

Le spermatozoïde équin : cible potentielle des œstrogènes. Mise en évidence des récepteurs ER α , ER β et GPER

Par :

- B. Arkoun^{1,3}, I. Barrier², C. Travert¹, S. Carreau¹, C. Delalande¹, H. Bouraïma-Lelong¹
- ¹ EA2608-USC INRA2006 Œstrogènes et Reproduction, Université de Caen Basse-Normandie 14032 Caen
- ² Institut Français du Cheval et de l'Équitation Jumenterie du Pin 61310 Exmes
- ³ adresse actuelle : EA 4308 "Spermatogenèse et Qualité du Gamète Mâle", Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS, CHU Hôpitaux de Rouen, Université de Rouen, 76031 France.

Résumé

Le spermatozoïde de plusieurs espèces (homme, verrat, souris) est une cible potentielle des œstrogènes car la présence des récepteurs ER α et ER β a été démontrée (Carreau et Hess, 2010). Ces récepteurs peuvent être activés par fixation de l'œstradiol aussi bien dans le tractus génital mâle que femelle. L'étalon présente la particularité d'être le mammifère mâle qui possède la plus forte synthèse testiculaire d'œstrogènes. Cette production présente une variation saisonnière parallèle à celle de la spermatogenèse avec un pic de production observé entre avril et juillet, mais aucune donnée sur la présence des récepteurs sur le spermatozoïde équin n'était disponible. Nous avons donc recherché la présence des récepteurs ER α , ER β et de GPER sur le spermatozoïde éjaculé d'étalon. Nous avons mis en évidence par western-blot et par immunocytochimie la présence d'ER α et ER β avec une localisation essentiellement flagellaire. Le taux de spermatozoïdes présentant un marquage positif a été quantifié par cytométrie en flux sur des échantillons prélevés en mars et montre un marquage important (96% pour ER α et 70% pour ER β). Le récepteur GPER qui n'a jamais été étudié dans l'espèce équine a été mis en évidence pour la première fois.

Mots clés : spermatozoïde, ER α , ER β , GPER, étalon.

Summary

In many species (human, boar, mouse) spermatozoa is a putative target for estrogens because the receptors ER α and ER β have been detected (Carreau et Hess, 2010). These receptors could be activated by estradiol binding in male as in female genital tracts. Horse is characterized by the most important production of estrogens in testis among the mammals, which presents seasonal variation with high levels between april and july, but there is no data about estrogen receptor presence on spermatozoa. The aim of this study was to search the estrogen receptors (ER α , ER β and GPER) on horse spermatozoa. We found by western-blot and immunocytochemistry the 66kDa ER α and the 61 kDa ER β localized on flagellum. By flow cytometry, we detect a positive signal for ER α on 96% of spermatozoa and on 70% for ER β on samples obtain in march. Moreover for the first time, GPER has been studied and detected in horse.

Key-words: spermatozoa, ER α , ER β , GPER, horse.

Introduction

La spermatogenèse est un processus complexe qui permet d'obtenir des spermatozoïdes à partir de cellules germinales souches. Elle se déroule au sein du testicule, mais les spermatozoïdes doivent encore subir un certain nombre de maturations qui ont lieu dans le tractus génital mâle, puis après éjaculation dans le tractus génital femelle afin d'acquiescer la capacité à féconder l'ovocyte. L'ensemble de ces événements est régulé par des facteurs endocrines (sécrétés par un organe et qui agissent sur un autre organe) et paracrines (qui sont sécrétés par une cellule et agissent sur la cellule voisine). Parmi ceux-ci, les œstrogènes semblent être des candidats crédibles, car ils sont présents dans le testicule puis dans le tractus génital mâle et femelle et peuvent y agir par l'intermédiaire de leurs récepteurs spécifiques (Carreau et Hess, 2010). Parmi les mammifères, l'étalon est le mâle qui présente la plus forte synthèse d'œstrogènes par le testicule, ce sont les cellules de Leydig qui sont essentiellement responsables de cette synthèse (Almadhidi *et al.*, 1995). Cette synthèse varie en fonction des saisons avec un pic de production entre avril et juillet ce qui correspond à la saison de reproduction (Lemazurier *et al.*, 2002). Il semble donc qu'il y ait plus d'œstrogènes lorsque la spermatogenèse est plus active et présente une meilleure qualité. Nous émettons l'hypothèse que les œstrogènes pourraient être impliqués dans la spermatogenèse chez l'étalon ou dans les maturations ayant lieu dans l'épididyme ou le tractus génital femelle. La présence ou l'absence de l'aromatase, enzyme responsable de la synthèse des œstrogènes à partir des androgènes, ou des récepteurs aux œstrogènes pourraient donc être le reflet du bon déroulement de la spermatogenèse et/ou des maturations post-testiculaires. De plus dans certaines espèces comme le verrat (Ded *et al.*, 2010) ou la souris (Fraser *et al.*, 2006), les œstrogènes peuvent agir directement sur le spermatozoïde pour stimuler la capacitation, ensemble de maturations qui se déroulent dans le tractus génital femelle et qui sont indispensables à la réussite de la fécondation. Nous avons donc pour objectif de rechercher la présence des récepteurs aux œstrogènes sur le spermatozoïde éjaculé d'étalon afin de déterminer si le spermatozoïde peut être la cible des œstrogènes. Dans un second temps, si un ou plusieurs récepteurs sont détectés nous étudierons leur fonctionnalité afin de déterminer s'ils peuvent être impliqués dans des maturations se produisant dans le tractus génital mâle et/ou femelle. Ainsi ils pourraient constituer un ensemble permettant d'apprécier la qualité de la spermatogenèse et la capacité du spermatozoïde à féconder l'ovocyte.

1. Recherche des récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β

Nous avons commencé par la recherche des récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β qui sont les deux récepteurs déjà caractérisés chez l'étalon. Ce sont des récepteurs nucléaires qui peuvent agir en tant que facteurs de transcription pour réguler l'expression de gènes. Ces deux récepteurs peuvent également être associés à la membrane et être actifs dans une voie de signalisation afin de réguler rapidement une fonction cellulaire. C'est ce dernier mécanisme qui serait envisageable dans le cas du spermatozoïde, chez qui les gènes ne peuvent plus s'exprimer entre la fin de la spermiogenèse et la fécondation mais qui doit accomplir un certain nombre d'actions dans le même temps.

Nous avons donc recueilli les spermatozoïdes de 10 étalons différents âgés de 10 à 23 ans entre juin 2010 et juin 2011 afin de rechercher la présence de ces deux récepteurs sur le spermatozoïde éjaculé. Les spermatozoïdes ont été recueillis à la Jumenterie du Pin, le plasma séminal a été séparé et les spermatozoïdes ont été ensuite lavés trois fois en milieu Tyrode. Ils ont ensuite été fixés pour une part pour analyses en microscopie confocale et congelés pour l'autre part, pour analyses par western-Blot.

Nous avons mis en évidence par immunocytochimie à l'aide d'anticorps commerciaux (MC-20 pour ER α et H-150 pour ER β) la présence des deux récepteurs sur le spermatozoïde avec pour les deux une localisation essentiellement au niveau du flagelle et à la base de la tête.

Figure I : Immunolocalisation du récepteur ER α .
Figure I: Immuno-localization of ER α .



Observation en microscopie confocale de la localisation d'ER α après détection par l'anticorps MC-20. On observe un signal positif au niveau du flagelle et à la base de la tête.

La taille des deux récepteurs ainsi que la spécificité du marquage obtenu avec les anticorps ont été vérifiés par Western-blot. Nous avons bien retrouvé une seule bande pour ER α , de taille 66kDa, ce qui correspond à la taille de ce récepteur décrit chez le cheval. De même, une seule bande également a été observée pour le récepteur ER β , de 61 kDa, conforme également à la taille de ce récepteur décrite chez cette espèce.

Par cytométrie en flux, nous avons évalué le taux de spermatozoïdes positifs pour la détection de ER α et ER β et nous obtenons en moyenne, 96% de spermatozoïdes présentant un marquage positif pour ER α sur des étalons prélevés en mars et 70% de spermatozoïdes marqués dans un éjaculat en moyenne pour ER β . Ceci représente des résultats préliminaires et seuls trois étalons ont été testés sur les 10 de l'étude qui sont intégrés dans la recherche des récepteurs en microscopie et l'analyse en Western-blot.

Tableau 1 : Quantification des récepteurs ER α et ER β sur des spermatozoïdes prélevés en mars.
Table 1: Quantification of ER α and ER β on spermatozoa obtained on March

	Etalon 1	Etalon 2	Etalon 3	Moyenne	SEM
ER α	97%	93,73%	98,63%	96,45	1,44
ER β	69,45	63,65	73,96	69,02	2,98

La quantification des récepteurs a été effectuée en cytométrie en flux sur prélèvements obtenus à partir de trois étalons, 20 000 spermatozoïdes ont été analysés. Les résultats sont exprimés en pourcentage.

Dans un second temps nous évaluerons la fonctionnalité de ces récepteurs avec des incubations *in vitro* d'œstrogènes exogènes et des agonistes et antagonistes spécifiques de chaque récepteur afin d'étudier leur possible implication dans les maturations post-éjaculation.

2. Mise en évidence du récepteur GPER dans l'espèce équine

Récemment un troisième récepteur fixant les œstrogènes, nommé GPER ou GPR30, récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G a été mis en évidence. Celui-ci permet également de transmettre des effets non-génomiques des œstrogènes. Il n'a jamais été étudié dans l'espèce équine mais le séquençage du génome du cheval révèle la présence d'une région du génome comprenant un gène « GPER-like ». A partir de cette donnée, nous avons recherché sur le spermatozoïde à l'aide d'un anticorps commercial dirigé contre GPER humain la présence de ce récepteur. Nous avons mis en évidence un signal sur certains spermatozoïdes. La recherche par Western-blot a permis de mettre en évidence la présence de 2 bandes de 41 et 38 kDa pour ce récepteur, ce qui correspond à la taille décrite chez les autres espèces. Afin de confirmer l'expression de ce gène, nous avons extrait les ARNm à partir d'échantillon de testicule et de spermatozoïdes, ceux-ci ont été rétrotranscrits et amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques désignés d'après la séquence génomique. Un seul fragment a été amplifié, celui-ci a été séquencé et présente une homologie de 100% avec la région génomique. Nous avons donc mis en évidence pour la première fois, l'expression du gène GPER dans l'espèce équine, avec une expression dans le testicule de poulain prépubère. Ces résultats seront à confirmer sur un plus grand nombre d'échantillons ainsi que sur les ARNm résiduels du spermatozoïde pour lesquels également un seul fragment a été amplifié, de même nous étendrons l'étude à des étalons.

Conclusion

Nous avons donc mis en évidence la présence des trois récepteurs aux œstrogènes sur le spermatozoïde éjaculé d'étalon, avec des résultats à confirmer pour le séquençage de GPER sur un plus grand nombre d'individus. Ceci nous permet de dire que le spermatozoïde peut être une cible des œstrogènes. Ceux-ci peuvent agir lors du passage dans l'épididyme car il existe une synthèse locale d'œstrogènes, mais également dans le tractus génital femelle. Ainsi ceux-ci pourraient être impliqués dans la régulation des fonctions du spermatozoïde acquises dans le tractus génital mâle et/ou femelle, c'est à dire mobilité puis capacitation/réaction acrosomique /hyperactivation. En effet, ces différentes fonctions sont contrôlées par différentes voies de signalisation déclenchées par des effecteurs du milieu extra-cellulaire, qui ne sont pas tous identifiés. Ainsi les œstrogènes en activant leurs récepteurs sur le spermatozoïde pourraient participer de façon active aux événements précédant la fécondation, essentiels à la maturation du spermatozoïde. Ces événements ne sont pas encore totalement maîtrisés dans l'espèce équine et ces investigations pourraient ainsi permettre une meilleure compréhension des étapes préalables à la fécondation. Nous étudierons également la présence des récepteurs sur des échantillons prélevés à différentes périodes de l'année pour évaluer une possible variation de la quantité des récepteurs en fonction de la saison. Ceci pourrait nous donner des indications sur un lien potentiel entre

récepteurs aux œstrogènes et qualité de la spermatogenèse, ce qui à terme pourrait constituer un marqueur potentiel de la fertilité des étalons.

Remerciements

Ce travail a été financé sur un projet soutenu par l'IFCE en 2011.

Références

Almadhidi J, Seralini GE, Fresnel J, Silberzahn P, Gaillard JL. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads. *J Histochem Cytochem*. 1995 Jun;43(6):571-7.

Carreau S. et Hess R. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010 May 27;365(1546):1517-35.

Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K, Peknicova J. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010 Jul 13;8:87.

Fraser LR, Beyret E, Milligan SR, Adeoya-Osiguwa SA. Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. *Hum Reprod*. 2006 May;21(5):1184-93.

Lemazurier E, Moslemi S, Sourdain P, Desjardins I, Plainfosse B, Seralini GE. Free and conjugated estrogens and androgens in stallion semen. *Gen Comp Endocrinol*. 2002 Feb 1;125(2):272-82.