

Etude des héparan sulfates protéoglycans anticoagulant dans la reproduction

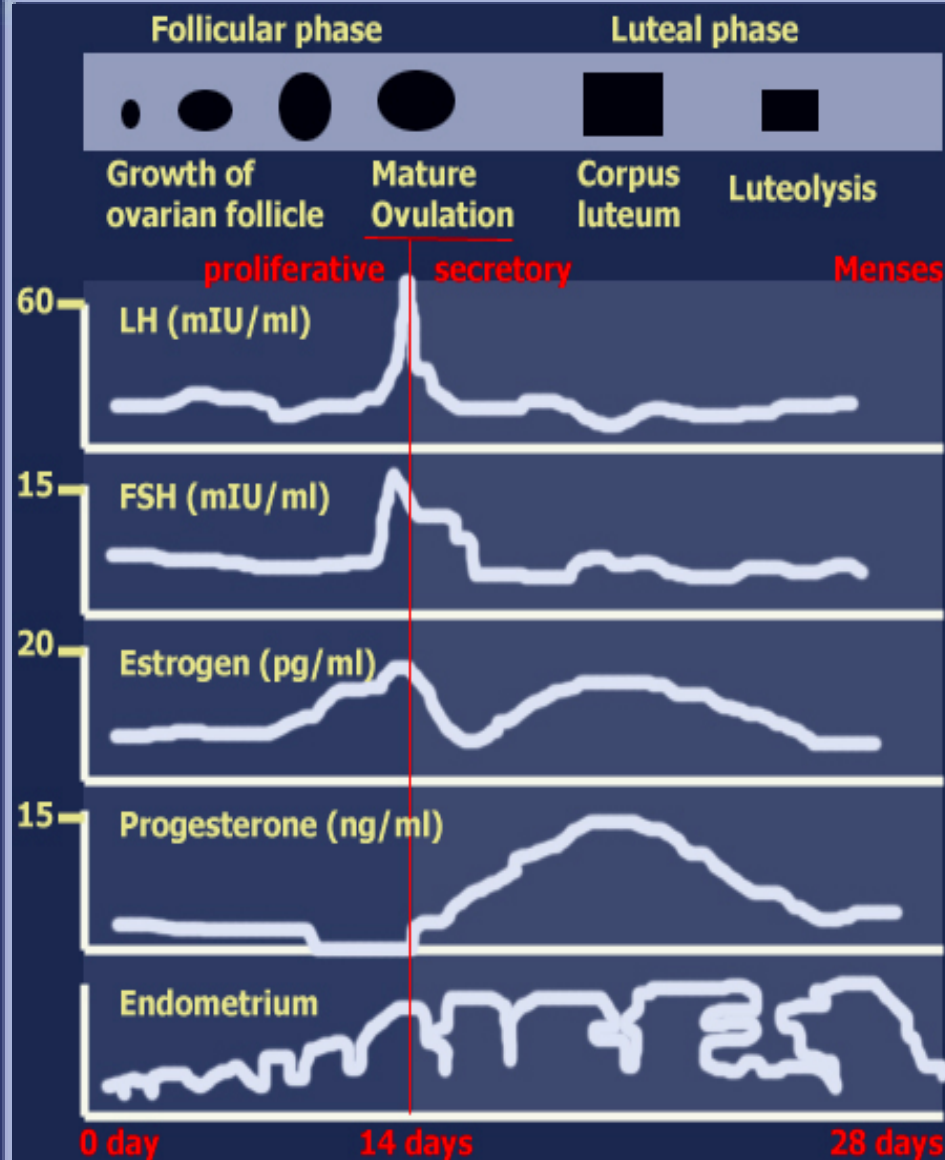
**Pattern d'expression chez les rongeurs, dans l'ovaire
humain, et fonction de reproduction dans
des modèles de souris transgéniques**

**Marc Princivale
Thèse**

Mars 2001

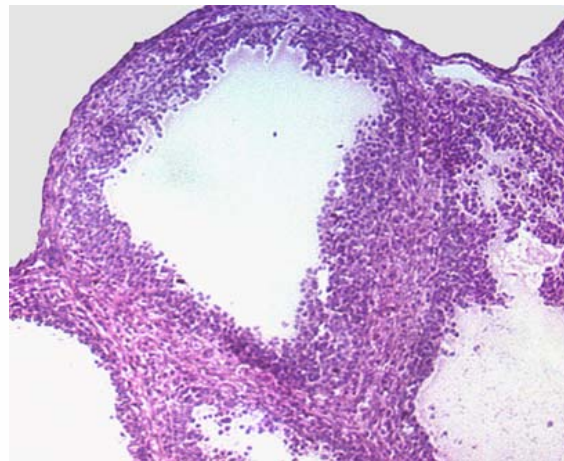
- 1. Introduction
- 2. Colocalisation des aHSPG et des serpins
- 3. Expression des core protéines
- 4. Approche transgénique 3-OST-1
- 5. Localisation des aHSPG dans tractus génital souris wild-type et 3-OST-1 knockout
- 6. Phénotypes anatomiques des souris 3-OST-1 knockout
- 7. Conclusion et perspectives

1. Introduction: Ovulation, cascades enzymatiques

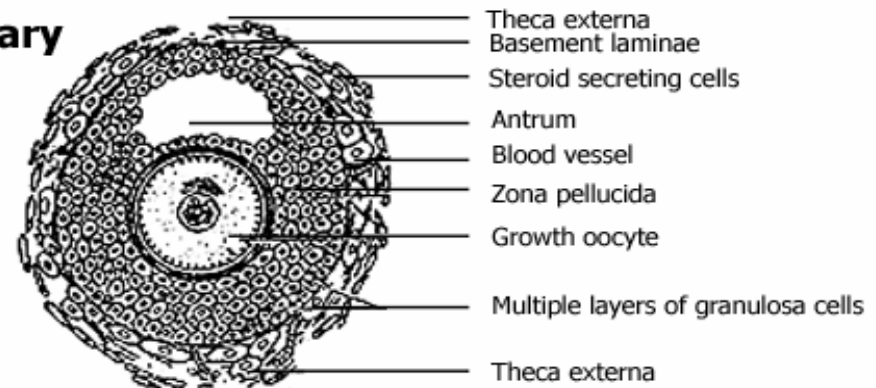


- Contrôle hormonale FSH et LH
- Enzymes protéolytiques
- Inhibiteurs de protéases (serpines)
- Contrôle et régulation stricts

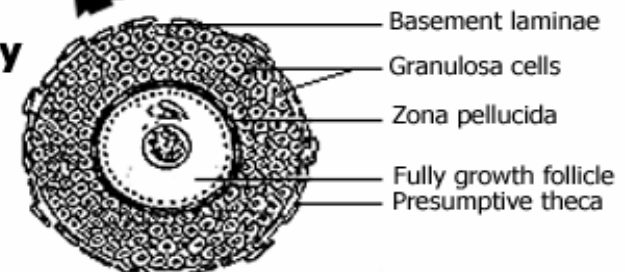
1. Introduction: Développement folliculaire



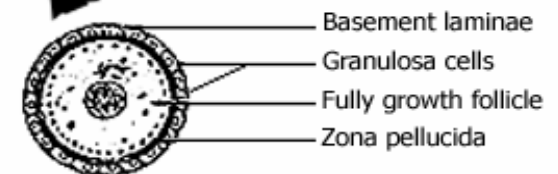
Early tertiary follicle



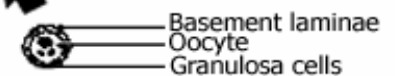
Secondary follicle



Primary follicle

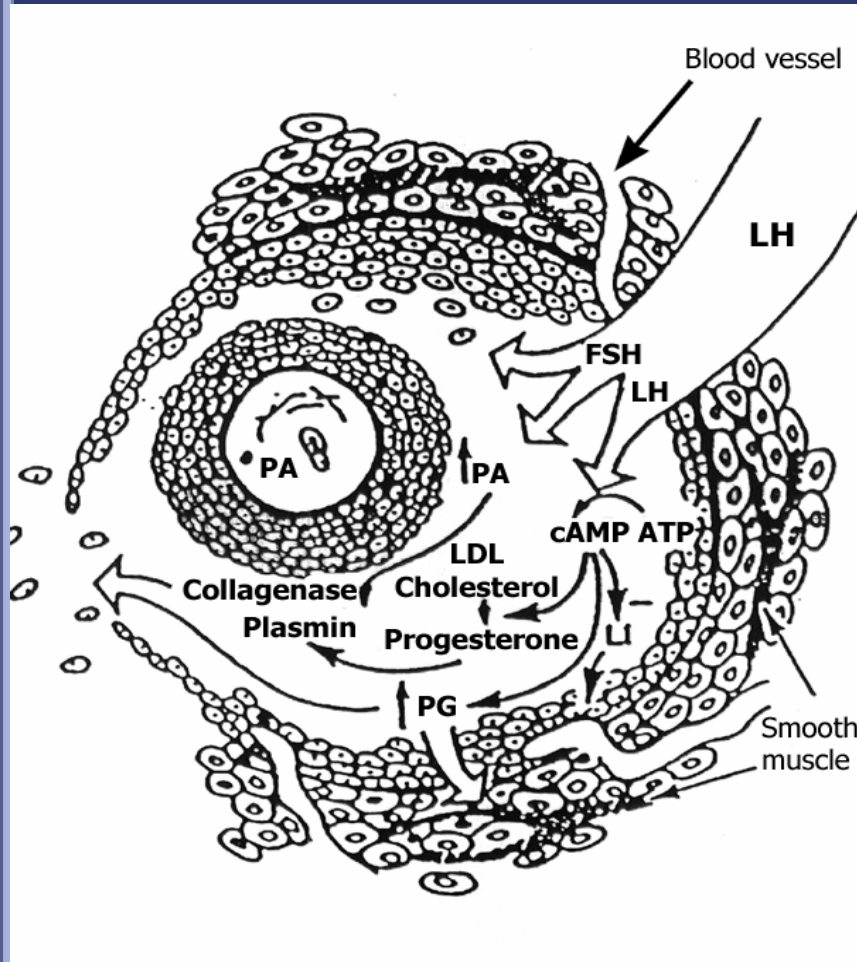


Primordial follicle



Graffian follicle

1. Introduction: Ovulation, cascades enzymatiques



- Pic de LH déclenche l'ovulation

- Cascade d'événements enzymatiques



Rupture du follicule + expulsion de l'ovocyte

- Activation du système du plasminogène et collagenase

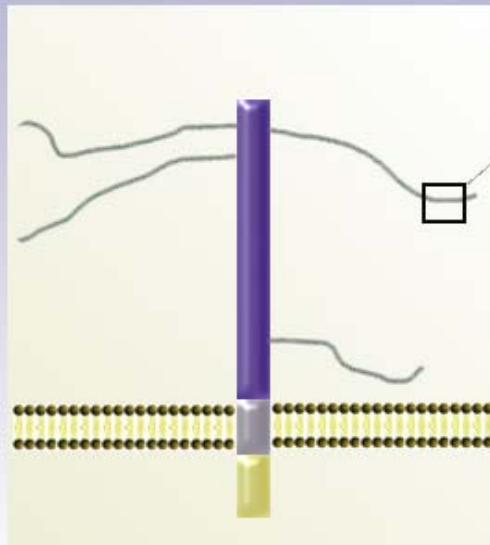
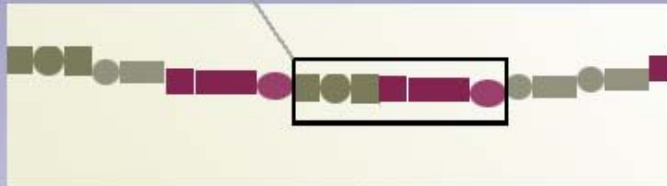
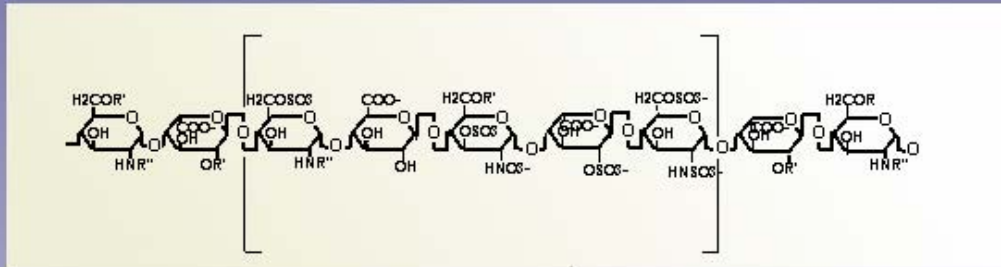
- Inflammation péri-folliculaire

- Perméabilisation vasculaire

- Formation d'un caillot de fibrine

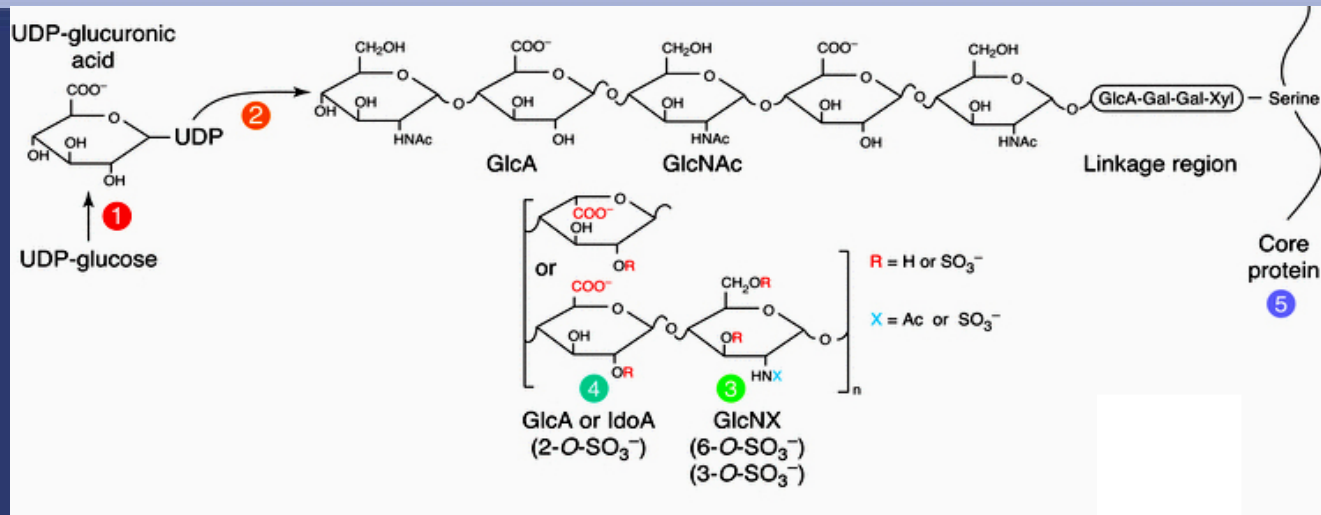
- Formation du corps jaune

1. Introduction: Structure aHSPG



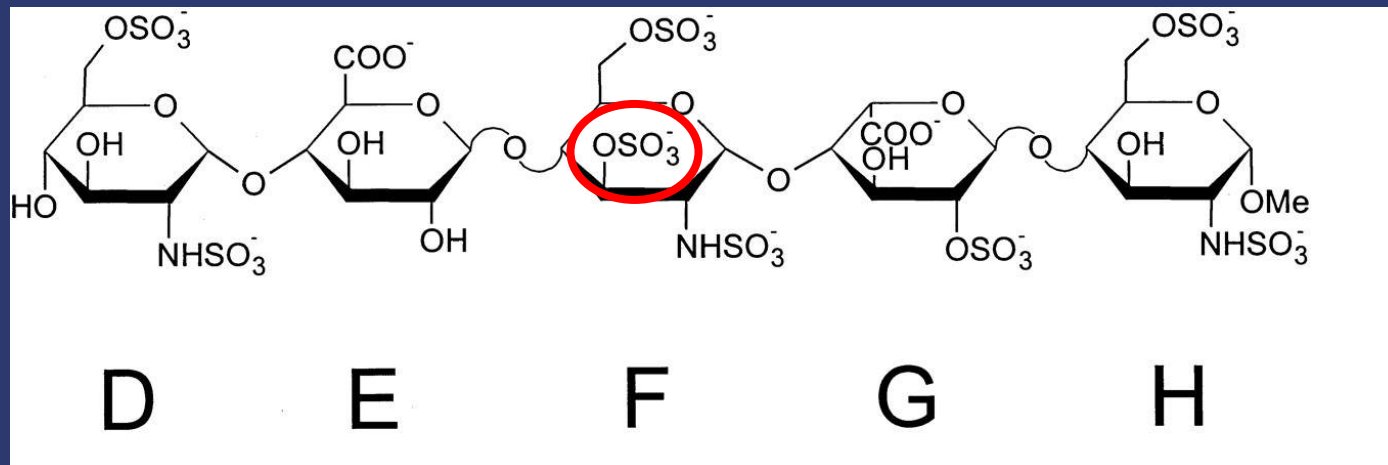
- aHSPG: héparan sulfate protéoglycans anticoagulant
- Partie protéinique et chaînes de GAGs
- Fonction des core protéines : attachement pour ces longues chaînes
- Activité anticoagulante : pentasaccharide de séquence identique à l'héparine

1. Introduction : Biosynthèse des aHSPG



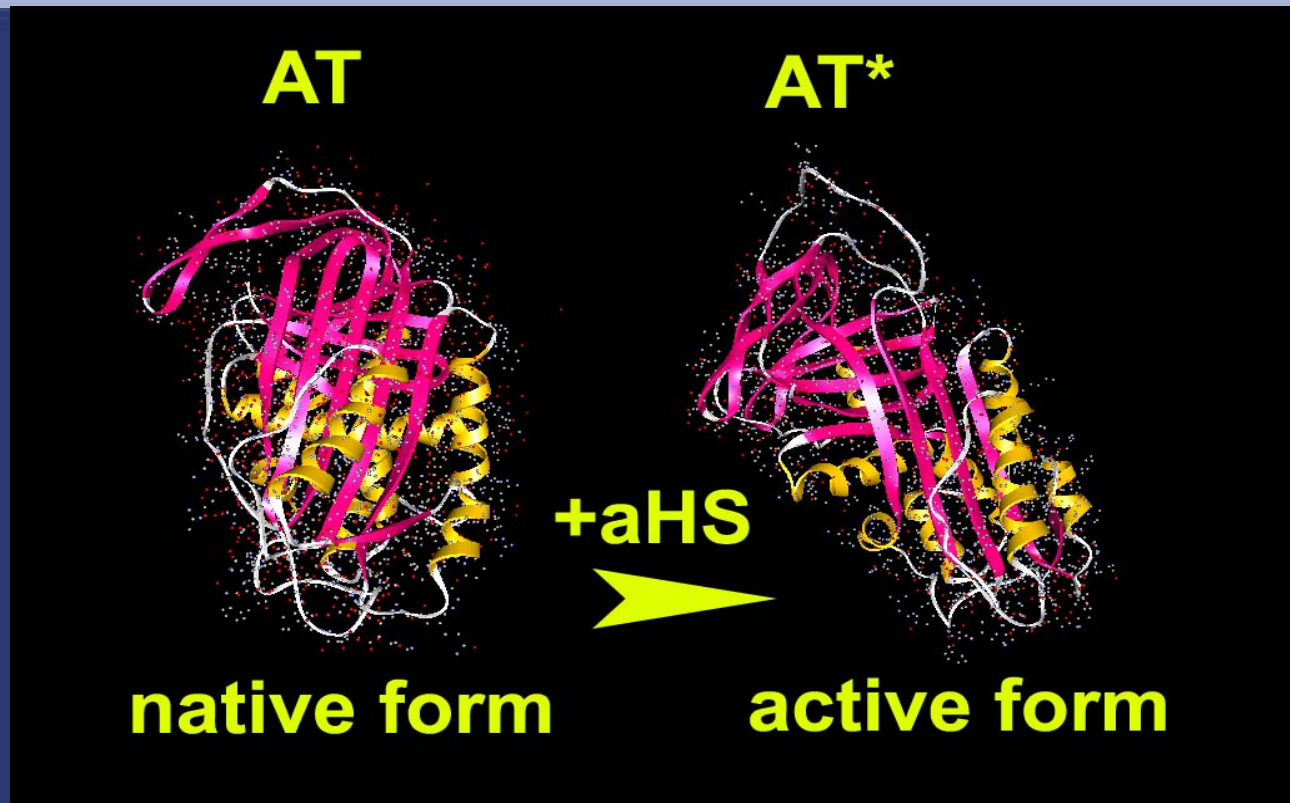
- Il n'existe pas de gènes codant pour ces différents GAGs
- Chaînes linéaires constituées d'unités répétitives de glucosamines et d'acide uroniques
- Modifications : N-déacétylation, N- et O-sulfatation à différentes positions
- Synthèse séquentielle et ordonnée par enzymes du Golgi, réactions souvent incomplètes
- Enorme diversité de produits et d'activités biologiques

1. Introduction : Biosynthèse des aHSPG



- 3-D-glucosaminyl-D-Sulfotransferase-1 : 3-OST-1
- Catalyse l'ajout spécifique d'un groupe sulfate en position 3 sur un pentasaccharide de séquence spécifique
- Etape limitante dans biosynthèse aHS et héparine

1. Introduction: Mécanisme d'action des serpins



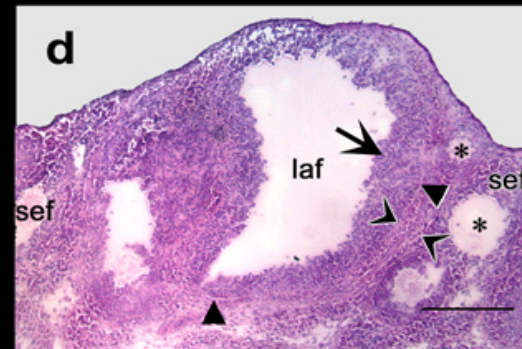
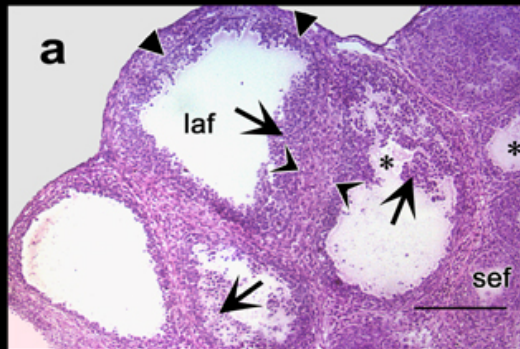
- Inhibiteurs des serine protéases : serpins AT, PN-1 et PAI-1
- Les serpins piègent leurs cibles en formant complexe covalent
- aHSPG activent la serpine et la localise à la surface des cellules

1. Introduction: Rôle physiologique des aHSPG ?

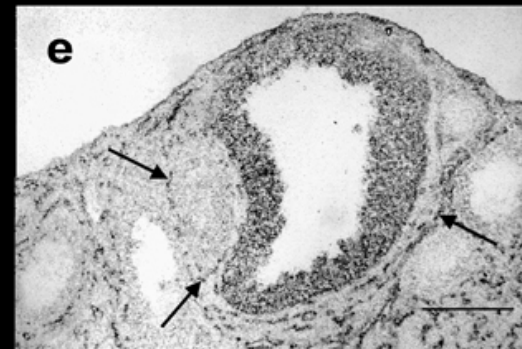
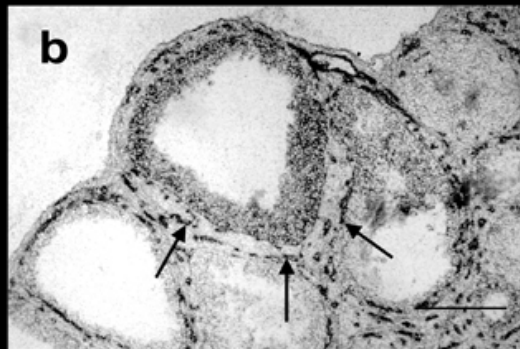
- Fonction des aHS en dehors du contexte vasculaire est inconnue
- aHS sont fortement exprimés par cellules de granulosa ovarienne
- Cellules de granulosa comme modèle dans l'études des aHS extravasculaires
 - Follicule jusqu'au moment de l'ovulation est un espace avasculaire
 - Différentiation sous contrôle hormonal
 - Défauts de l'ovulation est une cause fréquente de stérilité
- Hypothèse de travail: les aHS sont impliqués dans le contrôle des différents événements protéolytiques pendant l'ovulation
- Rôle dans le tractus génital et dans d'autres compartiments extravasculaires

2. Colocalisation aHSPG et serpinés

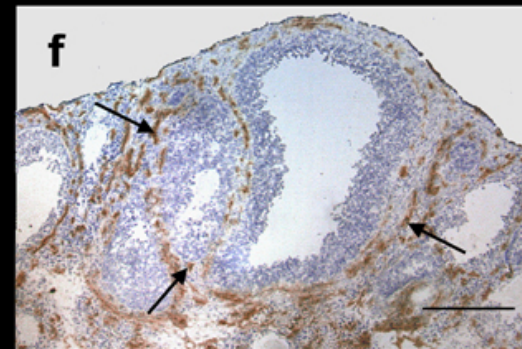
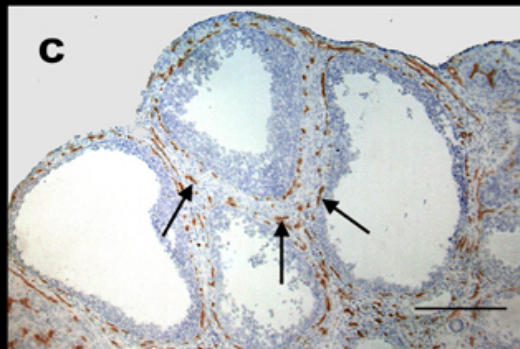
HE



^{125}I -AT

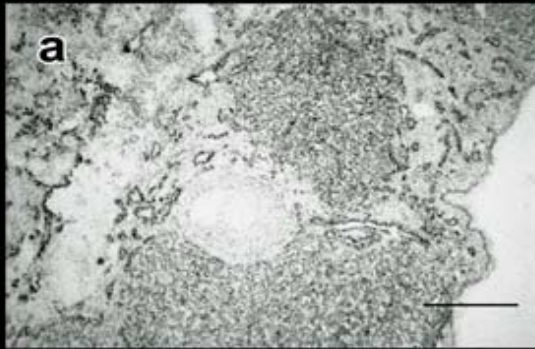


RECA



2. Localisation des aHSPG pendant cycle naturel

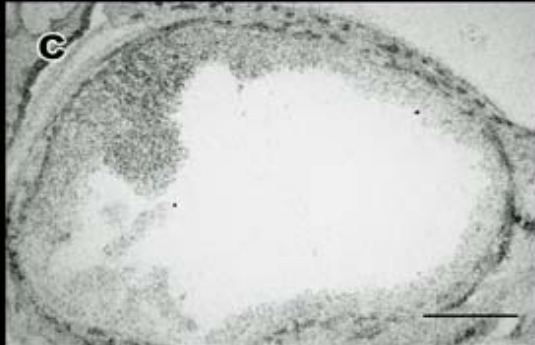
Proestrus



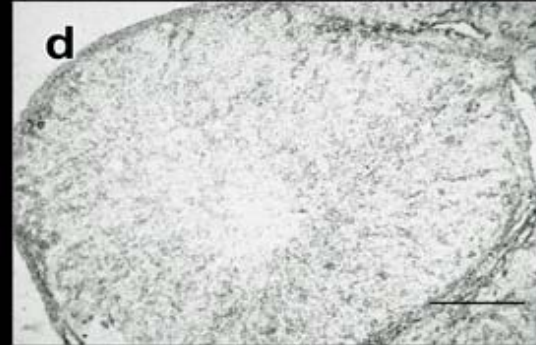
Estrus



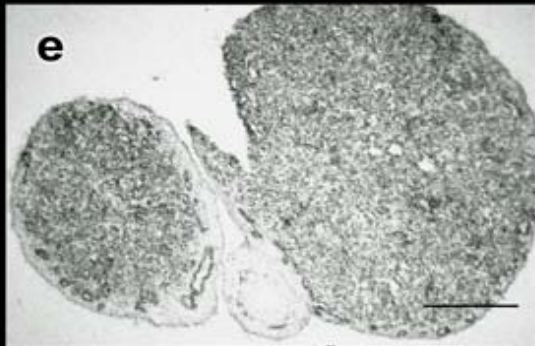
Metestrus



Diestrus



Diestrus



**Contrôle
héparine**



2. Colocalisation aHSPG et serpinés

Diestrus

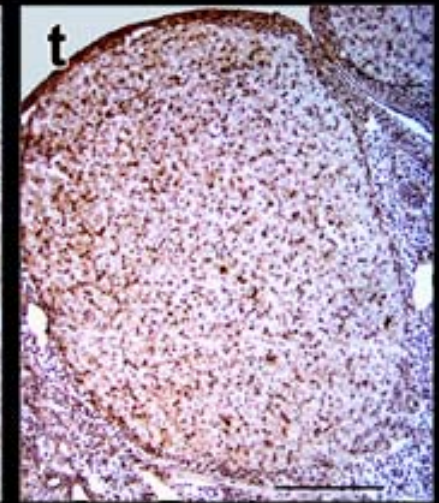
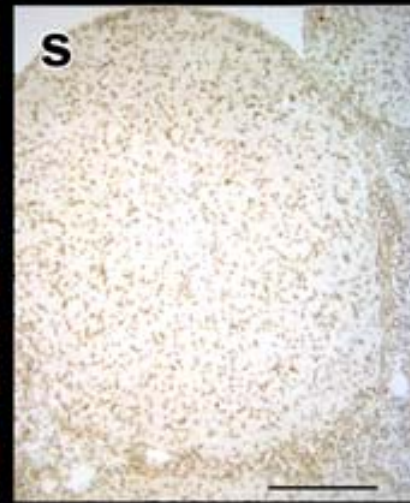
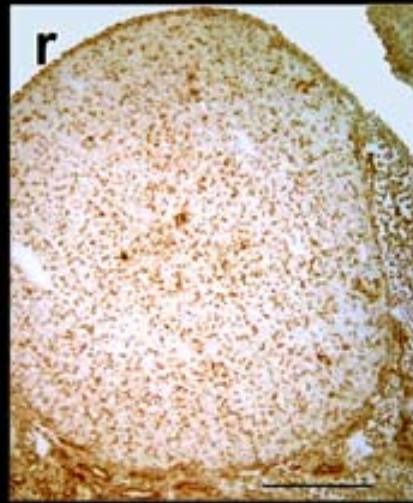
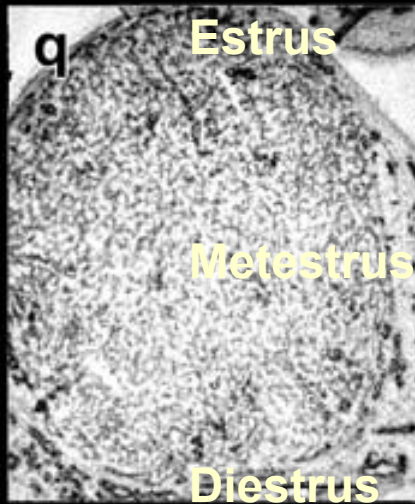
Proestrus

¹²⁵I-AT

AT

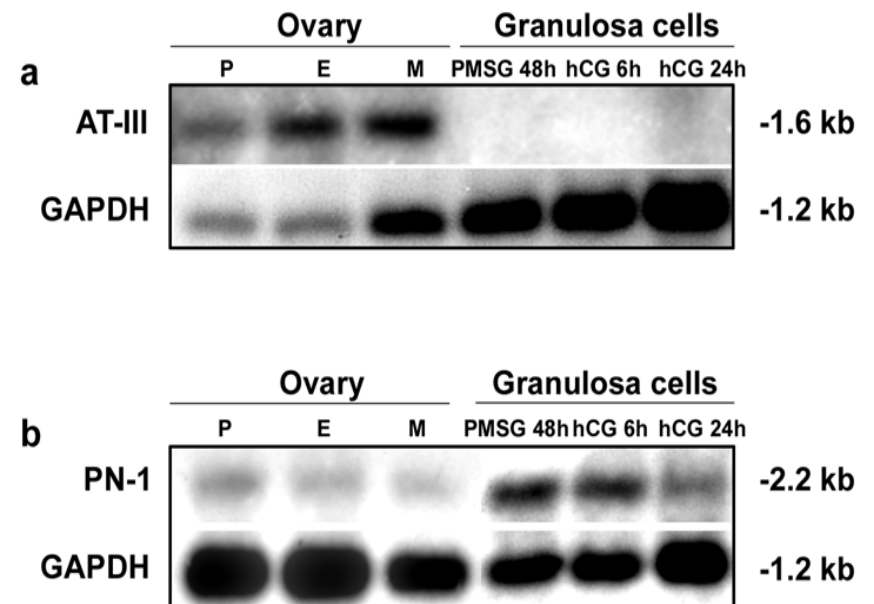
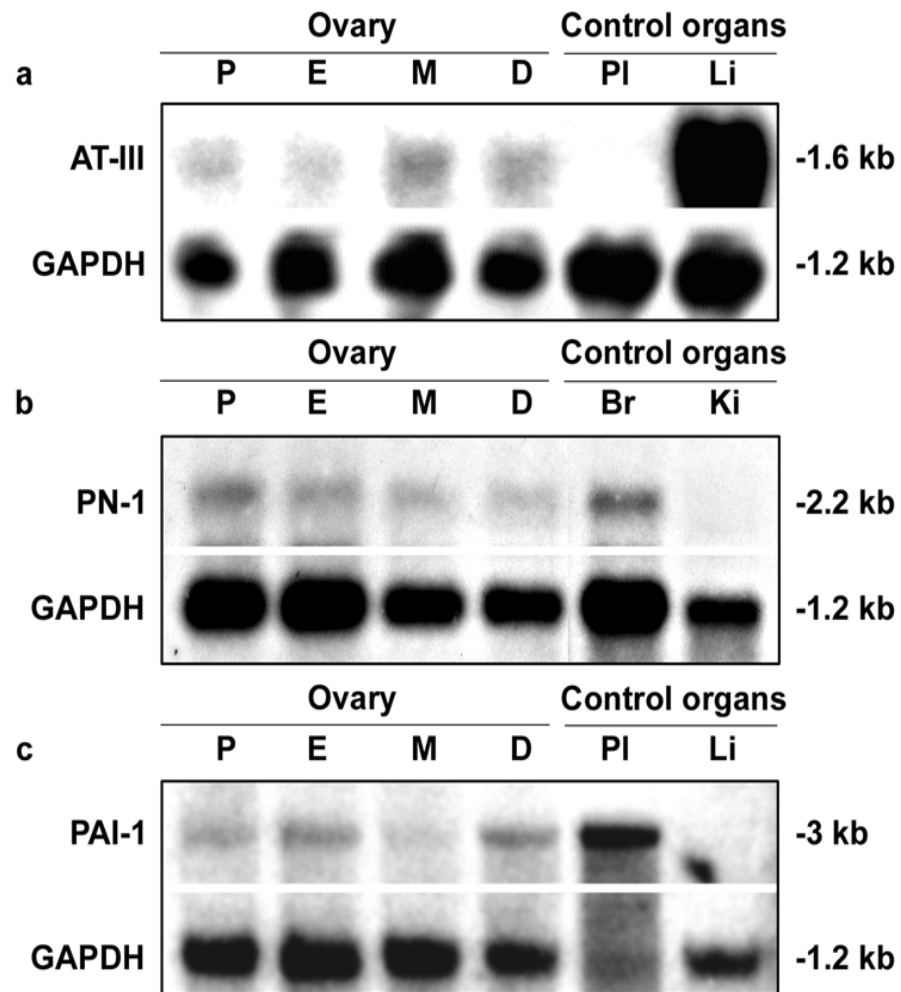
PN-1

PAI-1



Diestrus

2. Expression des serpinés

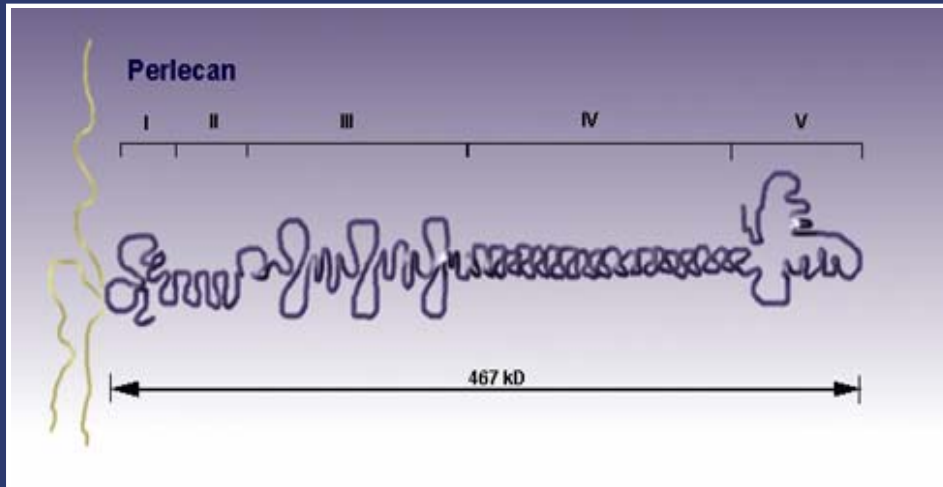
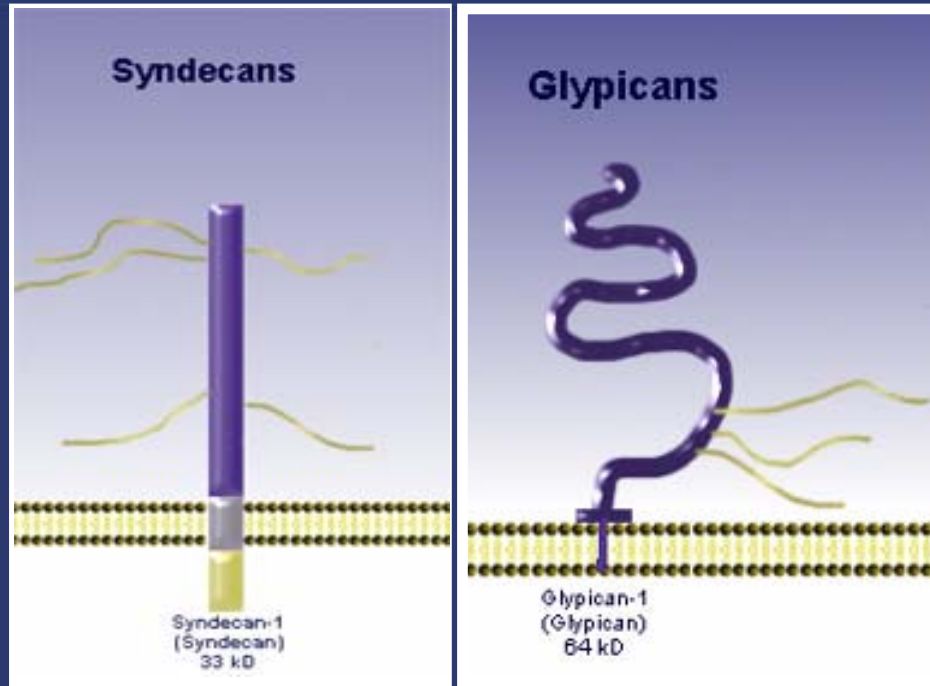


10 µg RNA total (rat), blots quantifiés par rapport expression GAPDH

2. Conclusion colocalisation aHSPG et serpinés

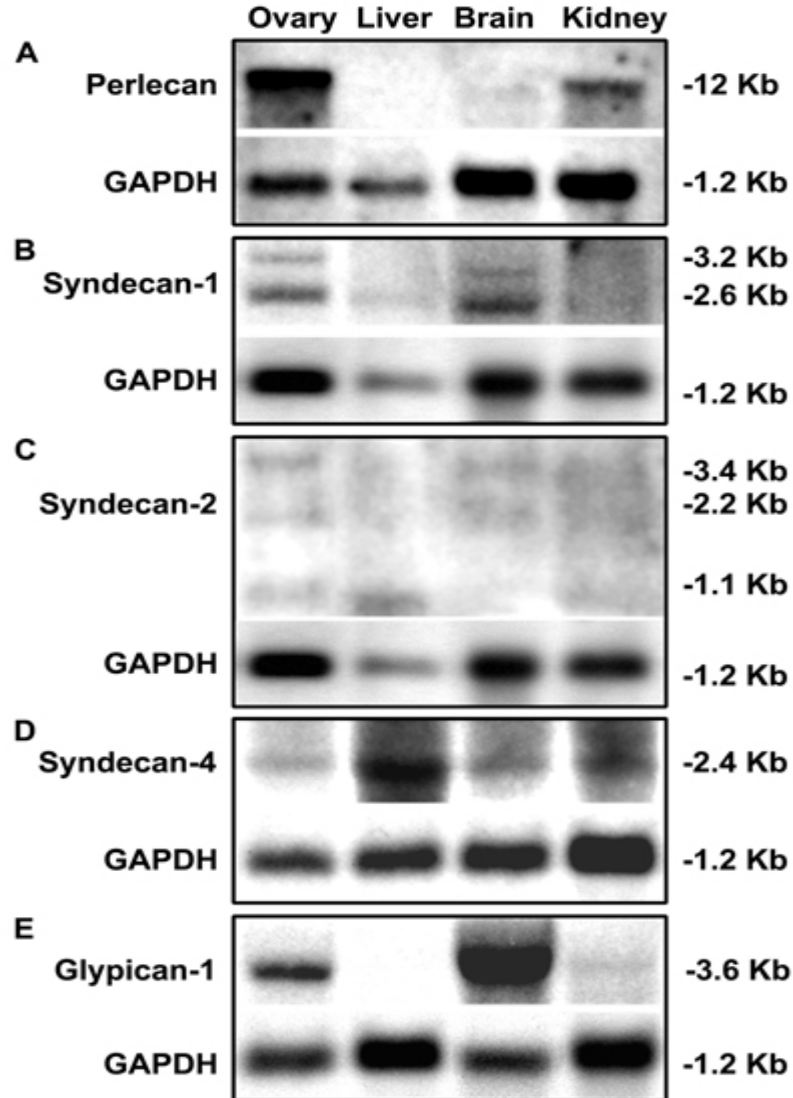
- aHSPG fortement exprimés par les cellules de granulosa ovarienne
- Variation importante pendant le cycle ovarien
- Susceptibles de lier et activer des serpinés : PN-1, AT et PAI-1
- Peu ou pas de variations au niveau expression RNA des serpinés
- PN-1 fortement exprimée par cellules de granulosa
- AT n'est pas exprimé par les cellules de granulosa, probablement d'origine plasmatique

3. Expression des HSPG core protéines



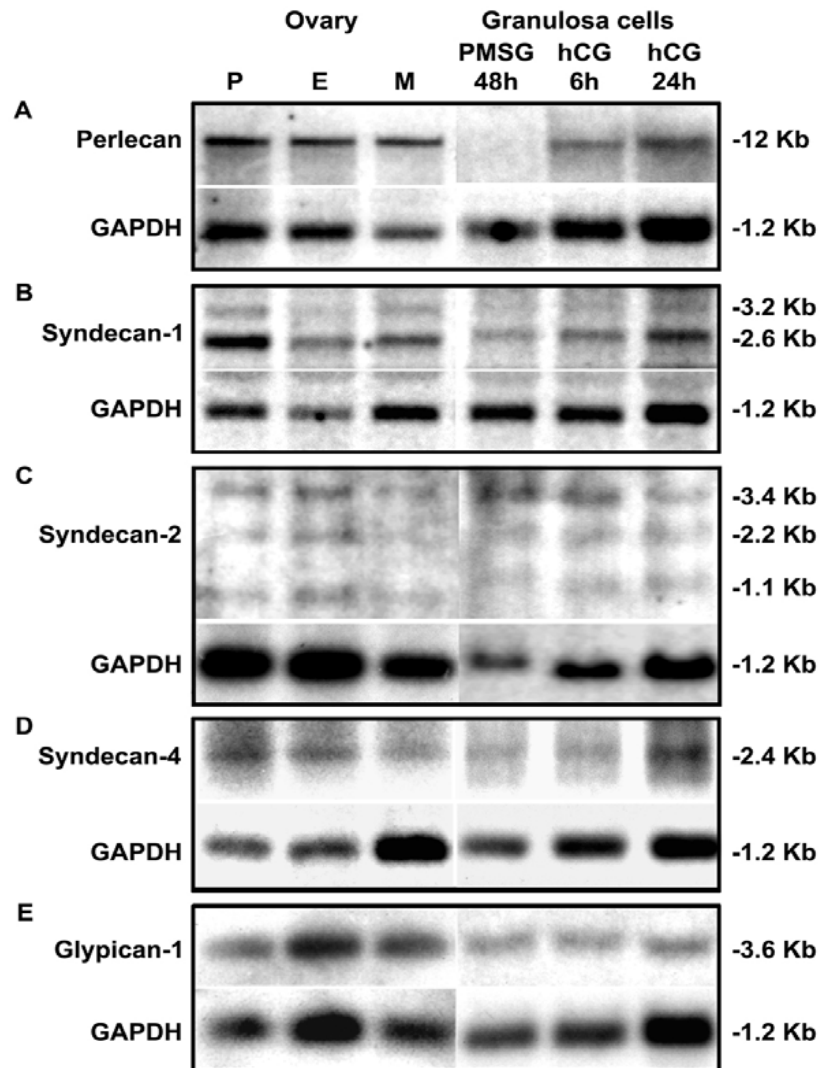
- 3 familles différentes
- **Syndecan** : 4 membres, transmembranaires
- **Glypican** : 6 membres minimum GPI-anchor
- **Perlecan** : sécrétée dans les membranes basales (457 kD)

3. Expression core protéines par northern blots



10 μ g RNA total (rat)
Blots quantifiés par rapport
GAPDH

3. Expression core protéines par northern blots



10 μ g RNA total (rat)
Blots quantifiés par rapport
GAPDH

3. Conclusion expression core protéines

- Expression de multiples core protéines par l'ovaire et cellules de granulosa

- Syndecan-1, -2, -4

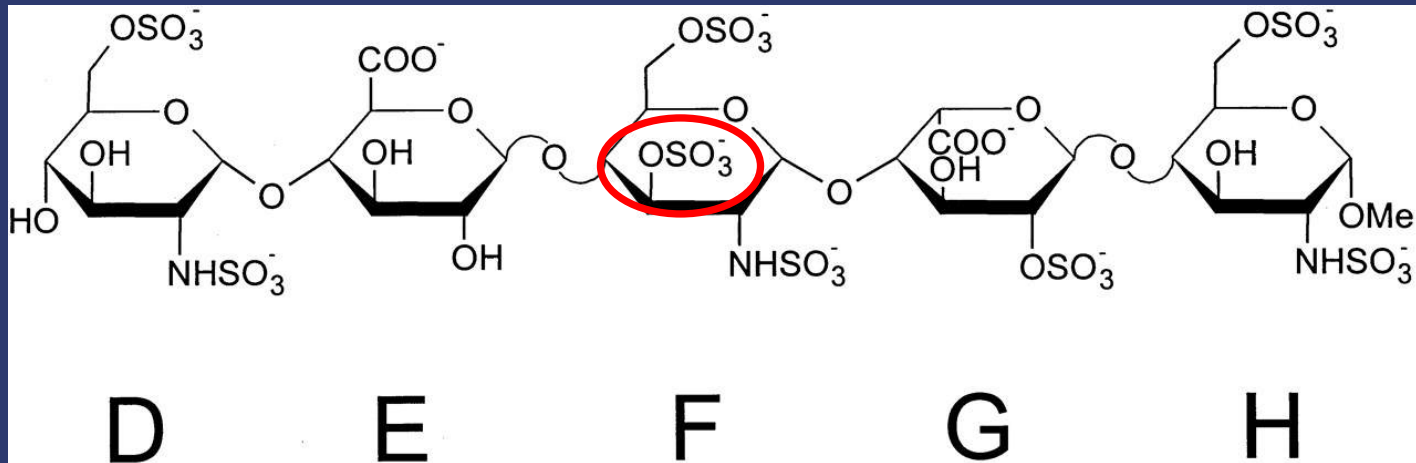
- Glypican-1

- Perlecan

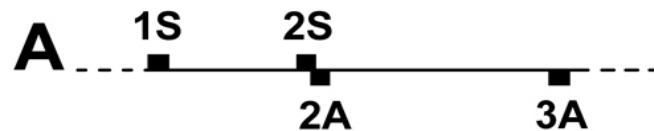
- Peu ou pas de variations dans l'expression de ces core protéines
- Variations des aHSPG observés sur cryosections, ne sont pas dûes aux variations d'expression des core protéines

4. Approche transgénique

- 3-D-glucosaminyl-O-sulfotransferase-1 (3-OST-1)
- Famille sulfotransferase catalyse l'ajout d'un groupe sulfate sur différentes positions (2-OST, 3-OST, 6-OST)
- Familles de gènes exprimés de façon tissu-spécifique
- Vérification de l'expression de la 3-OST-1 dans l'ovaire et les cellules de granulosa de rat

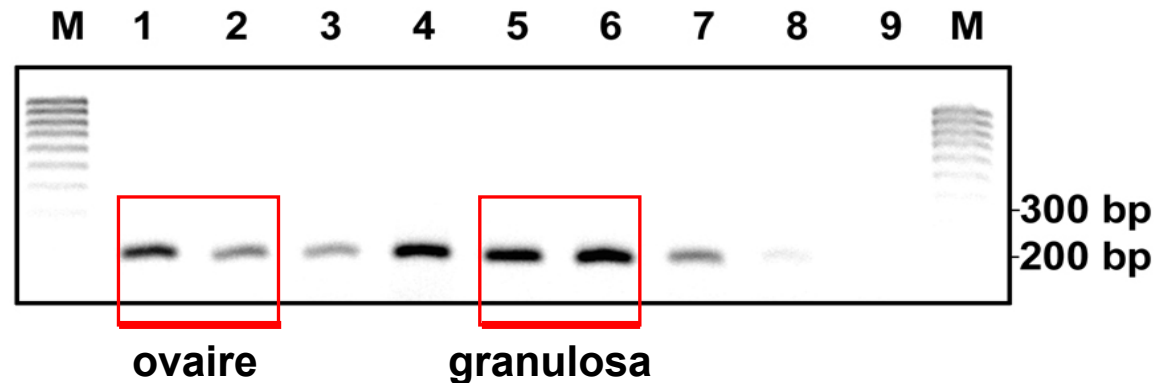


4. Approche transgénique: Expression de la 3-OST-1



1S : CCT GGC CCG GGA CTC AAA CAG CAG GG
2S : CAT CCT GAT GTT GCG GCA GCT GAA AA
2A : TCC CAG TCA AAG AAA TGG ACC TCG TTT TC
3A : TTG GGA TCT ACT TGA GGG TGC GC

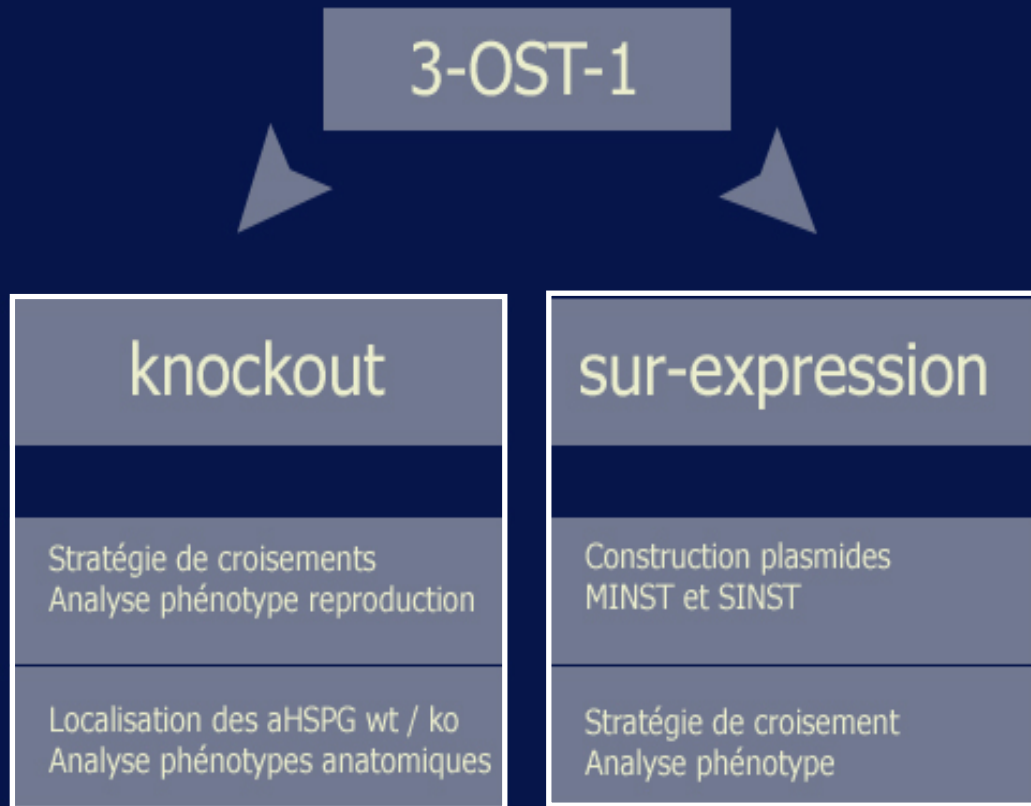
B



A. Séquences des primers et position sur cDNA rat

B. Analyse par RT-PCR

4. Approche transgénique

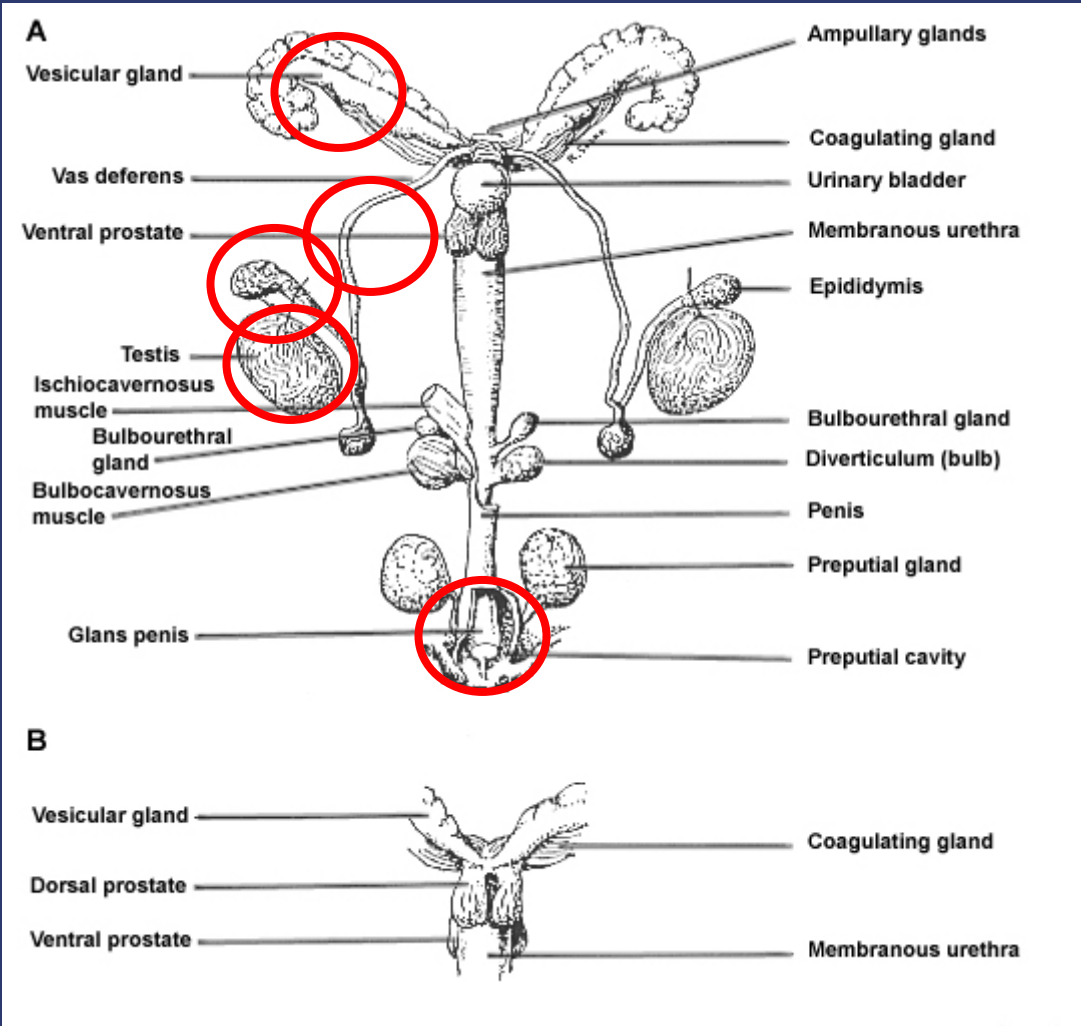


- 3-OST-1 knockout par collaboration
- Génération par recombinaison homologue dans cellules souches
- 3-OST-1 sur-expression lignées MINST et SINST
- Résultats 3-OST-1 knockout
- Analyses phénotypes

4. Conclusion phénotype de reproduction

- aHSPG fondamentaux dans la reproduction
- Phénotype de reproduction sévère, faible performance
- Déviation rapport mâles - femelles
- Autres configurations en étude : $+/+ \times -/-$: faible reproduction, mais pas de changement rapport M/F
- Elargissement étude aHSPG dans tractus génital mâle et femelle

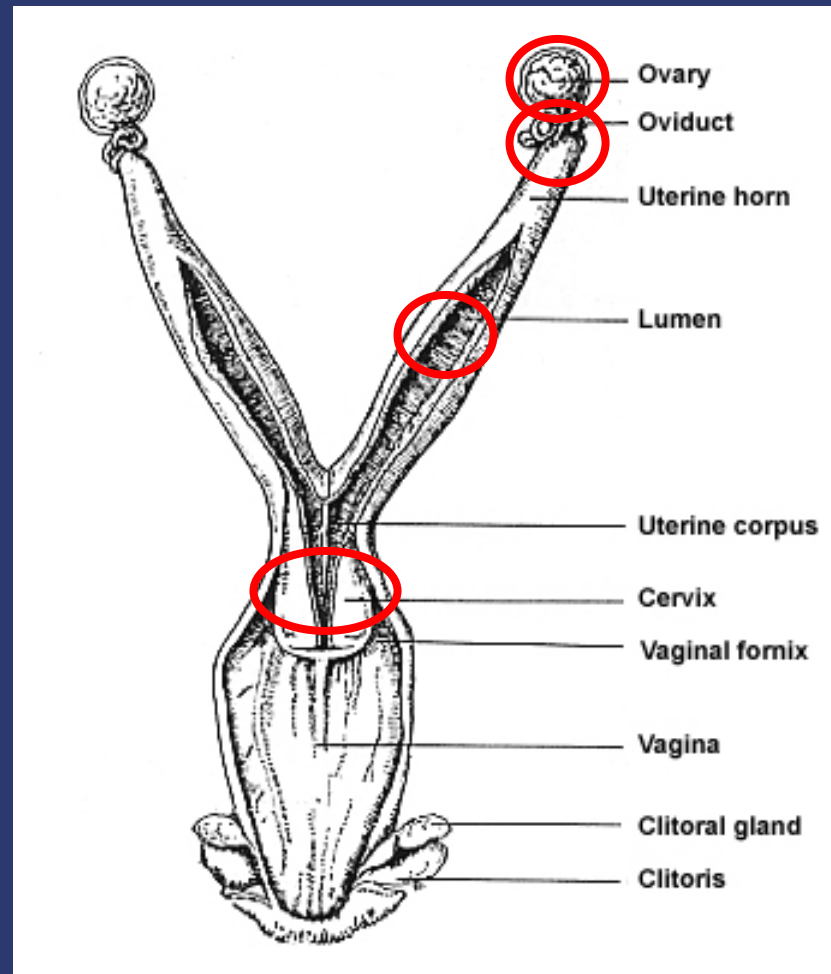
5. Localisation des aHSPG dans tractus génital mâle



5. Conclusion localisation des aHSPG dans tractus génital mâle

- Marquage récurrent des membranes basales sous-épithéliales
- Vaisseaux sanguins fortement marqués
- Lumière des organes étudiés : négative
- Spermatozoïdes : négatifs

5. Localisation des aHSPG dans tractus génital femelle



5. Conclusion localisation des aHSPG tractus génital femelle

- Ovaire : comme observé chez le rat, abondant et fort marquage des cellules de granulosa (grands follicules antraux)
- Les vaisseaux sanguins sont fortement marqués
- Les membranes basales sous-épithéliales sont fortement marquées, tout le long du trajet de l'ovocyte
- Résultats confirmés par expérience de ^{125}I -AT ligand binding assay
-

- Il n'existe aucune voie biosynthétique alternative dans la biosynthèse de ces aHS
- Délétion du gène de la 3-OST-1 : suppression biosynthèse des aHS dans cellules de granulosa, dans les membranes basales sous-épithéliales et dans les vaisseaux sanguins

7. Conclusion et perspectives

- aHSPG dans l'ovaire : fonction importante dans physiologie ovarienne
- Implications dans le contrôle de l'activité des serpinines
- Approche transgénique : phénotype de reproduction sévère
- aHSPG dans autres compartiments extravasculaires : maintien fluidité liquide séminal et implications dans transport et fertilisation des ovocytes
- Etude par souris MINST et SINST surexprimant 3-OST-1
-

- Progrès dans reconnaissance et analyse des structures fines des HSPG

- Important dans la morphogenèse et patterning

- Enorme potentiel de fonctions biologiques

- Relation spécifique : structure fine ↔ fonction biologique