

*Importance des oestrogènes chez le
mammifère mâle:
l'exemple des canaux efférents*

Mélanie Trépos-Pouplard

INSERM U.625 – GERHM - Equipe « Environnement, Virus, Reproduction »

24 Octobre 2006 – Plateforme bioinformatique de la
genopole Ouest



Les oestrogènes chez le mammifère mâle

Principales cibles des oestrogènes

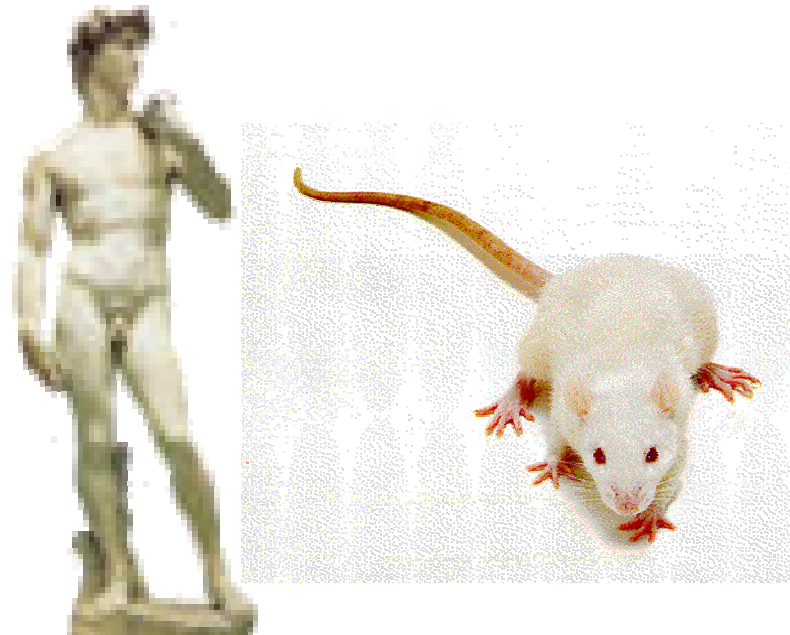
Système nerveux
périphérique et central

Reproduction

Système
cardiovasculaire

Os

Hématopoïèse



Les oestrogènes chez le mammifère mâle

Sources d'oestrogènes



Tissus exprimant l'aromatase chez le mâle:

- Organes génitaux: testicules (cellules de Leydig, cellules germinales)
- Fœtus: placenta, foie fœtal, cellules de Sertoli
- Tissus : tissu adipeux, tissu osseux (chondrocytes, ostéoblastes)
- Cerveau: Hypothalamus, cortex cérébral

Les oestrogènes chez le mammifère mâle

Mutations de ER chez l'homme:

- Oligospermie (faible production de spermatozoides)
- Ostéoporose



Les oestrogènes chez le mammifère mâle

Souris
ER α KO



- Problèmes de comportement sexuel
- Canaux efférents non fonctionnels
- Désorganisation testiculaire
- Problèmes au niveau de la spermatogenèse

Stérilité mâle

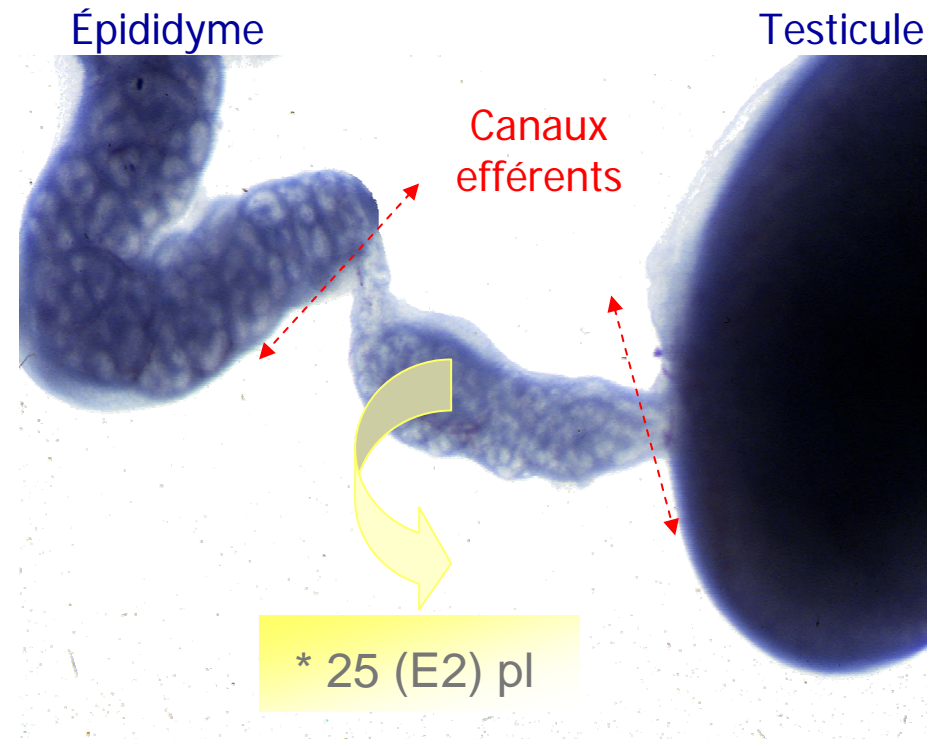


ER α est essentiel pour la fertilité mâle

Les canaux efférents

Canaux efférents :

- Origine néphron géant du mésonéphros
- Absorption de 90% du fluide testiculaire (fonction dépendante de E2)
- Principal site de réabsorption des protéines du fluide du rete testis (excrétion des protéines vers la circulation sanguine)
- Concentration du sperme avant son entrée dans l'épididyme

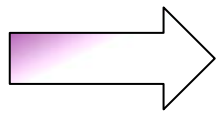


Canaux efférents / Oestrogènes

Taux d'expression le plus intense en récepteurs aux oestrogènes

Première structure de l'appareil génital mâle à exprimer ER α au cours du développement fœtal (ils s'appellent alors canaux mésonéphritiques)

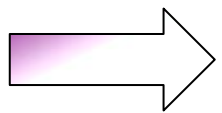
ER α est présent tout au long du développement des canaux efférents



Rôle des oestrogènes dans le développement des canaux efférents

Souris ER α KO infertiles

Absence congénitale de ER α : perturbation du développement des canaux efférents et de leur physiologie causant une infertilité



Les oestrogènes sont essentiels dans la physiologie des canaux efférents et la fertilité

Problématique

Quelles sont les protéines impliquées dans la régulation de la réabsorption du fluide testiculaire sous la dépendance des oestrogènes



Quelles protéines peuvent jouer le rôle de biomarqueurs de l'action des oestrogènes dans la sphère reproductive mâle

Stratégie Expérimentale (1)

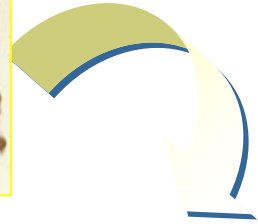


Rat Sprague Dawley
90 jpp



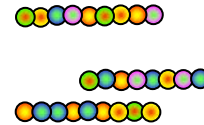
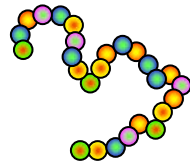
Extraction
Protéique

Stratégie Expérimentale (2)



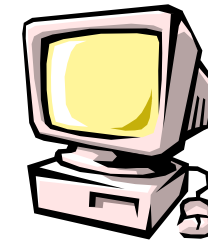
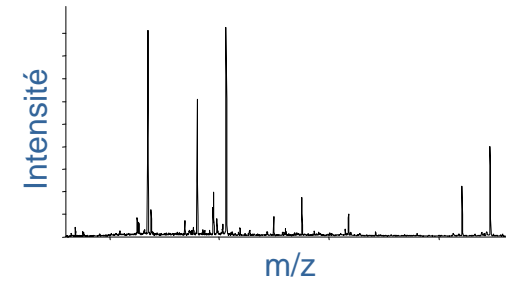
Digestion

trypsin



MALDI-TOF

Cartographie peptidique



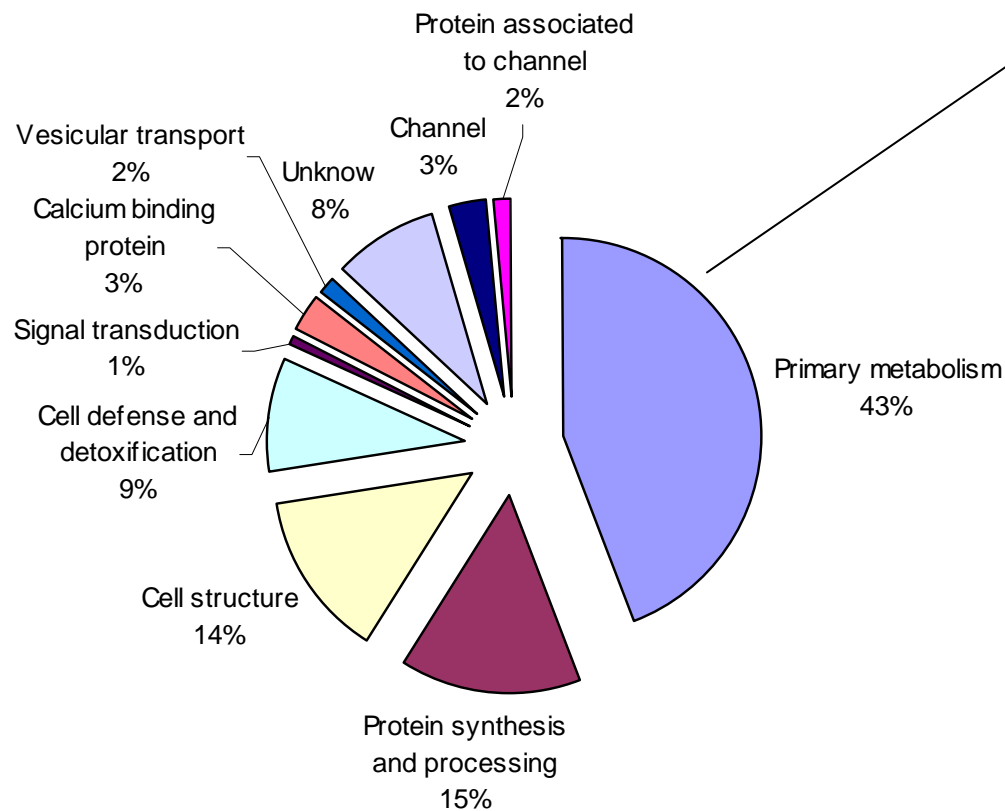
IDENTIFICATION



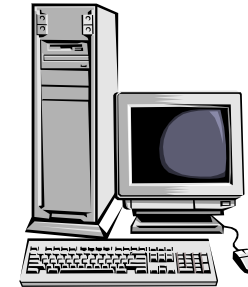
Spot	Protein name	Accession	N° discussion NCBI	M _r Theor	pI Theor
Primary Dislocation					
1001	Protein	sw	5020251	48200	4.80
1002	Protein	sw	5020252	48200	4.80
1003	Protein	sw	5020253	48200	4.80
1004	Protein	sw	5020254	48200	4.80
1005	Protein	sw	5020255	48200	4.80
1006	Protein	sw	5020256	48200	4.80
1007	Protein	sw	5020257	48200	4.80
1008	Protein	sw	5020258	48200	4.80
1009	Protein	sw	5020259	48200	4.80
1010	Protein	sw	5020260	48200	4.80
1011	Protein	sw	5020261	48200	4.80
1012	Protein	sw	5020262	48200	4.80
1013	Protein	sw	5020263	48200	4.80
1014	Protein	sw	5020264	48200	4.80
1015	Protein	sw	5020265	48200	4.80
1016	Protein	sw	5020266	48200	4.80
1017	Protein	sw	5020267	48200	4.80
1018	Protein	sw	5020268	48200	4.80
1019	Protein	sw	5020269	48200	4.80
1020	Protein	sw	5020270	48200	4.80
1021	Protein	sw	5020271	48200	4.80
1022	Protein	sw	5020272	48200	4.80
1023	Protein	sw	5020273	48200	4.80
1024	Protein	sw	5020274	48200	4.80
1025	Protein	sw	5020275	48200	4.80
1026	Protein	sw	5020276	48200	4.80
1027	Protein	sw	5020277	48200	4.80
1028	Protein	sw	5020278	48200	4.80
1029	Protein	sw	5020279	48200	4.80
1030	Protein	sw	5020280	48200	4.80
1031	Protein	sw	5020281	48200	4.80
1032	Protein	sw	5020282	48200	4.80
1033	Protein	sw	5020283	48200	4.80
1034	Protein	sw	5020284	48200	4.80
1035	Protein	sw	5020285	48200	4.80
1036	Protein	sw	5020286	48200	4.80
1037	Protein	sw	5020287	48200	4.80
1038	Protein	sw	5020288	48200	4.80
1039	Protein	sw	5020289	48200	4.80
1040	Protein	sw	5020290	48200	4.80
1041	Protein	sw	5020291	48200	4.80
1042	Protein	sw	5020292	48200	4.80
1043	Protein	sw	5020293	48200	4.80
1044	Protein	sw	5020294	48200	4.80
1045	Protein	sw	5020295	48200	4.80
1046	Protein	sw	5020296	48200	4.80
1047	Protein	sw	5020297	48200	4.80
1048	Protein	sw	5020298	48200	4.80
1049	Protein	sw	5020299	48200	4.80
1050	Protein	sw	5020300	48200	4.80

Stratégie Expérimentale (3)

Protein categories



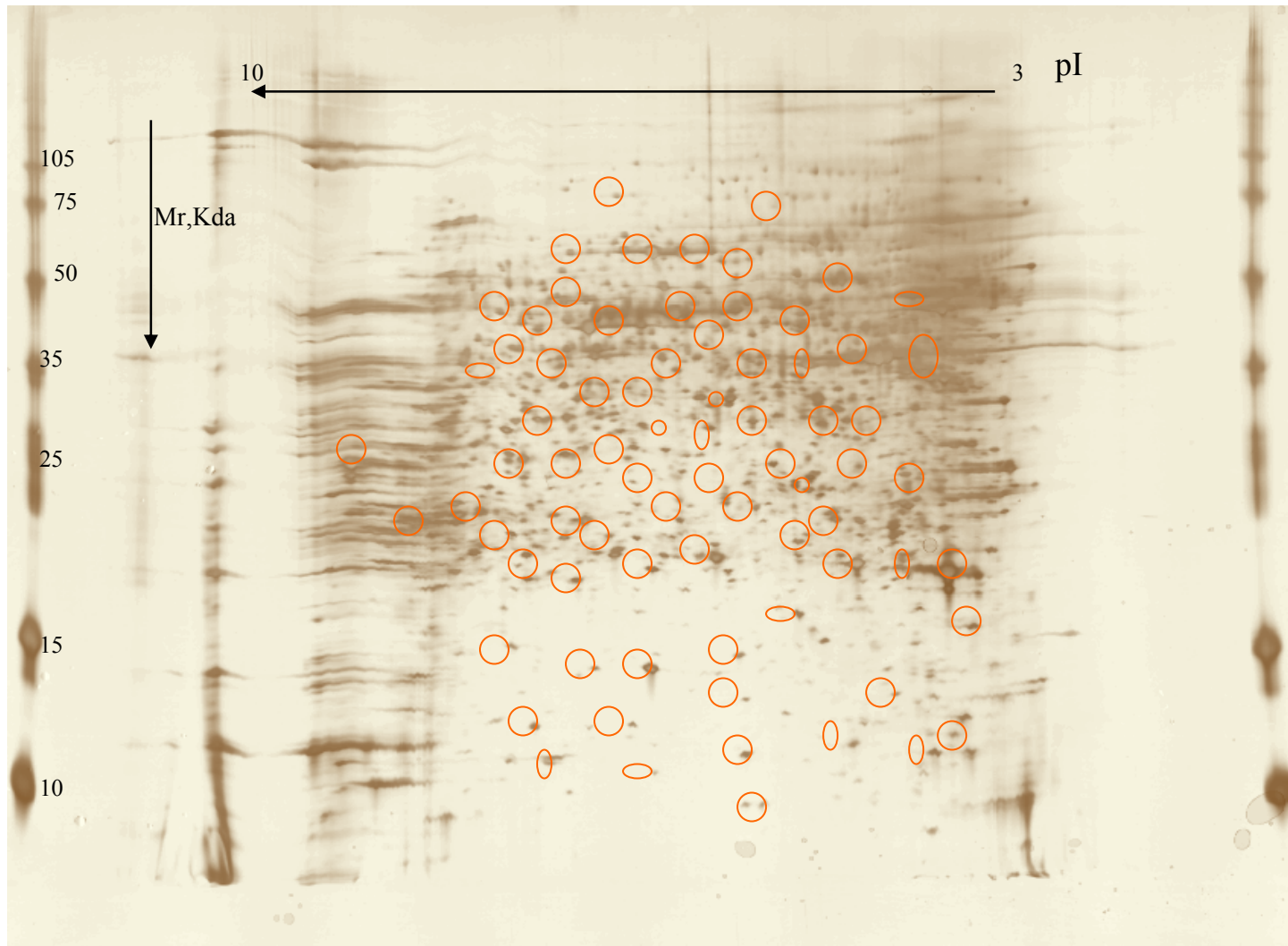
Searching for ERE, ARE, PRE



New candidate

Validation by PCR, Northern blot, immunohistochemistry

Résultats



Identification de 172 protéines différentes

Résultats

Metabolisme (73)

Acetyl coenzyme A, acetyltransferase 1

Aryl sulfotransferase

Arginase 2

Creatine kinase B

Eno 1 Protein

Ornithine aminotransferase ...

Structure cellulaire et motilité (24)

Tubulin beta 2

Tropomyosin 1

Gelsolin

Vimentin ...

Résultats

Défense cellulaire et détoxification (19)

Thiol specific antioxidant protein

Dismutase

Glutathione S transferase pi 2

Peroxiredoxin 1 ...

Protéines de liaison au calcium (5)

Annexin VI

Annexin IV

Lipocortin V ...

Résultats

Canaux (5)

Voltage dependent anion channel selective protein 1

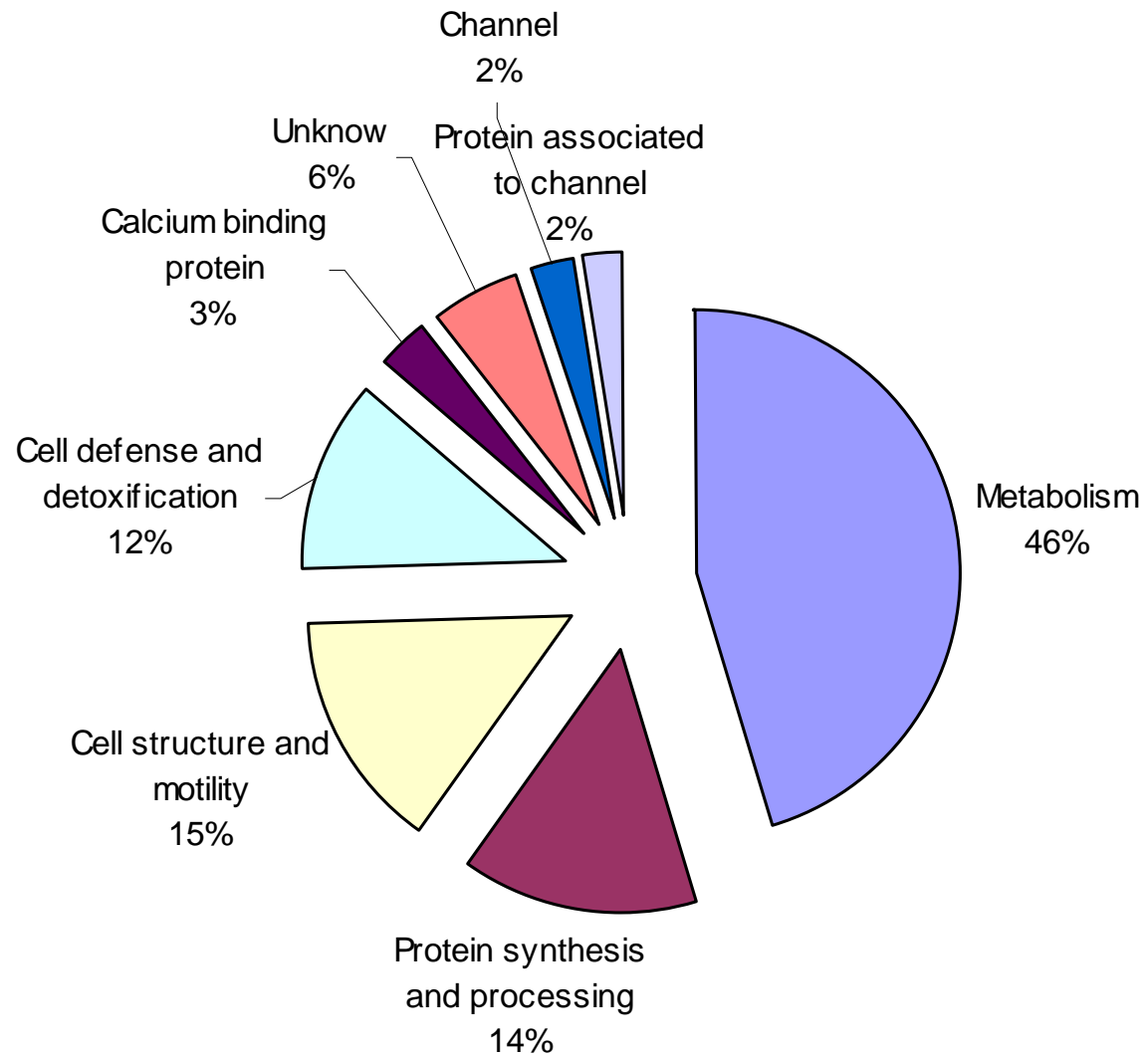
Chloride intracellular channel ...

Protéines associées aux canaux (4)

PDZK1

Tpt1 ...

Répartition biochimique des protéines



Répartition biochimique des protéines

- Une majorité des protéines sont des « protéines de ménage »
- 15% des protéines sont impliquées dans la synthèse des protéines : les canaux efférents ont un rôle dans la composition du fluide
- 12% des protéines sont impliquées dans la défense cellulaire et la détoxification : c'est la première fois que ce rôle est décrit
- 7% des protéines sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie : rôle de « pompe » des canaux efférents
- Groupes sous représentés sont des protéines impliquées dans les processus de régulation connus pour être produits en faible nombre

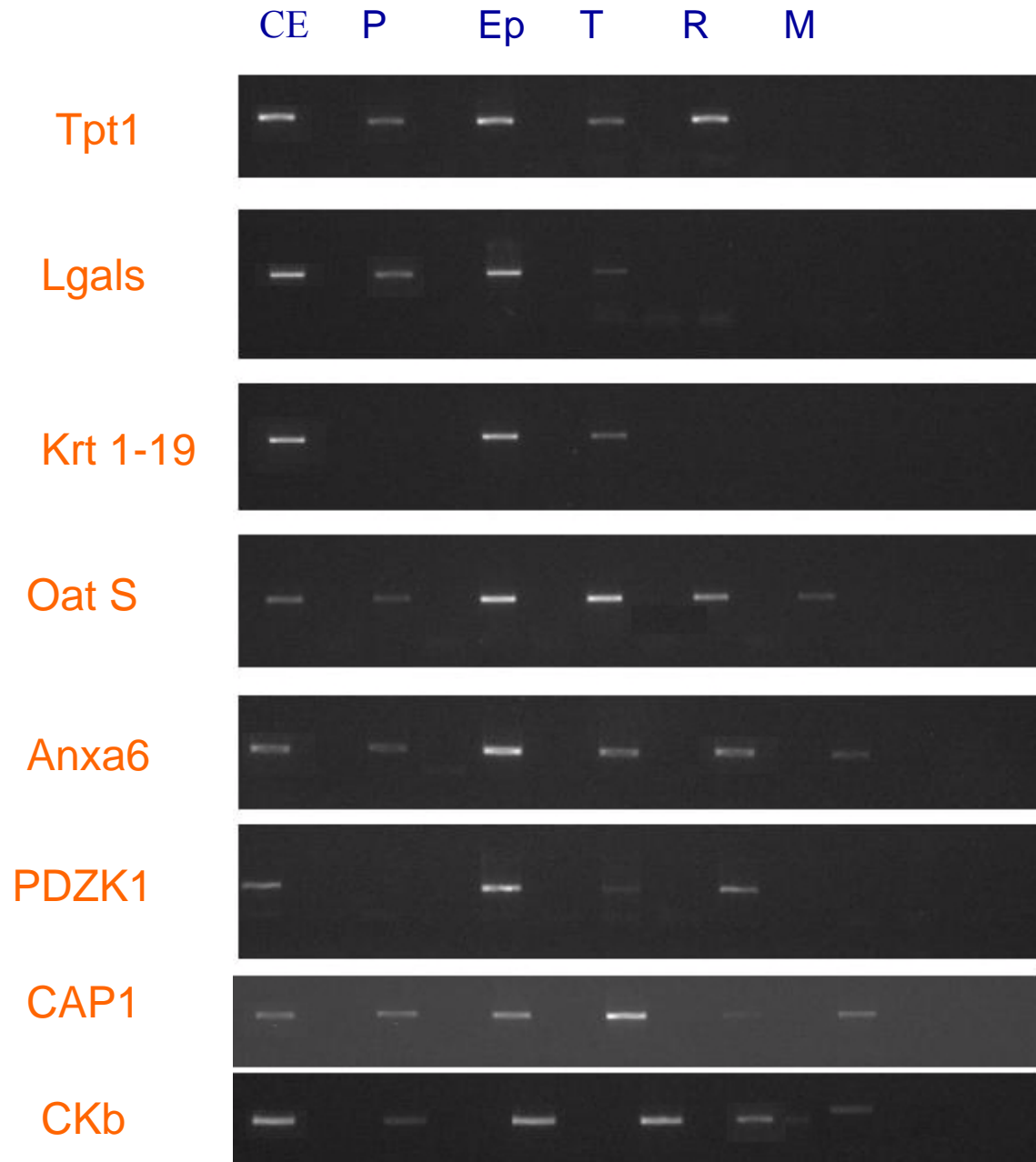
Analyse bio-informatique

Proteines	ERE (mutation, position/ATG)	1/2 ERE	ARE (mutation, position/ATG)	TATA box
Anxa6 Protein	(2,-12612);(2,-11082);(2,-8413);(2,-8407);(2,-6266);(0,-4379);(2,-4348);(2,-2654);(2,1748);(2,-857)	32:7	(2,-4537)	
Creatine Kinase-B	(2,-8684);(2,-6986)	24:5		oui
PdzK1 protein	(2,-1038)	23:5	(2,-3072);(2,-2495)	oui
Keratin complex1, acidic, gene 19 (= Krt1-19)	(2,-9598);(2,-6110);(2,-6014);(2,-2864)	19:5	-	non
Ornithine aminotransferase	(2,-463);(2,-323)	7:5	-	non
DJ-1 Protein	(2,-6758);(2,-4190);(2,-850)	17:5	(2,-9004);(2,-6764);(2,-5611)	non

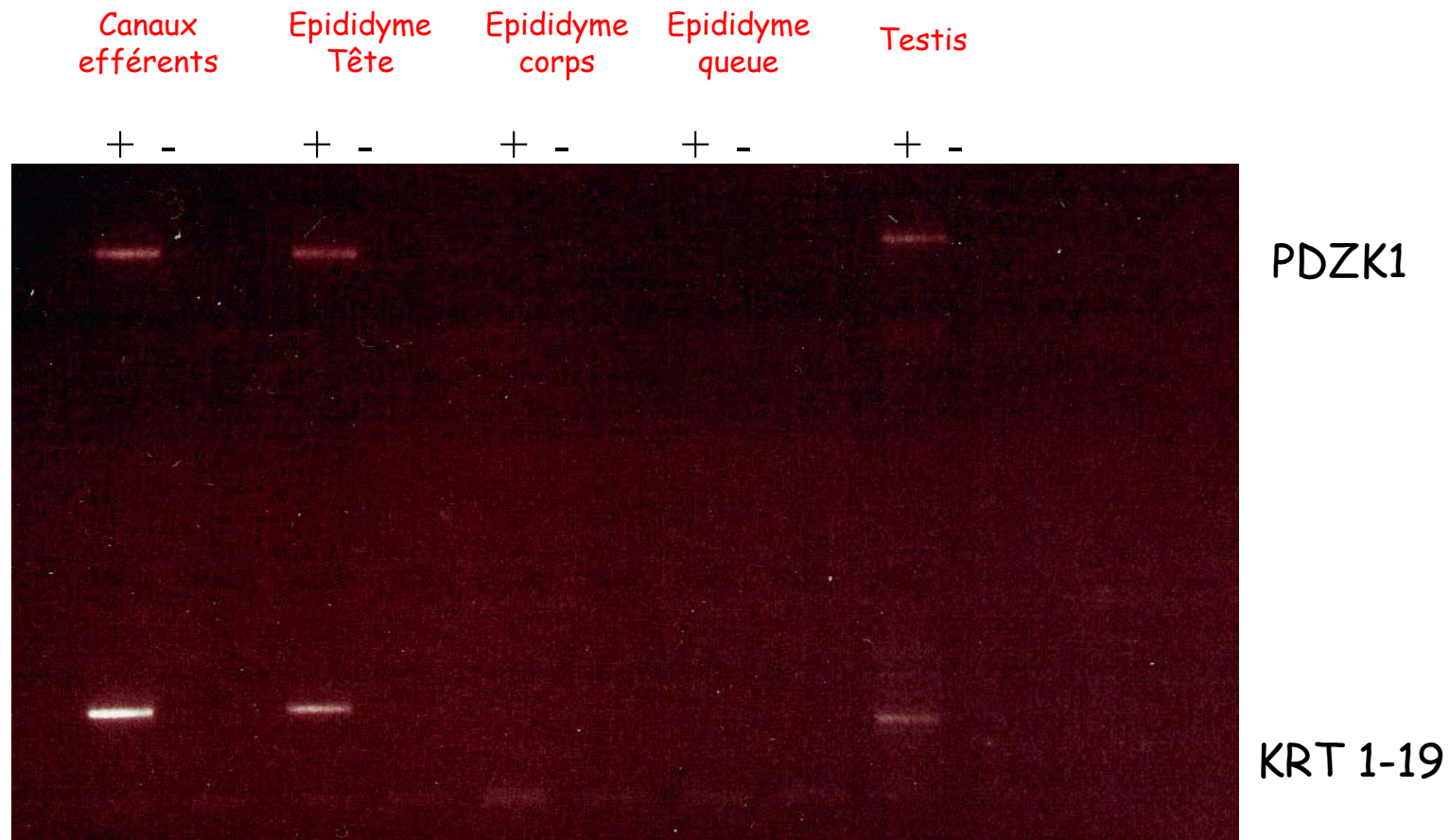
Candidats

- Creatine Kinase B CKB
- Translationally control tumor protein Tpt1
- Keratin 1-19 protein Krt 1-19
- Ornithine amino-transferase Oat S
- Beta galactosidase binding lectin Lgals
- PDZK1 protein PDZK1
- Contraception associated protein CAP-1
- Annexin 6 Anxa6

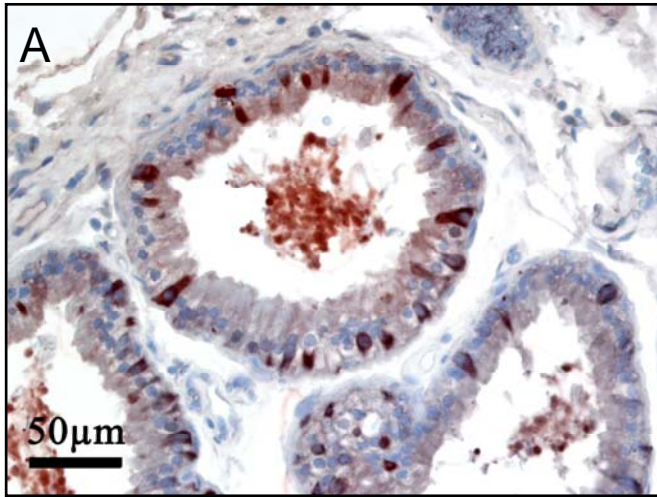
Etude de l'expression en PCR



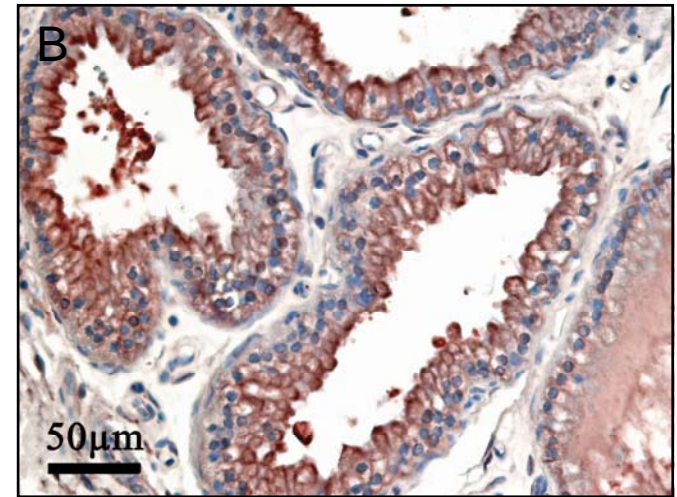
Etude de l'expression en PCR



Immunohistochemistry

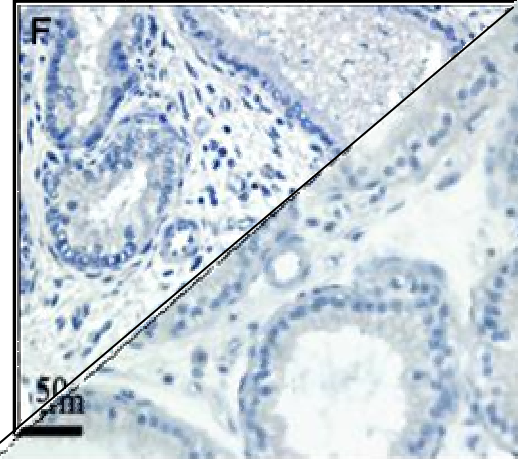


CKB

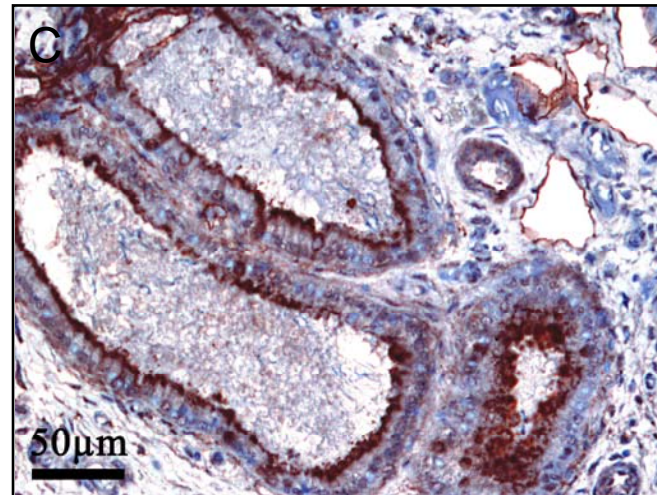


Anxa6

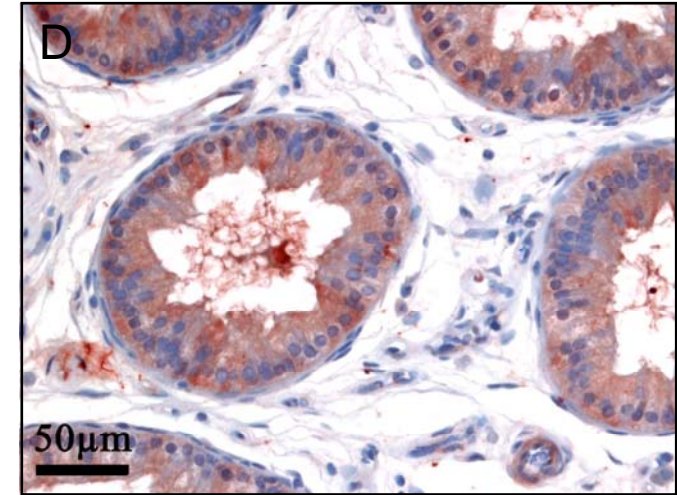
Contrôle
CKB, Anxa6, Krt 1-19



Contrôle PDZK1



Krt 1-19



PDZK1

PDZK1

- « cytoplasmic adaptator protein »
- Identifiée dans le rein, le pancréas, le foie, le tractus gastro-intestinal
- Interaction avec de nombreuses protéines: CFTR, cMOAT, cotransporteur Na/Pi IIa ...
- Rôles dans la polarisation des tubules proximaux et dans le flux ionique
- 2 ERE avec 2 mismatches
- PDZK1 est surexprimée dans les cancers ER positif
- PDZK1: réponse rapide dans la voie de régulation de ER

CKB

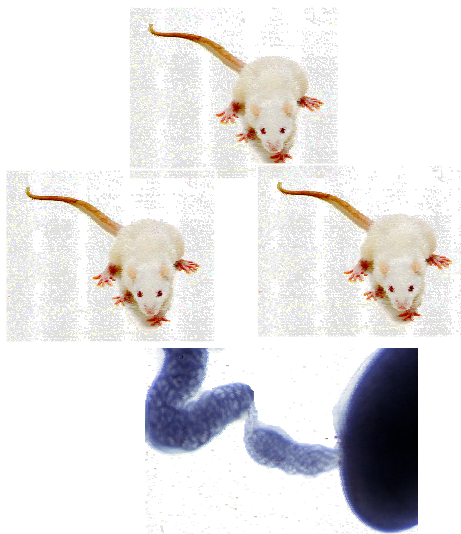
- « the estrogen induced protein »
- Identifiée dans l'utérus, le tractus génital femelle, le rein, le foie, le cœur, le tractus génital mâle...
- Permet le maintien du niveau d'ATP au cours de la demande énergétique
- Induite par les oestrogènes dans l'utérus, le sein : réponse rapide
- Protéine pouvant être sécrétée
- Marqueur plasmatique potentiel du cancer ovarien précoce chez la femme
- 2 ERE avec 2 mismatches

Perspectives ...

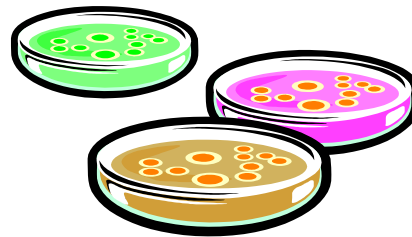
- Ontogénese de PDZK1, CKB... en RT-PCR

- Tester les candidats in vitro :

Canaux efférents de rats
sprague dawley de 9jpp

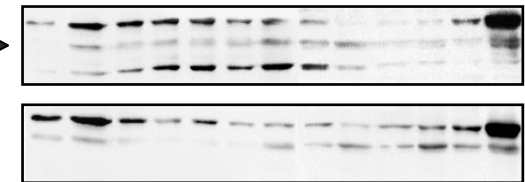


Culture organotypique de
canaux efférents



Estrogens
/ Androgens

Étude de l'expression en
western blot



Remerciements

U.625 INSERM-GERHM

Dr. Bernard Jégou

Dr. Christophe Staub

Isabelle Dorval-Coiffec

UMR 6026 CNRS

Dr. Yann Le Page

Plateforme bioinformatique de la génopôle ouest

Grégory Ranchy

Anne-Sophie Valin

Laetitia Guiot

Plateforme protéomique de la génopôle ouest

Dr. Nathalie Guitton-Lebigre

Dr. Charles Pineau

Morgane Couvet

Régis Lavigne