki, K. (2005). Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. *1746*, 234–251.

Kwon, W.-S., Park, Y.-J., Mohamed, E.-S.A., and Pang, M.-G. (2013). Voltage-dependent anion channels are a key factor of male fertility. Fertil. Steril. *99*, 354–361.

Kwon, Y.G., Lee, S.Y., Choi, Y., Greengard, P., and Nairn, A.C. (1997). Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 2168–2173.

La Spina, F.A., Puga Molina, L.C., Romarowski, A., Vitale, A.M., Falzone, T.L., Krapf, D., Hirohashi, N., and Buffone, M.G. (2016). Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. Dev. Biol. *411*, 172–182.

Ladha, S. (1998). Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. J. Membr. Biol. *165*, 1–10.

Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 507–512.

Laffitte, B.A., Chao, L.C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S.B., Castrillo, A., Wilpitz, D.C., Mangelsdorf, D.J., Collins, J.L., et al. (2003). 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. *100*, 5419–5424.

de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2002). The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. Mol. Hum. Reprod. *8*, 124–135.

de Lamirande, E., Harakat, A., and Gagnon, C. (1998). Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. J. Androl. *19*, 215–225.

Langlais, J., Zollinger, M., Plante, L., Chapdelaine, A., Bleau, G., and Roberts, K.D. (1981). Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *78*, 7266–7270.

Laprise, S.L. (2009). Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies. Mol. Reprod. Dev. *76*, 1006–1018.

Lavoie, C., Chevet, E., Roy, L., Tonks, N.K., Fazel, A., Posner, B.I., Paiement, J., and Bergeron, J.J. (2000). Tyrosine phosphorylation of p97 regulates transitional endoplasmic reticulum assembly in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 13637–13642.

Lax, Y., Rubinstein, S., and Breitbart, H. (1994). Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. FEBS Lett. *339*, 234–238.

Leahy, T., and Gadella, B.M. (2015). New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. Asian J. Androl. *17*, 561–567.

Leclerc, P., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1996). Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. Biol. Reprod. *55*, 684–692.

Leclerc, P., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1997). Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. Free Radic. Biol. Med. *22*, 643–656.

Lee, M.A., and Storey, B.T. (1986). Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. Biol. Reprod. *34*, 349–356.

Legault, Y., Bouthillier, M., Bleau, G., Chapdelaine, A., and Roberts, K.D. (1979). The sterol and sterol sulfate content of the male hamster reproductive tract. Biol. Reprod. *20*, 1213–1219.

Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., Lombardo, F., Terminali, O., Passi, S., and Dondero, F. (1994). Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *9*, 2044–2050.

Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., and Dondero, F. (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. Hum. Reprod. Update *2*, 246–256.

Lesich, K.A., dePinho, T.G., Dionne, B.J., and Lindemann, C.B. (2014). The effects of Ca2+ and ADP on dynein switching during the beat cycle of reactivated bull sperm models. Cytoskelet. Hoboken NJ *71*, 611–627.

Lessig, J., and Fuchs, B. (2009). Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. Curr. Med. Chem. *16*, 2021–2041.

Lewis, S.E.M., Agbaje, I., and Alvarez, J. (2008). Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. Syst. Biol. Reprod. Med. *54*, 111–125.

Liévano, A., Santi, C.M., Serrano, C.J., Treviño, C.L., Bellvé, A.R., Hernández-Cruz, A., and Darszon, A. (1996). T-type Ca2+ channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. FEBS Lett. *388*, 150–154.

Lin, Y., and Kan, F.W. (1996). Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. Biol. Reprod. *55*, 1133–1146.

Lin, D.S., Connor, W.E., Wolf, D.P., Neuringer, M., and Hachey, D.L. (1993). Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid. J. Lipid Res. *34*, 491–499.

Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Fedorenko, A., and Kirichok, Y. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. Cell *140*, 327–337.

Lishko, P.V., Botchkina, I.L., and Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca2+ channel of human sperm. Nature *471*, 387–391.

Litvin, T.N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J., and Levin, L.R. (2003). Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. J. Biol. Chem. *278*, 15922–15926.

Liu, B., Wang, P., Wang, Z., and Zhang, W. (2011). The Use of Anti-VDAC2 Antibody for the Combined Assessment of Human Sperm Acrosome Integrity and Ionophore A23187-Induced Acrosome Reaction. PLoS ONE *6*.

Liu, J., Xia, J., Cho, K.-H., Clapham, D.E., and Ren, D. (2007). CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex. J. Biol. Chem. *282*, 18945–18952.

Liu, Q., Zhou, Y.F., Duan, R.J., Wei, H.K., Jiang, S.W., and Peng, J. (2015). Effects of dietary n-6:n-3 fatty acid ratio and vitamin E on semen quality, fatty acid composition and antioxidant status in boars. Anim. Reprod. Sci. *162*, 11–19.

Liu, T., Huang, J.-C., Zuo, W.-L., Lu, C.-L., Chen, M., Zhang, X.-S., Li, Y.-C., Cai, H., Zhou, W.-L., Hu, Z.-Y., et al. (2010). A novel testis-specific Na+/H+ exchanger is involved in sperm motility and fertility. Front. Biosci. Elite Ed. *2*, 566–581.

Livera, G., Xie, F., Garcia, M.A., Jaiswal, B., Chen, J., Law, E., Storm, D.R., and Conti, M. (2005). Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *19*, 1277–1290.

López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C.M., Darszon, A., and Treviño, C.L. (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. Mol. Hum. Reprod. *20*, 619–629.

Lu, Y., Wang, N., and Jin, F. (2013). Long-term follow-up of children conceived through assisted reproductive technology. J. Zhejiang Univ. Sci. B *14*, 359–371.

Luconi, M., Carloni, V., Marra, F., Ferruzzi, P., Forti, G., and Baldi, E. (2004). Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A. J. Cell Sci. *117*, 1235–1246.

Lum, L., and Blobel, C.P. (1997). Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin. Dev. Biol. *191*, 131–145.

Luna, C., Colás, C., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., and Muiño-Blanco, T. (2012). A novel epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated MAP kinase cascade involved in sperm functionality in sheep. Biol. Reprod. *87*, 93.

Maccarrone, M., Barboni, B., Paradisi, A., Bernabò, N., Gasperi, V., Pistilli, M.G., Fezza, F., Lucidi, P., and Mattioli, M. (2005). Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. J. Cell Sci. *118*, 4393–4404.

Madeo, F., Schlauer, J., Zischka, H., Mecke, D., and Fröhlich, K.U. (1998). Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. Mol. Biol. Cell *9*, 131–141.

Mahley, R.W., and Rall, S.C. (2000). Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. *1*, 507–537.

Mahony, M.C., and Gwathmey, T. (1999). Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) spermatozoa. Biol. Reprod. *60*, 1239–1243.

Mangialavori, I.C., Corradi, G., Rinaldi, D.E., de la Fuente, M.C., Adamo, H.P., and Rossi, J.P.F.C. (2012). Autoinhibition mechanism of the plasma membrane calcium pump isoforms 2 and 4 studied through lipid–protein interaction. Biochem. J. *443*, 125–131.

Mannowetz, N., Wandernoth, P.M., and Wennemuth, G. (2012). Glucose is a pH-dependent motor for sperm beat frequency during early activation. PloS One *7*, e41030.

Marín-Briggiler, C.I., Jha, K.N., Chertihin, O., Buffone, M.G., Herr, J.C., Vazquez-Levin, M.H., and Visconti, P.E. (2005). Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. J. Cell Sci. *118*, 2013–2022.

Martin-DeLeon, P.A. (2006). Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. Mol. Cell. Endocrinol. *250*, 114–121.

Martínez, P., and Morros, A. (1996). Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *1*, d103-117.

Martínez-García, F., Regadera, J., Cobo, P., Palacios, J., Paniagua, R., and Nistal, M. (1995). The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. Andrologia *27*, 195–206.

Martínez-López, P., Santi, C.M., Treviño, C.L., Ocampo-Gutiérrez, A.Y., Acevedo, J.J., Alisio, A., Salkoff, L.B., and Darszon, A. (2009). Mouse sperm K+ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. Biochem. Biophys. Res. Commun. *381*, 204–209.

Martínez-Soto, J.C., Landeras, J., and Gadea, J. (2013). Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. Andrology *1*, 365–375.

Martini, A.C., Tissera, A., Estofán, D., Molina, R.I., Mangeaud, A., de Cuneo, M.F., and Ruiz, R.D. (2010). Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. Fertil. Steril. *94*, 1739–1743.

Mawson, C.A., and Fischer, M.I. (1951). Zinc content of the genital organs of the rat. Nature *167*, 859.

McPherson, N.O., and Lane, M. (2015). Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? Asian J. Androl. *17*, 450–458.

Meistrich, M.L., Hughes, T.H., and Bruce, W.R. (1975). Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. Nature *258*, 145–147.

Meizel, S., and Turner, K.O. (1983). Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. FEBS Lett. *161*, 315–318.

Miki, K., Willis, W.D., Brown, P.R., Goulding, E.H., Fulcher, K.D., and Eddy, E.M. (2002). Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. Dev. Biol. *248*, 331–342.

Mitre, R., Cheminade, C., Allaume, P., Legrand, P., and Legrand, A.B. (2004). Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm. Theriogenology *62*, 1557–1566.

Moll, A.C., Imhof, S.M., Cruysberg, J.R.M., Schouten-van Meeteren, A.Y.N., Boers, M., and van Leeuwen, F.E. (2003). Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. Lancet Lond. Engl. *361*, 309–310.

Moore, H.D., and Bedford, J.M. (1979). Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. Anat. Rec. *193*, 293–311.

Morales, P., Overstreet, J.W., and Katz, D.F. (1988). Changes in human sperm motion during capacitation in vitro. J. Reprod. Fertil. *83*, 119–128.

Moreno, R.D., and Alvarado, C.P. (2006). The mammalian acrosome as a secretory lysosome: New and old evidence. Mol. Reprod. Dev. *73*, 1430–1434.

Morton, B.E., Sagadraca, R., and Fraser, C. (1978). Sperm motility within the mammalian epididymis: species variation and correlation with free calcium levels in epididymal plasma. Fertil. Steril. *29*, 695–698.

Mozaffarian, D., Benjamin, E.J., Go, A.S., Arnett, D.K., Blaha, M.J., Cushman, M., Ferranti, S. de, Després, J.-P., Fullerton, H.J., Howard, V.J., et al. (2015). Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update. Circulation *131*, e29–e322.

Muro, Y., Hasuwa, H., Isotani, A., Miyata, H., Yamagata, K., Ikawa, M., Yanagimachi, R., and Okabe, M. (2016). Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. Biol. Reprod. *94*, 80.

Musset, B., Capasso, M., Cherny, V.V., Morgan, D., Bhamrah, M., Dyer, M.J.S., and DeCoursey, T.E. (2010). Identification of Thr29 as a critical phosphorylation site that activates the human proton channel Hvcn1 in leukocytes. J. Biol. Chem. *285*, 5117–5121.

Naaby-Hansen, S., Mandal, A., Wolkowicz, M.J., Sen, B., Westbrook, V.A., Shetty, J., Coonrod, S.A., Klotz, K.L., Kim, Y.-H., Bush, L.A., et al. (2002). CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated fibrous sheath protein involved in capacitation. Dev. Biol. *242*, 236–254.

NagDas, S.K., Winfrey, V.P., and Olson, G.E. (2000). Identification of a Hamster Epididymal Region-Specific Secretory Glycoprotein That Binds Nonviable Spermatozoa. Biol. Reprod. *63*, 1428–1436.

Naik, S.U., Wang, X., Da Silva, J.S., Jaye, M., Macphee, C.H., Reilly, M.P., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2006). Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. Circulation *113*, 90–97.

Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Toshimori, K., and Okabe, M. (2001). Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. Dev. Biol. *237*, 222–231.

Navarrete, F.A., García-Vázquez, F.A., Alvau, A., Escoffier, J., Krapf, D., Sánchez-Cárdenas, C., Salicioni, A.M., Darszon, A., and Visconti, P.E. (2015). Biphasic Role of Calcium in Mouse Sperm Capacitation Signaling Pathways. J. Cell. Physiol. *230*, 1758–1769.

Naz, R.K., and Ahmad, K. (1992). Presence of expression products of c-erbB-1 and c-erbB-2/HER2 genes on mammalian sperm cell, and effects of their regulation on fertilization. J. Reprod. Immunol. *21*, 223–239.

Naz, R.K., and Padman, P. (1999). Identification of insulin-like growth factor (IGF)-1 receptor in human sperm cell. Arch. Androl. *43*, 153–159.

Naz, R.K., and Rajesh, P.B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. Reprod. Biol. Endocrinol. RBE *2*, 75.

Neill, A.R., and Masters, C.J. (1973). Metabolism of fatty acids by ovine spermatozoa. J. Reprod. Fertil. *34*, 279–287.

Nichol, R., Hunter, R.H., Gardner, D.K., Leese, H.J., and Cooke, G.M. (1992). Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. J. Reprod. Fertil. *96*, 699–707.

Nikolopoulou, M., Soucek, D.A., and Vary, J.C. (1985). Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. Biochim. Biophys. Acta *815*, 486–498.

Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A.L., Romero, F., Treviño, C.L., and Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. Biochem. Biophys. Res. Commun. *450*, 1149–1158.

Nishimura, H., Kim, E., Nakanishi, T., and Baba, T. (2004). Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. J. Biol. Chem. *279*, 34957–34962.

Nishimura, H., Myles, D.G., and Primakoff, P. (2007). Identification of an ADAM2-ADAM3 complex on the surface of mouse testicular germ cells and cauda epididymal sperm. J. Biol. Chem. *282*, 17900–17907.

Nixon, B., Bielanowicz, A., Anderson, A.L., Walsh, A., Hall, T., Mccloghry, A., and Aitken, R.J. (2010). Elucidation of the signaling pathways that underpin capacitation-associated surface phosphotyrosine expression in mouse spermatozoa. J. Cell. Physiol. *224*, 71–83.

Nixon, B., Stanger, S.J., Mihalas, B.P., Reilly, J.N., Anderson, A.L., Tyagi, S., Holt, J.E., and McLaughlin, E.A. (2015). The MicroRNA Signature of Mouse Spermatozoa Is Substantially Modified During Epididymal Maturation. Biol. Reprod. *93*, 91.

Noblanc, A., Kocer, A., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Conrad, M., and Drevet, J.R. (2011). Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. J. Androl. *32*, 641–650.

Noblanc, A., Peltier, M., Damon-Soubeyrand, C., Kerchkove, N., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., et al. (2012). Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. PloS One *7*, e38565.

Nolan, M.A., Babcock, D.F., Wennemuth, G., Brown, W., Burton, K.A., and McKnight, G.S. (2004). Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 13483–13488.

O'Flaherty, C., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2006a). Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. Free Radic. Biol. Med. *40*, 1045–1055.

O'Flaherty, C., Beorlegui, N., and Beconi, M.T. (2006b). Heparin- and superoxide anion-dependent capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa: requirement of dehydrogenases and protein kinases. Free Radic. Res. *40*, 427–432.

O'Flaherty, C., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2006c). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. Free Radic. Biol. Med. *41*, 528–540.

O'Hara, L., Welsh, M., Saunders, P.T.K., and Smith, L.B. (2011). Androgen receptor expression in the caput epididymal epithelium is essential for development of the initial segment and epididymal spermatozoa transit. Endocrinology *152*, 718–729.

Okamura, N., and Sugita, Y. (1983). Activation of spermatozoan adenylate cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma. J. Biol. Chem. *258*, 13056–13062.

Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H., and Sugita, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. J. Biol. Chem. *260*, 9699–9705.

Okamura, N., Kiuchi, S., Tamba, M., Kashima, T., Hiramoto, S., Baba, T., Dacheux, F., Dacheux, J.-L., Sugita, Y., and Jin, Y.-Z. (1999). A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids *1438*, 377–387.

Olkkonen, V.M., and Hynynen, R. (2009). Interactions of oxysterols with membranes and proteins. Mol. Aspects Med. *30*, 123–133.

Olson, G.E., and Hinton, B.T. (1985). Regional differences in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymis revealed by two-dimensional gel electrophoresis. J. Androl. *6*, 20–34.

Osheroff, J.E., Visconti, P.E., Valenzuela, J.P., Travis, A.J., Alvarez, J., and Kopf, G.S. (1999). Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. Mol. Hum. Reprod. *5*, 1017–1026.

Osterhoff, C., Kirchhoff, C., Krull, N., and Ivell, R. (1994). Molecular cloning and characterization of a novel human sperm antigen (HE2) specifically expressed in the proximal epididymis. Biol. Reprod. *50*, 516–525.

Ouvrier, A., Cadet, R., Vernet, P., Laillet, B., Chardigny, J.-M., Lobaccaro, J.-M.A., Drevet, J.R., and Saez, F. (2009). LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. J. Lipid Res. *50*, 1766–1775.

Ouvrier, A., Alves, G., Damon-Soubeyrand, C., Marceau, G., Cadet, R., Janny, L., Brugnon, F., Kocer, A., Pommier, A., Lobaccaro, J.-M.A., et al. (2011). Dietary cholesterol-induced post-testicular infertility. PloS One *6*, e26966.

Palmer, N.O., Bakos, H.W., Fullston, T., and Lane, M. (2012). Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. Spermatogenesis *2*, 253–263.

Pandya, I.J., and Cohen, J. (1985). The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. Fertil. Steril. *43*, 417–421.

Pang, P.-C., Tissot, B., Drobnis, E.Z., Sutovsky, P., Morris, H.R., Clark, G.F., and Dell, A. (2007). Expression of bisecting type and Lewisx/Lewisy terminated N-glycans on human sperm. J. Biol. Chem. *282*, 36593–36602.

Paradowska, A., Bohring, C., Krause, E., and Krause, W. (2006). Identification of Evolutionary Conserved Mouse Sperm Surface Antigens by Human Antisperm Antibodies (ASA) from Infertile Patients. Am. J. Reprod. Immunol. *55*, 321–330.

Parent, S., Lefièvre, L., Brindle, Y., and Sullivan, R. (1999). Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. Mol. Reprod. Dev. *52*, 57–65.

Parks, J.E., and Hammerstedt, R.H. (1985). Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. Biol. Reprod. *32*, 653–668.

Parks, J.E., and Lynch, D.V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. Cryobiology *29*, 255–266.

Parry, S., Wong, N.-K., Easton, R.L., Panico, M., Haslam, S.M., Morris, H.R., Anderson, P., Klotz, K.L., Herr, J.C., Diekman, A.B., et al. (2007). The sperm agglutination antigen-1 (SAGA-1) glycoforms of CD52 are O-glycosylated. Glycobiology *17*, 1120–1126.

Pastor-Soler, N., Piétrement, C., and Breton, S. (2005). Role of Acid/Base Transporters in the Male Reproductive Tract and Potential Consequences of Their Malfunction. Physiology *20*, 417–428.

Patel, R., Al-Dossary, A.A., Stabley, D.L., Barone, C., Galileo, D.S., Strehler, E.E., and Martin-DeLeon, P.A. (2013). Plasma Membrane Ca2+-ATPase 4 in Murine Epididymis: Secretion of Splice Variants in the Luminal Fluid and a Role in Sperm Maturation. Biol. Reprod. *89*, 6.

Patrat, C., Serres, C., and Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. Biol. Cell *92*, 255–266.

Peet, D.J., Janowski, B.A., and Mangelsdorf, D.J. (1998a). The LXRs: a new class of oxysterol receptors. Curr. Opin. Genet. Dev. *8*, 571–575.

Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998b). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. Cell *93*, 693–704.

Peri, A., Fantoni, G., Granchi, S., Vannelli, G.B., Barni, T., Amerini, S., Pupilli, C., Barbagli, G., Serio, M., Maggi, M., et al. (1998). Endothelin-1 is synthesized and biologically active in human epididymis via a paracrine mode of action. Steroids *63*, 294–298.

Persad, S., Takeda, S., Panagia, V., and Dhalla, N.S. (1997). Beta-adrenoceptor-linked signal transduction in ischemic-reperfused heart and scavenging of oxyradicals. J. Mol. Cell. Cardiol. *29*, 545–558.

Peterlin, B., Zorn, B., Volk, M., and Kunej, T. (2006). Association between the apolipoprotein B signal peptide gene insertion/deletion polymorphism and male infertility. Mol. Hum. Reprod. *12*, 777–779.

Petit, F.M., Serres, C., Bourgeon, F., Pineau, C., and Auer, J. (2013). Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. Hum. Reprod. *28*, 852–865.

Petit, F.M., Serres, C., and Auer, J. (2014). Moonlighting proteins in sperm–egg interactions. Biochem. Soc. Trans. *42*, 1740–1743.

Petridou, E.T., Sergentanis, T.N., Panagopoulou, P., Moschovi, M., Polychronopoulou, S., Baka, M., Pourtsidis, A., Athanassiadou, F., Kalmanti, M., Sidi, V., et al. (2012). In vitro fertilization and risk of childhood leukemia in Greece and Sweden. Pediatr. Blood Cancer *58*, 930–936.

Pietrement, C., Sun-Wada, G.-H., Silva, N.D., McKee, M., Marshansky, V., Brown, D., Futai, M., and Breton, S. (2006). Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. Biol. Reprod. *74*, 185–194.

Plante, G., and Manjunath, P. (2015a). Epididymal Binder of SPerm genes and proteins: what do we know a decade later? Andrology *3*, 817–824.

Plante, G., and Manjunath, P. (2015b). Murine binder of sperm protein homolog 1: a new player in HDL-induced capacitation. Reproduction *149*, 367–376.

Pommer, A.C., Rutllant, J., and Meyers, S.A. (2003). Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. Biol. Reprod. *68*, 1208–1214.

Potter, J.E., Millette, C.F., James, M.J., and Kandutsch, A.A. (1981). Elevated cholesterol and dolichol synthesis in mouse pachytene spermatocytes. J. Biol. Chem. *256*, 7150–7154.

Poulos, A., Voglmayr, J.K., and White, I.G. (1973). Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab. *306*, 194–202.

Publicover, S.J., and Barratt, C.L. (1999). Voltage-operated Ca2+ channels and the acrosome reaction: which channels are present and what do they do? Hum. Reprod. Oxf. Engl. *14*, 873–879.

Puga Molina, L.C., Pinto, N.A., Torres Rodríguez, P., Romarowski, A., Vicens Sanchez, A., Visconti, P.E., Darszon, A., Treviño, C.L., and Buffone, M.G. (2016). Essential Role of CFTR in PKA-Dependent Phosphorylation, Alkalinization and Hyperpolarization During Human Sperm Capacitation. J. Cell. Physiol.

Pukazhenthi, B.S., Wildt, D.E., Ottinger, M.A., and Howard, J. (1998). Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. Mol. Reprod. Dev. *49*, 48–57.

Qi, H., Moran, M.M., Navarro, B., Chong, J.A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I.S., Quill, T.A., and Clapham, D.E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. Proc. Natl. Acad. Sci. *104*, 1219–1223.

Qin, J.-B., Sheng, X.-Q., Wu, D., Gao, S.-Y., You, Y.-P., Yang, T.-B., and Wang, H. (2016). Worldwide prevalence of adverse pregnancy outcomes among singleton pregnancies after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. Arch. Gynecol. Obstet.

Quill, T.A., Sugden, S.A., Rossi, K.L., Doolittle, L.K., Hammer, R.E., and Garbers, D.L. (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 14869–14874.

Rajendran, L., and Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. J. Cell Sci. *118*, 1099–1102.

Ram, P.A., Cardullo, R.A., and Millette, C.F. (1989). Expression and topographical localization of cell surface fucosyltransferase activity during epididymal sperm maturation in the mouse. Gamete Res. *22*, 321–332.

Ramsey, I.S., Moran, M.M., Chong, J.A., and Clapham, D.E. (2006). A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. Nature *440*, 1213–1216.

Ramsey, I.S., Ruchti, E., Kaczmarek, J.S., and Clapham, D.E. (2009). Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 7642–7647.

Rana, A.P., Majumder, G.C., Misra, S., and Ghosh, A. (1991). Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. Biochim. Biophys. Acta *1061*, 185–196.

Rayner, K.J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M.L., Tamehiro, N., Fisher, E.A., Moore, K.J., and Fernández-Hernando, C. (2010). MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. Science *328*, 1570–1573.

Reilly, J.N., McLaughlin, E.A., Stanger, S.J., Anderson, A.L., Hutcheon, K., Church, K., Mihalas, B.P., Tyagi, S., Holt, J.E., Eamens, A.L., et al. (2016). Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. Sci. Rep. *6*, 31794.

Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J.-M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P., and Drevet, J.R. (2006). Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. Biol. Reprod. *74*, 1104–1113.

Ren, D., and Xia, J. (2010). Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. Physiol. Bethesda Md *25*, 165–175.

Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L., and Clapham, D.E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature *413*, 603–609.

Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev. *14*, 2819–2830.

Rigamonti, E., Helin, L., Lestavel, S., Mutka, A.L., Lepore, M., Fontaine, C., Bouhlel, M.A., Bultel, S., Fruchart, J.C., Ikonen, E., et al. (2005). Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. Circ. Res. *97*, 682–689.

del Rio, A.G., Valdez Toledo, C.L., and Quiros, M.C. (1979). Thyroid gland and epididymal function in rats--histological study. Arch. Androl. *3*, 19–22.

Robaire, B., and Hales, B.F. (1982). Regulation of epididymal glutathione S-transferases: effects of orchidectomy and androgen replacement. Biol. Reprod. *26*, 559–565.

Robaire, B., and Hermo, L. (1988). The physiology of Reproduction (New York).

Robaire, B., and Hermo, L. (2002). The Epididymis : From Molecules to Clinical Practice (Robaire and Hinton).

Robaire, B., Hinton, B.T., and Orgebin-Crist, M.-C. (2006). Knobil and Neill's Physiology of reproduction (Saint Louis, USA: Jimmy D.Neill).

Robertson, K.M., Schuster, G.U., Steffensen, K.R., Hovatta, O., Meaney, S., Hultenby, K., Johansson, L.C., Svechnikov, K., Söder, O., and Gustafsson, J.-Å. (2005). The Liver X Receptor-β Is Essential for Maintaining Cholesterol Homeostasis in the Testis. Endocrinology *146*, 2519–2530.

Rode, B., Dirami, T., Bakouh, N., Rizk-Rabin, M., Norez, C., Lhuillier, P., Lorès, P., Jollivet, M., Melin, P., Zvetkova, I., et al. (2012). The testis anion transporter TAT1 (SLC26A8) physically and functionally interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel: a potential role during sperm capacitation. Hum. Mol. Genet. *21*, 1287–1298.

Rojas, F.J., and Bruzzone, M.E. (1992). Regulation of cyclic adenosine monophosphate synthesis in human ejaculated spermatozoa. I. Experimental conditions to quantitate membrane-bound adenylyl cyclase activity. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *7*, 1126–1130.

Roldan, E.R.S., and Shi, Q.X. (2007). Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *12*, 89–104.

Rossato, M., Ion Popa, F., Ferigo, M., Clari, G., and Foresta, C. (2005). Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. J. Clin. Endocrinol. Metab. *90*, 984–991.

Rowley, M.J., Teshima, F., and Heller, C.G. (1970). Duration of Transit of Spermatozoa through the Human Male Ductular System*. Fertil. Steril. *21*, 390–396.

Roy, S.C., and Atreja, S.K. (2008). Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. *107*, 68–84.

Roy, J.W., Hill, E., Ruan, Y.C., Vedovelli, L., Păunescu, T.G., Brown, D., and Breton, S. (2013). Circulating aldosterone induces the apical accumulation of the proton pumping V-ATPase and increases proton secretion in clear cells in the caput epididymis. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *305*, C436-446.

Russell, J.C., and Proctor, S.D. (2006). Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol. *15*, 318–330.

Saez, F., Ouvrier, A., and Drevet, J.R. (2011). Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. Asian J. Androl. *13*, 11–17.

Saez Lancellotti, T.E., Boarelli, P.V., Monclus, M.A., Cabrillana, M.E., Clementi, M.A., Espínola, L.S., Cid Barría, J.L., Vincenti, A.E., Santi, A.G., and Fornés, M.W. (2010). Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. PloS One *5*, e13457.

Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T., and Tanabe, T. (2002). Cav2.3 (α1E) Ca2+ channel participates in the control of sperm function. FEBS Lett. *516*, 229–233.

Saleh, R.A., Agarwal, A., Nada, E.A., El-Tonsy, M.H., Sharma, R.K., Meyer, A., Nelson, D.R., and Thomas, A.J. (2003). Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. Fertil. Steril. *79 Suppl 3*, 1597–1605.

Salicioni, A.M., Platt, M.D., Wertheimer, E.V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., and Visconti, P.E. (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation. Soc. Reprod. Fertil. Suppl. *65*, 245–259.

Saling, P.M., Sowinski, J., and Storey, B.T. (1979). An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. J. Exp. Zool. *209*, 229–238.

Sanchez, G., Nguyen, A.-N.T., Timmerberg, B., Tash, J.S., and Blanco, G. (2006). The Na,K-ATPase alpha4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. Mol. Hum. Reprod. *12*, 565–576.

Sánchez-Carranza, O., Torres-Rodríguez, P., Darszon, A., Treviño, C.L., and López-González, I. (2015). Pharmacology of hSlo3 channels and their contribution in the capacitation-associated hyperpolarization of human sperm. Biochem. Biophys. Res. Commun. *466*, 554–559.

Santi, C.M., Martínez-López, P., de la Vega-Beltrán, J.L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A., and Salkoff, L. (2010). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. FEBS Lett. *584*, 1041–1046.

Sato, H., Taketomi, Y., Isogai, Y., Miki, Y., Yamamoto, K., Masuda, S., Hosono, T., Arata, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., et al. (2010). Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. J. Clin. Invest. *120*, 1400–1414.

Sawyer, D.E., Mercer, B.G., Wiklendt, A.M., and Aitken, R.J. (2003). Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. Mutat. Res. *529*, 21–34.

Saxena, D.K., Oh-Oka, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., and Toshimori, K. (2002). Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice. Reprod. Camb. Engl. *123*, 435–444.

Schein, S.J., Colombini, M., and Finkelstein, A. (1976). Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. J. Membr. Biol. *30*, 99–120.

Schisterman, E.F., Mumford, S.L., Chen, Z., Browne, R.W., Barr, D.B., Kim, S., and Louis, G.M.B. (2014). Lipid Concentrations and Semen Quality: The LIFE Study. Andrology *2*, 408–415.

Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., and Salkoff, L. (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K+ channel from mammalian spermatocytes. J. Biol. Chem. *273*, 3509–3516.

Schröter, S., Osterhoff, C., McArdle, W., and Ivell, R. (1999). The glycocalyx of the sperm surface. Hum. Reprod. Update *5*, 302–313.

Schuel, H., Goldstein, E., Mechoulam, R., Zimmerman, A.M., and Zimmerman, S. (1994). Anandamide (arachidonylethanolamide), a brain cannabinoid receptor agonist, reduces sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 7678–7682.

Schuel, H., Burkman, L.J., Lippes, J., Crickard, K., Mahony, M.C., Giuffrida, A., Picone, R.P., and Makriyannis, A. (2002a). Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. Mol. Reprod. Dev. *63*, 376–387.

Schuel, H., Burkman, L.J., Lippes, J., Crickard, K., Forester, E., Piomelli, D., and Giuffrida, A. (2002b). N-Acylethanolamines in human reproductive fluids. Chem. Phys. Lipids *121*, 211–227.

Schuh, K., Cartwright, E.J., Jankevics, E., Bundschu, K., Liebermann, J., Williams, J.C., Armesilla, A.L., Emerson, M., Oceandy, D., Knobeloch, K.-P., et al. (2004). Plasma Membrane Ca2+ ATPase 4 Is Required for Sperm Motility and Male Fertility. J. Biol. Chem. *279*, 28220–28226.

Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. Genes Dev. *14*, 2831–2838.

Schulz, S., Jakubiczka, S., Kropf, S., Nickel, I., Muschke, P., and Kleinstein, J. (2006). Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. Fertil. Steril. *85*, 135–138.

Schwaab, V., Faure, J., Dufaure, J.P., and Drevet, J.R. (1998). GPx3: the plasma-type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens. Mol. Reprod. Dev. *51*, 362–372.

Schwarz, A., Wennemuth, G., Post, H., Brandenburger, T., Aumüller, G., and Wilhelm, B. (2013). Vesicular transfer of membrane components to bovine epididymal spermatozoa. Cell Tissue Res. *353*, 549–561.

Scully, N.F., Shaper, J.H., and Shur, B.D. (1987). Spatial and temporal expression of cell surface galactosyltransferase during mouse spermatogenesis and epididymal maturation. Dev. Biol. *124*, 111–124.

Sebastian, S.M., Selvaraj, S., Aruldhas, M.M., and Govindarajulu, P. (1987). Pattern of neutral and phospholipids in the semen of normospermic, oligospermic and azoospermic men. J. Reprod. Fertil. *79*, 373–378.

Seiler, P., Cooper, T.G., Yeung, C.H., and Nieschlag, E. (1999). Regional variation in macrophage antigen expression by murine epididymal basal cells and their regulation by testicular factors. J. Androl. *20*, 738–746.

Selva, D.M., Hirsch-Reinshagen, V., Burgess, B., Zhou, S., Chan, J., McIsaac, S., Hayden, M.R., Hammond, G.L., Vogl, A.W., and Wellington, C.L. (2004). The ATP-binding cassette transporter 1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility. J. Lipid Res. *45*, 1040–1050.

Selvaraj, V., Asano, A., Buttke, D.E., McElwee, J.L., Nelson, J.L., Wolff, C.A., Merdiushev, T., Fornés, M.W., Cohen, A.W., Lisanti, M.P., et al. (2006). Segregation of micron-scale membrane sub-domains in live murine sperm. J. Cell. Physiol. *206*, 636–646.

Selvaraj, V., Buttke, D.E., Asano, A., McElwee, J.L., Wolff, C.A., Nelson, J.L., Klaus, A.V., Hunnicutt, G.R., and Travis, A.J. (2007). GM1 dynamics as a marker for membrane changes associated with the process of capacitation in murine and bovine spermatozoa. J. Androl. *28*, 588–599.

Selvaraj, V., Asano, A., Buttke, D.E., Sengupta, P., Weiss, R.S., and Travis, A.J. (2009). Mechanisms underlying the micron-scale segregation of sterols and GM1 in live mammalian sperm. J. Cell. Physiol. *218*, 522–536.

Sergerie, M., Bleau, G., Teulé, R., Daudin, M., and Bujan, L. (2005). [Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility]. Gynécologie Obstétrique Fertil. *33*, 89–101.

Serre, V., and Robaire, B. (1999). Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. Biol. Reprod. *61*, 705–714.

Setarehbadi, R., Vatannejad, A., Vaisi-Raygani, A., Amiri, I., Esfahani, M., Fattahi, A., and Tavilani, H. (2012). Apolipoprotein E genotypes of fertile and infertile men. Syst. Biol. Reprod. Med. *58*, 263–267.

Shadan, S., James, P.S., Howes, E.A., and Jones, R. (2004). Cholesterol Efflux Alters Lipid Raft Stability and Distribution During Capacitation of Boar Spermatozoa. Biol. Reprod. *71*, 253–265.

Shamraj, O.I., and Lingrel, J.B. (1994). A putative fourth Na+,K(+)-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 12952–12956.

Sharma, U., Conine, C.C., Shea, J.M., Boskovic, A., Derr, A.G., Bing, X.Y., Belleannee, C., Kucukural, A., Serra, R.W., Sun, F., et al. (2016). Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. Science *351*, 391–396.

Shima, J.E., McLean, D.J., McCarrey, J.R., and Griswold, M.D. (2004). The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. Biol. Reprod. *71*, 319–330.

Shum, W.W.C., Da Silva, N., Brown, D., and Breton, S. (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell–cell crosstalk. J. Exp. Biol. *212*, 1753–1761.

Sidhu, K.S., Mate, K.E., Gunasekera, T., Veal, D., Hetherington, L., Baker, M.A., Aitken, R.J., and Rodger, J.C. (2004). A flow cytometric assay for global estimation of tyrosine phosphorylation associated with capacitation of spermatozoa from two marsupial species, the tammar wallaby (Macropus eugenii) and the brushtail possum (Trichosurus vulpecula). Reprod. Camb. Engl. *127*, 95–103.

Signorelli, J., Diaz, E.S., and Morales, P. (2012). Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. Cell Tissue Res. *349*, 765–782.

Signorelli, J.R., Díaz, E.S., Fara, K., Barón, L., and Morales, P. (2013). Protein phosphatases decrease their activity during capacitation: a new requirement for this event. PloS One *8*, e81286.

Sion, B., Grizard, G., and Boucher, D. (2001). Quantitative analysis of desmosterol, cholesterol and cholesterol sulfate in semen by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A *935*, 259–265.

Sipilä, P., Cooper, T.G., Yeung, C.-H., Mustonen, M., Penttinen, J., Drevet, J., Huhtaniemi, I., and Poutanen, M. (2002). Epididymal dysfunction initiated by the expression of simian virus 40 T-antigen leads to angulated sperm flagella and infertility in transgenic mice. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *16*, 2603–2617.

Skålhegg, B.S., Huang, Y., Su, T., Idzerda, R.L., McKnight, G.S., and Burton, K.A. (2002). Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *16*, 630–639.

Smithwick, E.B., and Young, L.G. (2001). Histological effects of androgen deprivation on the adult chimpanzee epididymis. Tissue Cell *33*, 450–461.

Søberg, K., Jahnsen, T., Rognes, T., Skålhegg, B.S., and Laerdahl, J.K. (2013). Evolutionary paths of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) catalytic subunits. PloS One *8*, e60935.

Soler, C., Yeung, C.H., and Cooper, T.G. (1994). Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. Int. J. Androl. *17*, 271–278.

Soranzo, L., Dadoune, J.P., and Fain-Maurel, M.A. (1982). [Segmentation of the epididymal duct in mouse: an ultrastructural study]. Reprod. Nutr. Dév. *22*, 999–1012.

Srivastava, S., Desai, P., Coutinho, E., and Govil, G. (2000). Protective effect of L-arginine against lipid peroxidation in goat epididymal spermatozoa. Physiol. Chem. Phys. Med. NMR *32*, 127–135.

Srivastava, S., Desai, P., Coutinho, E., and Govil, G. (2006). Mechanism of action of L-arginine on the vitality of spermatozoa is primarily through increased biosynthesis of nitric oxide. Biol. Reprod. *74*, 954–958.

Stamboulian, S., Kim, D., Shin, H.-S., Ronjat, M., De Waard, M., and Arnoult, C. (2004). Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the CaV3.1 (alpha1G) calcium channel: CaV3.2 (alpha1H) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells. J. Cell. Physiol. *200*, 116–124.

Stauss, C.R., Votta, T.J., and Suarez, S.S. (1995). Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. Biol. Reprod. *53*, 1280–1285.

Stival, C., Spina, F.A.L., Graf, C.B., Arcelay, E., Arranz, S.E., Ferreira, J.J., Grand, S.L., Dzikunu, V.A., Santi, C.M., Visconti, P.E., et al. (2015). Src Kinase Is the Connecting Player between Protein Kinase A (PKA) Activation and Hyperpolarization through SLO3 Potassium Channel Regulation in Mouse Sperm. J. Biol. Chem. *290*, 18855–18864.

Strehler, E.E., and Zacharias, D.A. (2001). Role of Alternative Splicing in Generating Isoform Diversity Among Plasma Membrane Calcium Pumps. Physiol. Rev. *81*, 21–50.

Suarez, S.S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. Hum. Reprod. Update *14*, 647–657.

Suarez, S., and Ho, H.-C. (2003). Hyperactivated Motility in Sperm. Reprod. Domest. Anim. *38*, 119–124.

Suarez, S.S., and Pacey, A.A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. Hum. Reprod. Update *12*, 23–37.

Suarez, S.S., and Wu, M. (2016). Microfluidic devices for the study of sperm migration. Mol. Hum. Reprod.

Sullivan, R. (2004). Male fertility markers, myth or reality. Anim. Reprod. Sci. *82–83*, 341–347.

Sullivan, R. (2015). Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. Asian J. Androl. *17*, 726–729.

Sullivan, R., Frenette, G., and Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. Asian J. Androl. *9*, 483–491.

Sun, E.L., and Flickinger, C.J. (1980). Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis. Anat. Rec. *196*, 285–293.

Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Thompson, W.E., and Schatten, G. (2001). A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. J. Cell Sci. *114*, 1665–1675.

Suzuki, F., and Nagano, T. (1978). Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of the mouse. Dev. Biol. *63*, 321–334.

Takano, H., Abe, K., and Ito, T. (1981). [Changes in the mouse epididymis after ligation of the ductuli efferentes or proximal epididymal duct: qualitative and quantitative histological studies (author's transl)]. Kaibogaku Zasshi *56*, 79–90.

Tang, L., Fatehi, M., and Linsdell, P. (2009). Mechanism of direct bicarbonate transport by the CFTR anion channel. J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc. *8*, 115–121.

Tardif, S., Dubé, C., Chevalier, S., and Bailey, J.L. (2001). Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. Biol. Reprod. *65*, 784–792.

Tarling, E.J., and Edwards, P.A. (2012). Dancing with the sterols: critical roles for ABCG1, ABCA1, miRNAs, and nuclear and cell surface receptors in controlling cellular sterol homeostasis. Biochim. Biophys. Acta *1821*, 386–395.

Tarling, E.J., Bojanic, D.D., Tangirala, R.K., Wang, X., Lovgren-Sandblom, A., Lusis, A.J., Bjorkhem, I., and Edwards, P.A. (2010). Impaired development of atherosclerosis in Abcg1-/- Apoe-/- mice: identification of specific oxysterols that both accumulate in Abcg1-/- Apoe-/- tissues and induce apoptosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *30*, 1174–1180.

Tash, J.S., Krinks, M., Patel, J., Means, R.L., Klee, C.B., and Means, A.R. (1988). Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. J. Cell Biol. *106*, 1625–1633.

Tateno, H., Krapf, D., Hino, T., Sánchez-Cárdenas, C., Darszon, A., Yanagimachi, R., and Visconti, P.E. (2013). Ca2+ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 18543–18548.

Tavilani, H., Doosti, M., Abdi, K., Vaisiraygani, A., and Joshaghani, H.R. (2006). Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. Andrologia *38*, 173–178.

Théry, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat. Rev. Immunol. *2*, 569–579.

Thimon, V., Frenette, G., Saez, F., Thabet, M., and Sullivan, R. (2008). Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. Hum. Reprod. *23*, 1698–1707.

Thompson, L.A., Barratt, C.L., Bolton, A.E., and Cooke, I.D. (1992). The leukocytic reaction of the human uterine cervix. Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989 *28*, 85–89.

Tollner, T.L., Yudin, A.I., Treece, C.A., Overstreet, J.W., and Cherr, G.N. (2008a). Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *23*, 2523–2534.

Tollner, T.L., Yudin, A.I., Tarantal, A.F., Treece, C.A., Overstreet, J.W., and Cherr, G.N. (2008b). Beta-defensin 126 on the surface of macaque sperm mediates attachment of sperm to oviductal epithelia. Biol. Reprod. *78*, 400–412.

Tollner, T.L., Venners, S.A., Hollox, E.J., Yudin, A.I., Liu, X., Tang, G., Xing, H., Kays, R.J., Lau, T., Overstreet, J.W., et al. (2011). A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. Sci. Transl. Med. *3*, 92ra65.

Tollner, T.L., Bevins, C.L., and Cherr, G.N. (2012). Multifunctional glycoprotein DEFB126--a curious story of defensin-clad spermatozoa. Nat. Rev. Urol. *9*, 365–375.

Toshimori, K., Araki, S., Oura, C., and Eddy, E.M. (1991). Loss of sperm surface sialic acid induces phagocytosis: an assay with a monoclonal antibody T21, which recognizes a 54K sialoglycoprotein. Arch. Androl. *27*, 79–86.

Tosic, J., and Walton, A. (1950). Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. Biochem. J. *47*, 199–212.

Travis, A.J., Merdiushev, T., Vargas, L.A., Jones, B.H., Purdon, M.A., Nipper, R.W., Galatioto, J., Moss, S.B., Hunnicutt, G.R., and Kopf, G.S. (2001). Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. Dev. Biol. *240*, 599–610.

Tresguerres, M., Levin, L.R., and Buck, J. (2011). Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. Kidney Int. *79*, 1277–1288.

delBarco-Trillo, J., Mateo, R., and Roldan, E.R.S. (2015). Differences in the fatty-acid composition of rodent spermatozoa are associated to levels of sperm competition. Biol. Open *4*, 466–473.

Triphan, X., Menzel, V.A., Petrunkina, A.M., Cassará, M.C., Wemheuer, W., Hinsch, K.-D., and Hinsch, E. (2008). Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa. Pflugers Arch. *455*, 677–686.

Tserentsoodol, N., Sztein, J., Campos, M., Gordiyenko, N.V., Fariss, R.N., Lee, J.W., Fliesler, S.J., and Rodriguez, I.R. (2006). Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. Mol. Vis. *12*, 1306–1318.

Tulsiani, D.R.P. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. Mol. Cell. Endocrinol. *250*, 58–65.

Tulsiani, D.R., Orgebin-Crist, M.C., and Skudlarek, M.D. (1998). Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. J. Reprod. Fertil. Suppl. *53*, 85–97.

Turner, T.T. (1991). Spermatozoa Are Exposed to a Complex Microenvironment as They Traverse the Epididymisa. Ann. N. Y. Acad. Sci. *637*, 364–383.

Turner, T.T., and Cesarini, D.M. (1983). The ability of the rat epididymis to concentrate spermatozoa. Responsiveness to aldosterone. J. Androl. *4*, 197–202.

Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D.S., and Aitken, R.J. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *13*, 1429–1436.

Uesugi, S., and Yamazoe, S. (1966). Presence of sodium-potassium-stimulated ATPase in boar epididymal spermatozoon. Nature *209*, 403.

Urbé, S., Page, L.J., and Tooze, S.A. (1998). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation in a cell-free assay. J. Cell Biol. *143*, 1831–1844.

Usselman, M.C., and Cone, R.A. (1983). Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin," a high molecular weight glycoprotein. Biol. Reprod. *29*, 1241–1253.

Varki, A. (2011). Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan "self-associated molecular patterns" dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. Glycobiology *21*, 1121–1124.

Vemuganti, S.A., Bell, T.A., Scarlett, C.O., Parker, C.E., de Villena, F.P.-M., and O'Brien, D.A. (2007). Three male germline-specific aldolase A isozymes are generated by alternative splicing and retrotransposition. Dev. Biol. *309*, 18–31.

Veri, J.P., Hermo, L., and Robaire, B. (1993). Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. J. Androl. *14*, 23–44.

Vernet, P., Britan, A., Gueux, E., Mazur, A., and Drevet, J.R. (2004). Dietary magnesium depletion does not promote oxidative stress but targets apical cells within the mouse caput epididymidis. Biochim. Biophys. Acta *1675*, 32–45.

Viggiano, J.M., Herrero, M.B., Martínez, S.P., and De Gimeno, M.F. (1996). Analysis of the effect of nitric oxide synthase inhibition on mouse sperm employing a modified staining method for assessment of the acrosome reaction. J. Androl. *17*, 692–698.

Vignon, F., Vivier, C., Roll-Back, M.H., Clavert, A., Cranz, C., and Reville, P. (1991). [Lipid composition of peritoneal and follicular ovulatory fluid from patients participating in an in vitro fertilization protocol]. J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod. *20*, 321–324.

Vigueras-Villaseñor, R.M., Rojas-Castañeda, J.C., Chávez-Saldaña, M., Gutiérrez-Pérez, O., García-Cruz, M.E., Cuevas-Alpuche, O., Reyes-Romero, M.M., and Zambrano, E. (2011). Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. Acta Histochem. *113*, 214–220.

Visconti, P.E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 667–668.

Visconti, P.E. (2012). Sperm bioenergetics in a nutshell. Biol. Reprod. *87*, 72.

Visconti, P.E., Muschietti, J.P., Flawia, M.M., and Tezon, J.G. (1990). Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. Biochim. Biophys. Acta *1054*, 231–236.

Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G.S. (1995a). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. Dev. Camb. Engl. *121*, 1129–1137.

Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G.S. (1995b). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation

and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. Dev. Camb. Engl. *121*, 1139–1150.

Visconti, P.E., Ning, X., Fornés, M.W., Alvarez, J.G., Stein, P., Connors, S.A., and Kopf, G.S. (1999a). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. Dev. Biol. *214*, 429–443.

Visconti, P.E., Stewart-Savage, J., Blasco, A., Battaglia, L., Miranda, P., Kopf, G.S., and Tezón, J.G. (1999b). Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. Biol. Reprod. *61*, 76–84.

Visconti, P.E., Krapf, D., de la Vega-Beltrán, J.L., Acevedo, J.J., and Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. Asian J. Androl. *13*, 395–405.

Vizel, R., Hillman, P., Ickowicz, D., and Breitbart, H. (2015). AKAP3 degradation in sperm capacitation is regulated by its tyrosine phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta *1850*, 1912–1920.

Volle, D.H., Mouzat, K., Duggavathi, R., Siddeek, B., Déchelotte, P., Sion, B., Veyssière, G., Benahmed, M., and Lobaccaro, J.-M.A. (2007). Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *21*, 1014–1027.

Vredenburgh-Wilberg, W.L., and Parrish, J.J. (1995). Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. Mol. Reprod. Dev. *40*, 490–502.

Wandernoth, P.M., Raubuch, M., Mannowetz, N., Becker, H.M., Deitmer, J.W., Sly, W.S., and Wennemuth, G. (2010). Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. PloS One *5*, e15061.

Wandernoth, P.M., Mannowetz, N., Szczyrba, J., Grannemann, L., Wolf, A., Becker, H.M., Sly, W.S., and Wennemuth, G. (2015). Normal Fertility Requires the Expression of Carbonic Anhydrases II and IV in Sperm. J. Biol. Chem. *290*, 29202–29216.

Wang, D.Q.-H. (2007). Regulation of intestinal cholesterol absorption. Annu. Rev. Physiol. *69*, 221–248.

Wang, D., King, S.M., Quill, T.A., Doolittle, L.K., and Garbers, D.L. (2003). A new sperm-specific Na+/H+ exchanger required for sperm motility and fertility. Nat. Cell Biol. *5*, 1117–1122.

Wang, D., Hu, J., Bobulescu, I.A., Quill, T.A., McLeroy, P., Moe, O.W., and Garbers, D.L. (2007). A sperm-specific Na+/H+ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 9325–9330.

Wang, G., Wu, Y., Zhou, T., Guo, Y., Zheng, B., Wang, J., Bi, Y., Liu, F., Zhou, Z., Guo, X., et al. (2013). Mapping of the N-linked glycoproteome of human spermatozoa. J. Proteome Res. *12*, 5750–5759.

Wang, H., Liu, J., Cho, K.-H., and Ren, D. (2009). A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. Biol. Reprod. *81*, 539–544.

Wang, J., Qi, L., Huang, S., Zhou, T., Guo, Y., Wang, G., Guo, X., Zhou, Z., and Sha, J. (2015). Quantitative phosphoproteomics analysis reveals a key role of insulin growth factor 1 receptor (IGF1R) tyrosine kinase in human sperm capacitation. Mol. Cell. Proteomics MCP *14*, 1104–1112.

Wang, Z., Balet Sindreu, C., Li, V., Nudelman, A., Chan, G.C.-K., and Storm, D.R. (2006). Pheromone detection in male mice depends on signaling through the type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 7375–7379.

Wassall, S.R., and Stillwell, W. (2009). Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: Domain formation in membranes. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. *1788*, 24–32.

Wazzan, W.C., Gwatkin, R.B., and Thomas, A.J. (1990). Zona drilling enhances fertilization by mouse caput epididymal sperm. Mol. Reprod. Dev. *27*, 332–336.

Wennemuth, G., Carlson, A.E., Harper, A.J., and Babcock, D.F. (2003). Bicarbonate actions on flagellar and Ca2+ -channel responses: initial events in sperm activation. Dev. Camb. Engl. *130*, 1317–1326.

Wennerholm, U.B., Bergh, C., Hamberger, L., Lundin, K., Nilsson, L., Wikland, M., and Källén, B. (2000). Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *15*, 944–948.

Wertheimer, E., Krapf, D., de la Vega-Beltran, J.L., Sanchez-Cardenas, C., Navarrete, F., Haddad, D., Escoffier, J., Salicioni, A.M., Levin, L.R., Buck, J., et al. (2013). Compartmentalization of Distinct cAMP Signaling Pathways in Mammalian Sperm. J. Biol. Chem. *288*, 35307–35320.

Wiebe, J.P., and Tilbe, K.S. (1979). De novo synthesis of steroids (from acetate) by isolated rat Sertoli cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *89*, 1107–1113.

Wiegand, R.D., and Anderson, R.E. (1983). Phospholipid molecular species of frog rod outer segment membranes. Exp. Eye Res. *37*, 159–173.

Willy, P.J., and Mangelsdorf, D.J. (1997). Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. Genes Dev. *11*, 289–298.

Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Horoszewicz, K., and Bełtowski, J. (2007). Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. Postępy Hig. Med. Dośw. Online *61*, 736–759.

Woo, A.L., James, P.F., and Lingrel, J.B. (2000). Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. J. Biol. Chem. *275*, 20693–20699.

Woo, A.L., James, P.F., and Lingrel, J.B. (2002). Roles of the Na,K-ATPase alpha4 isoform and the Na+/H+ exchanger in sperm motility. Mol. Reprod. Dev. *62*, 348–356.

Xia, J., and Ren, D. (2009). The BSA-induced Ca2+ influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. Reprod. Biol. Endocrinol. RBE *7*, 119.

Xu, B., Washington, A.M., and Hinton, B.T. (2014). PTEN signaling through RAF1 proto-oncogene serine/threonine kinase (RAF1)/ERK in the epididymis is essential for male fertility. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 18643–18648.

Xu, W.M., Shi, Q.X., Chen, W.Y., Zhou, C.X., Ni, Y., Rowlands, D.K., Yi Liu, G., Zhu, H., Ma, Z.G., Wang, X.F., et al. (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 9816–9821.

Xu, X., Decker, W., Sampson, M.J., Craigen, W.J., and Colombini, M. (1999). Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability. J. Membr. Biol. *170*, 89–102.

Yanagimachi, R., Kamiguchi, Y., Mikamo, K., Suzuki, F., and Yanagimachi, H. (1985). Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. Am. J. Anat. *172*, 317–330.

Yenugu, S., and Narmadha, G. (2010). The human male reproductive tract antimicrobial peptides of the HE2 family exhibit potent synergy with standard antibiotics. J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc. *16*, 337–341.

Yeung, C.-H., Sonnenberg-Riethmacher, E., and Cooper, T.G. (1999). Infertile Spermatozoa of c-ros Tyrosine Kinase Receptor Knockout Mice Show Flagellar Angulation and Maturational Defects in Cell Volume Regulatory Mechanisms. Biol. Reprod. *61*, 1062–1069.

Yin, W., Carballo-Jane, E., McLaren, D.G., Mendoza, V.H., Gagen, K., Geoghagen, N.S., McNamara, L.A., Gorski, J.N., Eiermann, G.J., Petrov, A., et al. (2012). Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. J. Lipid Res. *53*, 51–65.

Young, S.G. (1990). Recent progress in understanding apolipoprotein B. Circulation *82*, 1574–1594.

Young, S.A.M., Miyata, H., Satouh, Y., Aitken, R.J., Baker, M.A., and Ikawa, M. (2016). CABYR is essential for fibrous sheath integrity and progressive motility in mouse spermatozoa. J. Cell Sci.

Yudin, A.I., Generao, S.E., Tollner, T.L., Treece, C.A., Overstreet, J.W., and Cherr, G.N. (2005). Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. Biol. Reprod. *73*, 1243–1252.

Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., and Tontonoz, P. (2009). LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. Science *325*, 100–104.

Zeng, X.-H., Yang, C., Kim, S.T., Lingle, C.J., and Xia, X.-M. (2011). Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K+ current in mouse spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 5879–5884.

Zeng, Y., Clark, E.N., and Florman, H.M. (1995). Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. Dev. Biol. *171*, 554–563.

Zeng, Y., Oberdorf, J.A., and Florman, H.M. (1996). pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO3(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. Dev. Biol. *173*, 510–520.

Zhang, H., and Martin-Deleon, P.A. (2003). Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. J. Androl. *24*, 51–58.

Zhang, T., Dai, P., Cheng, D., Zhang, L., Chen, Z., Meng, X., Zhang, F., Han, X., Liu, J., Pan, J., et al. (2014). Obesity occurring in apolipoprotein E-knockout mice has mild effects on fertility. Reprod. Camb. Engl. *147*, 141–151.

Zippin, J.H., Chen, Y., Straub, S.G., Hess, K.C., Diaz, A., Lee, D., Tso, P., Holz, G.G., Sharp, G.W.G., Levin, L.R., et al. (2013). CO2/HCO3(-)- and calcium-regulated soluble adenylyl cyclase as a physiological ATP sensor. J. Biol. Chem. *288*, 33283–33291.

**Modèle murin invalidé pour les LXRs : dyslipidémie et impact sur la maturation post-testiculaire des gamètes**

L'obtention de spermatozoïdes fécondants est un processus long et multi étapes, débutant par la production des gamètes mâles dans le testicule. Les spermatozoïdes sont ensuite successivement maturés au cours du transit épididymaire puis lors de leur passage dans les voies génitales femelles au cours du processus de capacitation. Ces étapes de maturation post-testiculaires concernent notamment la composition lipidique du gamète pour lui permettre d'acquérir une fluidité membranaire essentielle à la fécondation.

Les résultats présentés dans cette thèse mettent en évidence l'importance de l'homéostasie lipidique épididymaire pour la maturation lipidique des spermatozoïdes et l'acquisition du pouvoir fécondant. Au niveau moléculaire cette homéostasie lipidique est régulée par les isoformes α et β des LXRs, les récepteurs nucléaires des oxystérols (NR1H3 et NR1H2, respectivement). Un régime alimentaire enrichi en cholestérol chez des souris jeunes invalidées pour les LXRs entraîne une infertilité avec une atteinte spécifique de l'épididyme. La maturation épididymaire des spermatozoïdes est alors altérée, entrainant des défauts de compositions lipidiques et protéiques de la membrane plasmique spermatique. Ces défauts ont des répercussions délétères sur la capacitation, issues de perturbations des flux calciques et de la tyrosine phosphorylation.

En plus de leurs répercussions endocriniennes, les dyslipidémies semblent également affecter la maturation post-testiculaire. Ces résultats sont à considérer dans le cadre des protocoles de PMA puisque le bilan lipidique plasmatique ne fait pas partie des examens classiques des couples en PMA. Or en France, 55% des hommes entre 30 et 54 ans sont atteints d'une dyslipidémie. Ces désordres métaboliques lipidiques pourraient altérer la maturation post-testiculaire des gamètes, provoquant un certain nombre d'infertilités et/ou d'échecs en PMA.

Mots clés : Epididyme, fertilité, dyslipidémie, LXR, capacitation, spermatozoïdes, calcium, phosphotyrosine

**The LXR-null mice: dyslipidemia and impact on sperm post-testicular maturation**

The acquisition of fertile spermatozoa is a long and multi-stage process, beginning with the production of male gametes in the testis. Spermatozoa then undergo two successive maturation steps, first during the epididymal transit and then in the female genital tract during the capacitation process. The post-testicular maturation particularly impacts sperm lipid composition, leading to a higher membrane fluidity considered to be essential for fertilization.

The results presented in this work show the importance of epididymal lipid homeostasis for sperm lipid maturation and acquisition of fertilizing ability. At the molecular level, lipid homeostasis is regulated by the LXRs (α and β isoforms), the oxysterol nuclear receptors (NR1H3 and NR1H2, respectively). A cholesterol-enriched diet in young LXR-null mice leads to infertility with a specific epididymal alteration. Sperm epididymal maturation is altered, leading to defects in lipid and protein composition of the spermatic plasma membrane. These defects have detrimental effects on the capacitation process, characterized by disturbances of calcium flows and tyrosine phosphorylation.

In addition to their endocrine effects, dyslipidemia also appear to affect post-testicular maturation. These results have to be considered in the context of ART protocols, since the plasma lipid status is not part of the routine examinations for couples in ART protocols. Concomitantly, in France, 55% of men aged 30-54 are dyslipidemic, suggesting that these lipid metabolic disorders could alter sperm post-testicular maturation, causing a number of infertility and / or ART failures.

Key words: Epididymis, fertility, dyslipidemia, LXR, capacitation, spermatozoa, calcium, phosphotyrosine