

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES



**Mémoire de fin d'études
en vue de l'obtention du diplôme de docteur veterinaire**

THEME :

**Evaluation de l'activité sexuelle de l'Etalon pendant la période de
reproduction**

Présenté par :

RACHEDI SID AHMED

Encadré par :

Dr SAIM MOHAMED SAID

Année universitaire : 2016 – 2017



Remerciements

A l'issue de ce travail, nous voulons d'abord remercier Allah de nous guider et nous donner la force, le courage et la patience pour tirer le meilleur de ce travail : **MERCI "Dieu"**.

Nous tenons à exprimer notre très sincère reconnaissance à **Mr SAIM MOHAMED SAID** pour la direction de ce travail. Tous ses conseils, ses remarques, sa très grande disponibilité, sa grande générosité et son soutien sans faille ont rendu ce travail possible.

Vous nous avez appris à découvrir des horizons scientifiques insoupçonnés et vous nous avez appris l'humilité.

Nous désirons vous témoigner cher promoteur toute notre gratitude pour la confiance que vous nous avez accordé.

Nous souhaitons que ce travail soit à la hauteur de vos espérances.

Nous remercions toutes les personnes ayant contribué moralement ou matériellement de près ou de loin à sa réalisation

Nos remerciements vont aussi : A tous mes professeurs du Département des sciences vétérinaires de l'université IBN KHALDOUN de Tiaret Algérie.



Dédicace

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du cœur, à ceux qu'on aime et qu'on remercie en exprimant la gratitude et la reconnaissance durant toute notre existence....

Je dédie ce modeste travail:

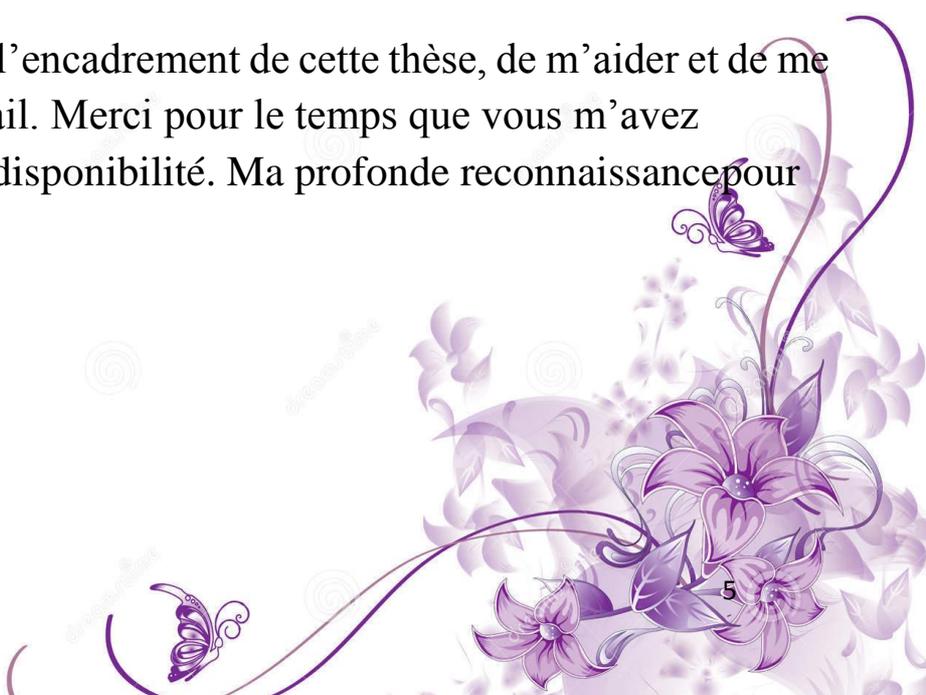
A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblée avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait.

A MON TRÈS CHER PÈRE: autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme. Tes conseils ont toujours guidé moi vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours au m'apporter.

Merci mes chères parents, que Dieu le tout puissant vous préserve pour moi.

A mon directeur de mémoire Dr SAIM MOHAMED SAID

qui m'a fait l'honneur d'accepter l'encadrement de cette thèse, de m'aider et de me conseiller tout au long de ce travail. Merci pour le temps que vous m'avez consacré, votre patience et votre disponibilité. Ma profonde reconnaissance pour ses conseils et aides





A mes très chers frères et sœur Ilias , Abdenour , Sara et Maria :

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de sante et de réussite

A toute ma famille de près ou de loin surtout **Limam Hayat,**

A Tout mes Collègues Surtout **Rahali Abdessamed , Said BekouCh Mohamed , Rebi Fatiha , Khatir Ikram , Chadli Omar , Mansour Youcef , Messoudi Youcef .**

A tous les médecins vétérinaires qui j'ai croisé sur mon parcours, en stage ou en prophylaxie, Qui m'ont transmis leur amour du métier et m'ont guidée dans cette voie. Omar, merci pour ce que tu m'as transmis et pour ta gentillesse.

A tous ceux que je n'ai pas cités mais que je n'oublie pas



TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	16
I – Rappels d’anatomie et de physiologie sexuelle.....	18
1 – Anatomie de l’appareil reproducteur de l’étalon.....	18
1.1 – Disposition de l’appareil génital mâle.....	18
1.2 – Les différentes enveloppes testiculaires.....	18
1.2.1 – Les enveloppes testiculaires superficielles.....	18
1.2.2 – Les enveloppes testiculaires profondes.....	19
1.3 – Les testicules d’étalon.....	19
1.3.1 – Moyens de fixité.....	20
1.3.2 – Conformation intérieure et structure.....	20
1.3.3 – La fonction endocrine du testicule.....	23
1.4 – Les voies spermatiques extra-testiculaires.....	24
1.4.1 – L’épididyme.....	24
1.4.2 – Le conduit déférent.....	25
1.4.3 – L’urètre.....	26
1.5 – Les glandes annexes de l’appareil génital mâle.....	26
1.5.1 – Les vésicules séminales.....	26
1.5.2 – La prostate.....	26
1.5.3 – Les glandes de Cowper.....	27
1.5.4 – Rôle des glandes annexes.....	27
1.6 – La partie libre du pénis.....	28
2 – Physiologie sexuelle de l’étalon.....	29
2.1 – La saison sexuelle de l’étalon.....	29
2.2 – Evaluation de la libido et de l’aptitude au chevauchemen.....	29
2.3 – Mécanisme de l’érection.....	29
II – Le sperme de l’étalon : de la production à la fécondation.....	32
1 – Aspect externe et composition chimique.....	32
1.1 – Aspect externe.....	32
1.1.1 – Volume.....	32
1.1.2 – Couleur et consistance.....	32
1.2 – Composition chimique.....	33
2 – Spermatogénèse et spermiogénèse.....	33
2.1 – Spermatogénèse.....	34
2.2 – Spermiogénès.....	35
2.3 – Facteurs d’altération de la formation desspermatozoïdes.....	37
2.3.1 – Déficits gonadotropes.....	37
2.3.2 – Troubles primitifs de la spermatogénèse.....	37
3 – Structure du spermatozoïde.....	38
3.1 – La tête.....	38
3.2 – La région intermédiaire.....	39
3.3 – Le flagelle.....	39
4 – Devenir des spermatozoïdes.....	40
4.1 – La maturation dans l’épididyme.....	40
4.2 – La remontée des voies génitales femelles.....	41
4.2.1 – La capacitation.....	41

4.2.2 – La sélection des spermatozoïdes : l'origine des pertes.....	41
4.3 – La fécondation.....	42
4.3.1 – La traversée de la couronne radiée.....	42
4.3.2 – L'adhésion à la membrane pellucide : fixation initiale.....	42
4.3.3 – La réaction acrosomique.....	42
4.3.4 – La traversée de l'aire pellucide.....	43
4.3.5 – La pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte	43
III – Les techniques habituelles d'analyse du sperme.....	46
1 – Prélèvement de sperme d'étalon.....	46
1.1 – Le vagin artificiel.....	46
1.1.1 – Choix du vagin artificiel.....	46
1.1.2 – Préparation du vagin artificiel.....	47
1.1.3 – Entretien du vagin artificiel.....	48
1.2 – Caractéristiques du mannequin.....	49
2 – Techniques générales de manipulation de la semence.....	51
3 – Evaluation macroscopique de la semence.....	52
4 – Détermination de la concentration en spermatozoïdes.....	54
4.1 – Utilisation de la cellule hématimétrique.....	54
4.2 – Utilisation du spectrophotomètre.....	56
4.3 – Utilisation du compteur de particules.....	57
4.4 – Détermination du nombre total de spermatozoïdes par éjaculat.....	57
5 – Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes.....	58
5.1 – Méthode classique.....	59
5.1.1 – Dilution.....	59
5.1.2 – Evaluation visuelle.....	60
5.1.3 – Conservation de la semence.....	60
5.2 – Autres méthodes.....	61
5.2.1 – Diversité des autres méthodes.....	61
5.2.2 – Description du système d'analyse d'images automatisées (CASA : computer-assisted spermatozoal analysis).....	61
5.2.3 – Systèmes CASA actuels.....	62
5.2.4 – Résultats des études employant les systèmes CASA.....	63
5.2.5 – Avenir ?.....	63
6 – Etude morphologique des spermatozoïdes.....	64
6.1 – Diversité des méthodes possibles.....	64
6.1.1 – Les différents colorants.....	64
6.1.2 – La microscopie électronique.....	66
6.2 – Evaluation et classification.....	66
6.3 – Interprétation de la qualité de la semence.....	67
IV – Nouvelles techniques d'évaluation des spermatozoïdes.....	70
1 – Evaluation de l'intégrité de la chromatine spermatique.....	70

1.1 – Test de la Structure de la Chromatine Spermatique (SCSA : Sperm Chromatin Structure Assay).....	70
1.1.1 – Réalisation pratique.....	70
1.1.2 – Résultats des différentes études.....	72
1.1.3 – Interprétation.....	74
1.1.4 – Bilan.....	75
1.2 – Autres méthodes utilisées chez l’homme.....	76
2 – Caractérisation de la réaction acrosomique et de la capacitation.....	79
2.1 – Induction à la progestérone.....	79
2.1.1 – Technique.....	79
2.1.2 – Résultats.....	82
2.1.3 – Les récepteurs à progestérone.....	83
2.2 – Induction de la réaction acrosomique à l’ionophore du calcium A23187.....	83
2.2.1 – Technique.....	84
2.2.2 Résultats.....	84
2.3 – Diversité des méthodes.....	85
2.3.1 – Coloration au bleu de Coomassie.....	85
2.3.2 – Fluorescence à la chlorotétracycline.....	85
2.3.3 – Coloration à la mérocyanine 540.....	87
2.3.4 – Détection des asymétries de la membrane spermatique par les fluorochromes Annexin V et Ro-09-0198.....	88
2.3.5 – Cytométrie en flux.....	89
3 – Evaluation de la fonction mitochondriale.....	89
3.1 – La rhodamine 123.....	90
3.2 – Le Mito Tracker®.....	90
3.3 – Le JC-1.....	90
4 – Evaluation de l’intégrité de la membrane plasmique.....	91
4.1 – Test de gonflement hypo-osmotique (HOST).....	92
4.2 – Diversité des colorants fluorescents.....	92
4.3 – La diacétate carboxyfluorescéine (CFDA).....	93
4.4 – Le propidium iodide (PI).....	93
4.5 – Le SYBR-14.....	93
4.6 – Double coloration PI/SYBR-14.....	94
4.7 – Triple coloration PI/SYBR-14/JC-1.....	94
4.8 – Triple coloration PI/FITC-PNA/carboxy-SNARF-1... ..	95
4.9 – Cytométrie en flux.....	95
4.10 – Lecteur de microplates.....	96
4.11 – Conclusion.....	96
V – Marqueurs biochimiques potentiels.....	98
1 – Marqueurs testant l’intégrité de l’acrosome et la réaction acrosomique.....	98
1.1 – Activité de l’acrosine amidase.....	98
1.2 – SNARE protéine.....	99

2 – Marqueurs testant la capacitation.....	100
2.1 – Protéines fixant l’héparine.....	100
2.2 – Protéines d’activité de la phosphotyrosine.....	101
2.3 – Anion superoxyde.....	101
3 – Marqueurs de l’apoptose : les caspases.....	102
4 – Marqueurs testant la chromatine : la chromomycine A3.....	103
5 – Marqueurs testant la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes : la lactate déshydrogénase.....	104
6 – Marqueurs testant l’activation de l’ovocyte : la phospholipase C.....	105
7 – Marqueurs testant les dommages oxydatifs.....	106
7.1 – C11-BODIPY(581/591)	106
7.2 – Malondialdéhyde.....	108
7.3 – Glutathione peroxidase.....	109
7.4 – Réactifs oxygènes.....	110
8 – Marqueurs testant la maturation du spermatozoïde : la créatinine kinase (HspA2).....	111
9 – Marqueurs testant l’interaction spermatozoïde/ovocyte.....	112
9.1 – Protéine CRISP.....	112
9.2 – Hyaluronidase PH-20.....	112
9.3 – Protéine Awn d’adhésion.....	113
9.4 – Protéine P34H.....	114
9.5 – Zonadhésine.....	114
10 – Marqueurs testant la fertilité des spermatozoïdes : la protéine SP22.....	115
Conclusion générale.....	118
CONCLUSION.....	122
BIBLIOGRAPHIE.....	124

FIGURES

<u>Figure 1 :</u>	coupe transversale de la région inguinale d'un étalon.....	17
<u>Figure 2 :</u>	coupe longitudinale d'un testicule et de l'épididyme d'un étalon.....	19
<u>Figure 3 :</u>	schéma d'un épididyme humain.....	22
<u>Figure 4 :</u>	coupe médiane de l'exploration rectale d'un étalon.....	25
<u>Figure 5 :</u>	coupe longitudinale de la partie libre du pénis.....	26
<u>Figure 6 :</u>	aspect du sperme d'étalon après centrifugation.....	31
<u>Figure 7 :</u>	la spermatogenèse (d'après Nicole Vacheret).....	32
<u>Figure 8 :</u>	formation de l'acrosome au cours de la spermiogénèse.....	34
<u>Figure 9 :</u>	structure d'un spermatozoïde (d'après Mariana Riuz).....	38
<u>Figure 10 :</u>	la fécondation.....	42
<u>Figure 11 :</u>	préparation d'un vagin artificiel de type Missouri (mise en place du manchon de protection à usage unique à l'intérieur et remplissage d'eau).....	46
<u>Figure 12 :</u>	manchons plastiques (capotes) pour vagin de type Missouri sans (A) ou avec (B) poche de recueil (d'après IMV-technologies)....	47
<u>Figure 13 :</u>	mannequin de récolte.....	48
<u>Figure 14 :</u>	cuve pour bain-marie contenant le milieu de dilution et les Cornings allant accueillir le sperme, à température corporelle (36.8°C).....	49
<u>Figure 15 :</u>	cellules de Thoma (d'après les laboratoires Fiers).....	52
<u>Figure 16 :</u>	représentation de l'image obtenue lors de l'observation des spermatozoïdes sur une cellule de Thoma.....	53
<u>Figure 17 :</u>	photomètre AccuRead®(d'après IMV technologies).....	54
<u>Figure 18 :</u>	représentation de 5 types de trajets de spermatozoïdes équin.....	56
<u>Figure 19 :</u>	microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante...	58
<u>Figure 20 :</u>	représentation schématique des anomalies chromosomiques possibles.....	65
<u>Figure 21 :</u>	graphe de la distribution des spermatozoïdes selon la couleur de leur fluorescence.....	69
<u>Figure 22 :</u>	représentation schématique des changements majeurs de la chromatine durant la spermatogénèse.....	71
<u>Figure 23 :</u>	schéma de la technique de déplacement de brèche.....	75
<u>Figure 24 :</u>	image d'une comète obtenue grâce au test des comètes (d'après BIOTOX).....	76
<u>Figure 25 :</u>	Images obtenues au microscope Leitz Ultralux des têtes spermatiques.....	80
<u>Figure 26 :</u>	spermatozoïdes observés au microscope x 100 suite à une coloration à la chlorotétracycline.....	85
<u>Figure 27 :</u>	diagramme schématique de la localisation de la phospholipase C_ lors de la fécondation	104

TABLEAUX

<u>Tableau 1 :</u>	les différents types de vagins artificiels.....	45
<u>Tableau 2 :</u>	description des dilueurs de semence couramment employés.....	57
<u>Tableau 3 :</u>	description des préparations de différentes colorations pour l'observation microscopique de la morphologie des spermatozoïdes.....	63
<u>Tableau 4 :</u>	caractéristiques du sperme d'étalon.....	66
<u>Tableau 5 :</u>	classification des 5 catégories de spermatozoïdes présents lors de test à la chlorotétracycline.....	84
<u>Tableau 6 :</u>	méthodes utilisées lors d'analyse du fer, du zinc et des enzymes du plasma séminal.....	102

INTRODUCTION

La reproduction équine est un domaine en pleine évolution avec l'augmentation du nombre d'inséminations artificielles, notamment l'insémination artificielle profonde et le développement du transfert d'embryon. Quelque soit la méthode utilisée, l'objectif principal est d'obtenir une bonne fertilité en fin de saison. Pour se faire il est important de se soucier aussi bien de la jument que de l'étalon lors de l'analyse des résultats de fertilité. De ce fait nous aborderons ici le thème de la fertilité de l'étalon, et plus précisément les méthodes permettant d'évaluer les caractéristiques de la semence.

Une analyse complète et détaillée de la semence permet d'estimer le statut reproducteur de l'étalon. Cette évaluation sera notamment nécessaire lors de l'introduction d'un nouvel étalon au sein d'un centre d'insémination ou de prélèvement. Lorsque le statut reproducteur de l'étalon sera bien connu, seuls les critères de base (volume de l'éjaculat, concentration en spermatozoïdes, morphologie et mobilité des spermatozoïdes) seront le plus souvent évalués. Par contre, en cas de subfertilité, des analyses complémentaires pourront être envisagées.

Cette étude bibliographique se compose de cinq parties. Les deux premières parties abordent des rappels anatomo-physiologiques permettant de comprendre l'origine des éventuels désordres de fertilité. La troisième partie décrit les tests utilisés en routine, c'est-à-dire en clientèle, alors que les deux dernières parties présentent les nouvelles techniques en voie de développement mais réservées pour le moment au domaine de la recherche.

I – Rappels d’anatomie et de physiologie sexuelle

1 – Anatomie de l’appareil reproducteur de l’étalon

1.1 – Disposition de l’appareil génital mâle

L’appareil génital mâle est divisé en trois parties qui possèdent des fonctions différentes [1] :

- une partie glandulaire, à savoir les deux testicules dont le rôle est la formation des spermatozoïdes et l’élaboration des hormones mâles.
- une partie tubulaire, à savoir les voies spermatiques qui acheminent les spermatozoïdes à l’intérieur des testicules puis à l’extérieur par l’épididyme et le conduit déférent jusqu’à l’urètre.
- une partie uro-génitale, commune aux voies urinaire et génitale, composée elle-même de deux parties : l’urètre pelvien, situé dans le bassin, où de nombreuses glandes sécrétrices se terminent et qui joue un rôle dans la maturation des spermatozoïdes ; et l’urètre pénien qui aboutit au méat urinaire et auquel s’ajoutent des formations érectiles annexes volumineuses.

1.2 – Les différentes enveloppes testiculaires

1.2.1 - Les enveloppes testiculaires superficielles

Le testicule comprend deux enveloppes superficielles [1, figure 1] :

- le scrotum qui se situe en région sous-inguinale, sous l’anneau superficiel et qui est constitué de deux parties :
 - la peau qui contient de nombreuses glandes sébacées.
 - le dartos, constitué de fibres élastiques et musculaires lisses et de collagène, qui joue un rôle dans le réchauffement des testicules.
- le fascia spermatique externe

1.2.2 – Les enveloppes testiculaires profondes

Le testicule comprend trois enveloppes profondes [1, figure 1] :

- le muscle crémaster, composé de fibres striées à motricité volontaire, qui sort de l'interstice inguinal et entoure en partie le cordon testiculaire. Sa contraction provoque la remontée des testicules et de ses enveloppes contre l'anneau inguinal superficiel.
- le fascia spermatique interne
- la tunique vaginale

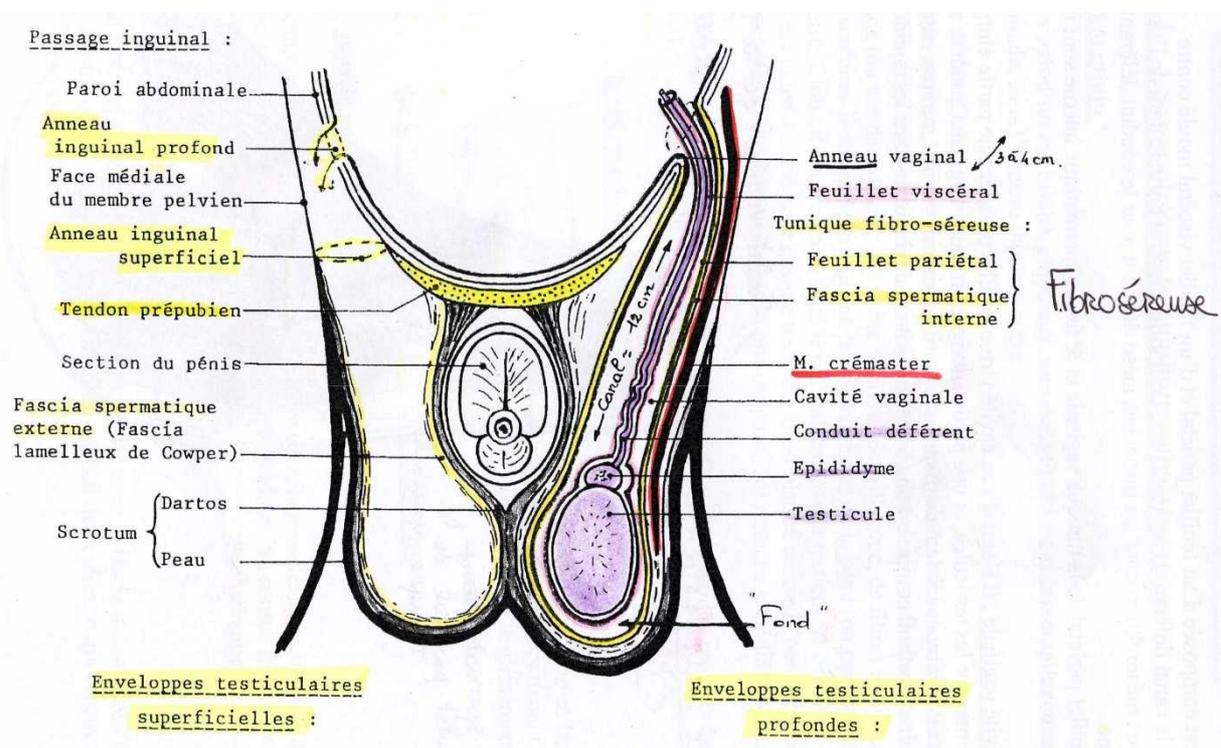


Figure 1 : coupe transversale de la région inguinale d'un étalon [1]

1.3 – Les testicules d'étalon

Les testicules sont peu volumineux par rapport à la taille de l'animal (environ 200g, 10x6x5 cm). Ils sont doués d'une double fonction : la fonction germinale (la spermatogenèse) au niveau des tubes séminifères grâce aux cellules de Sertoli et la fonction endocrine, c'est-à-dire la synthèse d'hormones sexuelles par les cellules de Leydig [2].

1.3.1 – Moyens de fixité

Les moyens de fixité sont [1] :

- les enveloppes
- le cordon spermatique, formé par le canal déférent, l'artère spermatique, l'artère déférentielle, les veines spermatiques et les nerfs du testicule
- les ligaments : le ligament de la tête de l'épididyme, le ligament propre, le ligament de la queue de l'épididyme et le ligament scrotal
- la tunique vaginale

1.3.2 – Conformation intérieure et structure

On retrouve un parenchyme, de couleur jaune-ocre chez le cheval, entouré par une charpente fibreuse solide, l'albuginée, dans laquelle se trouvent les vaisseaux testiculaires. A la périphérie, recouvrant l'albuginée, se trouve un revêtement séreux [1, figure 2].

L'albuginée envoie des expansions à l'intérieur du testicule : elles forment des cloisons qui délimitent des lobules testiculaires (200 à 300). Ces cloisons interlobulaires se rejoignent au centre du testicule, formant le mediastinum testis [1, figure 2].

Chaque lobule est donc composé de plusieurs tubes séminifères entre lesquels se trouve un tissu conjonctif lâche très vascularisé. C'est au sein de ce tissu interstitiel que l'on trouve les cellules de Leydig (cellules endocrines sous forme d'îlots) [1, 2].

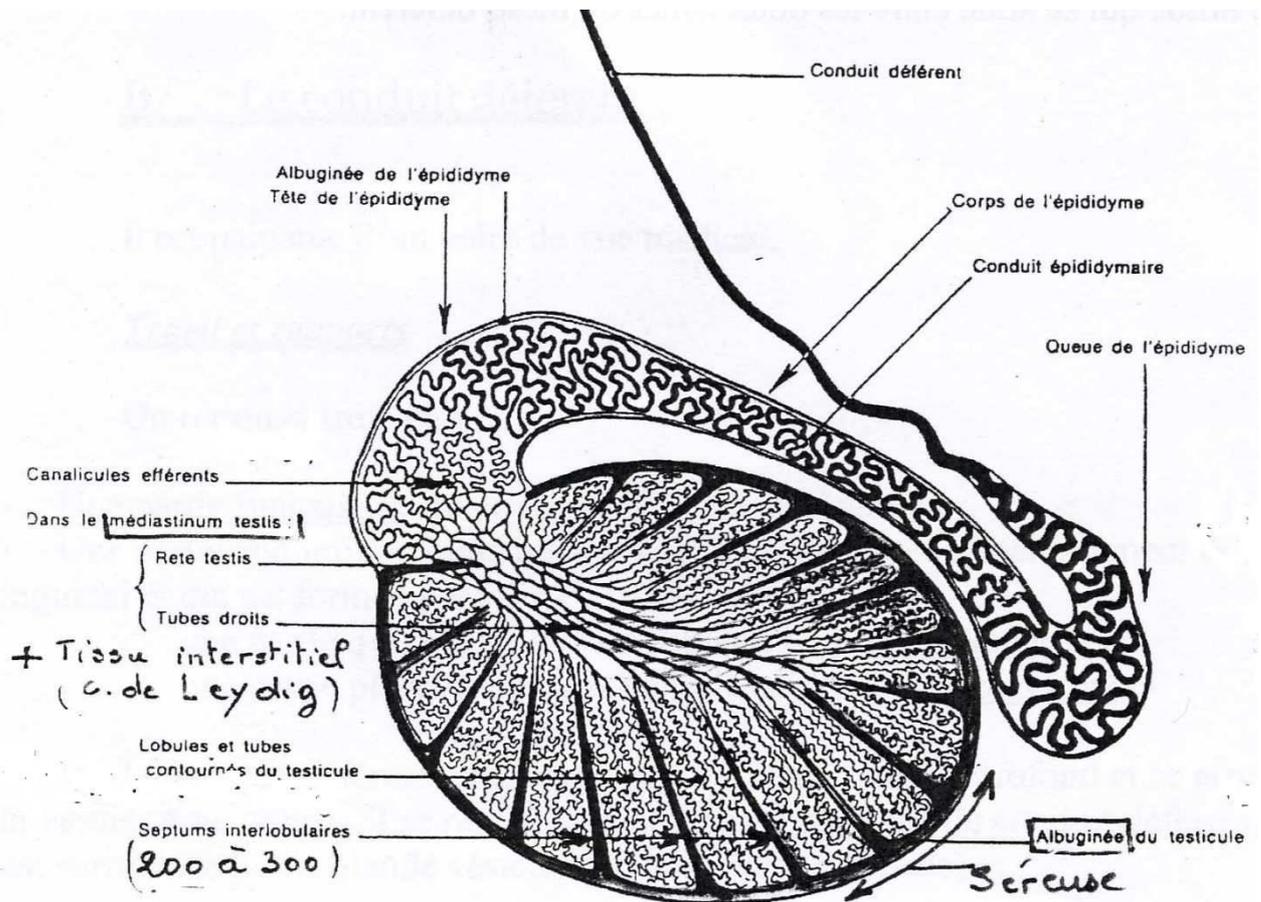


Figure 2 : coupe longitudinale d'un testicule et de l'épididyme d'un étalon [1]

- Les tubes séminifères :

Les tubes séminifères mesurent 2 à 3 mètres de long. Chaque tube est d'abord composé d'une partie contournée, puis se termine par une partie rectiligne (tube droit). L'ensemble des tubes droits s'anastomosent et viennent s'aboucher dans le rete testis, qui est ensuite drainé par des canaux en communication avec la tête de l'épididyme. Si on considère un tube séminifère, on observe une lumière avec des cellules qui ont desquamé et un épithélium de revêtement pluristratifié qui comprend des cellules de Sertoli et des cellules de la lignée germinale à différents stades de maturation. Le liquide contenu dans les tubes séminifères assure le transport des spermatozoïdes relargués dans la lumière [1, 2].

- Les cellules de Leydig :

L'espace entre les tubes séminifères et les cloisons de tissu conjonctif dense est comblé par du tissu conjonctif lâche qui contient les cellules de Leydig. Elles synthétisent la testostérone qui passe dans la circulation générale grâce au grand nombre de vaisseaux sanguins situés entre les cellules de Sertoli [1, 2].

- Les cellules de Sertoli :

La cellule de Sertoli est une grande cellule pyramidale qui s'étend sur toute la hauteur de l'épithélium séminifère. Le corps cellulaire repose sur la lame basale de la gaine périvitubulaire. Ses faces latérales sont en contact étroit avec les cellules de Sertoli adjacentes et les cellules germinales aux divers stades de la spermatogénèse. Chaque cellule est connectée aux cellules adjacentes par des jonctions serrées disposées au pôle basal limitant deux compartiments : un compartiment basal, périphérique, qui contient les spermatogonies et les spermatocytes I et un compartiment central ou adjacent à la lumière qui contient les spermatocytes II et les spermatides. D'autres types de jonctions relient les cellules de Sertoli entre elles et avec les cellules germinales [1, 2].

Elles sécrètent les éléments de nutrition et synthétisent l'ensemble du liquide où baignent les spermatozoïdes. L'évolution des spermatogonies en spermatozoïdes a donc lieu entre les cellules de Sertoli, qui possèdent divers rôles [2] :

- la sécrétion du fluide testiculaire : un liquide albumineux ambré dans lequel baignent les spermatozoïdes, composé de solutés, d'eau, et d'éléments nutritifs.
- la sécrétion de liquide interstitiel.
- la synthèse et la libération de protéines spécifiques : inhibine, activine, protéines de transport des androgènes.
- le contrôle de la maturation et de la migration des cellules germinales en assurant la phagocytose des cellules dégénérantes.
- la participation à la formation de la barrière hémotesticulaire.

- Les voies spermatiques intra-testiculaires :

Les voies de conduction spermatique testiculaires sont formées par les tubes droits prolongés par le rete testis d'où émergent une vingtaine de canaux efférents. Ces conduits quittent le testicule en traversant l'albuginée et convergent ensuite pour former la tête de l'épididyme [1].

- Les tubes droits : courts et rectilignes, ils prolongent les tubes séminifères et sont bordés par un tissu épithélial simple formé de cellules cubiques qui sont équivalentes aux cellules de Sertoli des tubes séminifères. Au niveau des tubes droits, on ne trouve par contre plus de cellules de la lignée germinale, à l'exception d'amas de spermatozoïdes en cours de migration.

- Le rete testis est bordé d'un épithélium simple et cubique
- Les canaux efférents : ils cheminent dans le tissu conjonctif. Après la traversée de l'albuginée, ils prennent le nom de cônes efférents qui, par fusion, forment le canal épидидymaire unique. Ils ont un rôle de conduction et de progression des spermatozoïdes.

Le liquide du rete testis véhicule des spermatozoïdes immobiles. Il ne serait qu'une sécrétion tubulaire remaniée, probablement du fait d'échanges avec les veines testiculaires superficielles [2].

1.3.3 – La fonction endocrine du testicule

Les cellules de Leydig synthétisent des androgènes dont les différents rôles sont les suivants [2] :

- effets sur les caractères sexuels : primaires (développement des canaux de Wolff et régression des canaux de Müller lors de la période embryonnaire), secondaires (à partir de la puberté) et tertiaires (comportement sexuel).
- stimulation de l'anabolisme protéique ce qui se traduit par un développement de la masse musculaire.
- régulation de la spermatogenèse : une partie des hormones mâles passe dans la circulation, une autre pénètre dans les tubes séminifères. La testostérone est alors convertie en dihydrotestostérone, la forme active, dans les cellules de Sertoli. Une partie se fixe sur des récepteurs spécifiques des cellules de Sertoli. Cette fixation active ces dernières qui vont alors synthétiser et sécréter l'ensemble des molécules nécessaires à la nutrition et à la maturation des cellules germinales. Il y a donc activation de la spermatogenèse par la dihydrotestostérone.

1.4 – Les voies spermatiques extra-testiculaires

1.4.1 – L'épididyme

La différenciation des gamètes mâles s'effectue dans le testicule. Cependant à leur sortie les spermatozoïdes ne sont pas matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds. La différenciation se poursuit en dehors de la gonade, dans le tube épидидymaire et constitue la maturation des spermatozoïdes. Dans cet organe, les spermatozoïdes continuent à se transformer en subissant plusieurs modifications notamment biochimiques, qui les rendront aptes à reconnaître et à féconder un ovocyte [2].

L'épididyme est un long canal de 80 mètres composé de trois parties : la tête, le corps, et la queue [figure 3]. Il relie les canaux efférents (à la sortie du testicule) au canal déférent au niveau de la jonction épидидymo-déférentielle. Le conduit déférent est palpable dans le cordon spermatique [1].

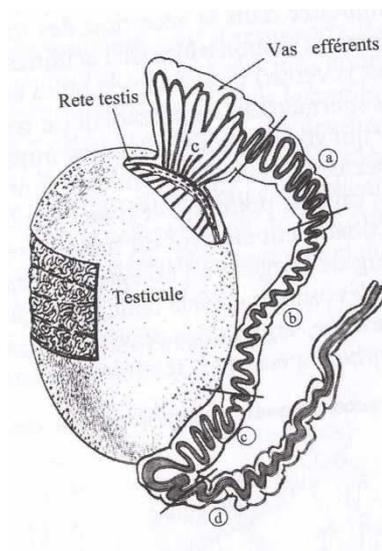


Figure 3 : schéma d'un épидидyme humain [2] : a = tête ; b = corps ; c+d = queue

L'épididyme est composé d'une albuginée et de nombreux canaux commençant par une quinzaine de canalicules issus du rete testis qui forment la tête puis qui convergent en un conduit très sinueux, le conduit épидидymaire, qui devient ensuite plus épais et moins sinueux au niveau de la queue, formant par la suite le conduit déférent [1].

L'épididyme possède plusieurs fonctions [2]:

- la progression des gamètes par contraction des cellules musculaires.
- la réabsorption de liquides (eau, ions et protéines), essentiellement dans les premières régions épидидymaires, ce qui entraîne une augmentation de la concentration en spermatozoïdes.
- la concentration de substances provenant du sang dans la lumière du tube (carnitine, inositol). La carnitine est captée par les spermatozoïdes et transformée en acétylcarnitine qui sera utilisée comme substrat énergétique pour la mobilité. L'inositol provient du testicule, de la synthèse épидидymaire et du sang. Son rôle est incertain.
- la sécrétion dans la lumière de petites molécules organiques et d'enzymes (glycérylphosphorylcholine, phosphatases, protéases, glycosidases) permettant de maintenir les gamètes en vie, de stabiliser leur membrane plasmique et de leur conférer leur mobilité et leur fertilité. La composition protéique du fluide épидидymaire est en constante évolution tout au long de l'organe, les protéines épидидymaires pouvant être très différentes de celles du sang et du testicule.

Ainsi, à la sortie de l'épididyme, les spermatozoïdes sont fertiles et mobiles.

1.4.2 – Le conduit déférent

Le conduit déférent a un rôle de conduction des spermatozoïdes, qui migrent grâce à leur flagelle et aux contractions des fibres musculaires de la paroi. Ils sont ensuite stockés dans des ampoules du conduit déférent, juste avant l'urètre. Ce stockage ne doit pas être trop long car les spermatozoïdes perdent leur pouvoir fécondant en 72h. S'il n'y a pas d'éjaculation, ils dégènèrent et sont résorbés ou passent dans l'urine. S'il y a éjaculation, le canal déférent libère le sperme final, à savoir les spermatozoïdes, le fluide testiculaire et les sécrétions des glandes annexes [2].

Le conduit déférent est constitué de trois parties : une partie funiculaire (située dans le cordon spermatique), une partie abdomino-pelvienne (après l'interstice inguinal) et l'ampoule (au-dessus de la vessie) [1, figure 4].

1.4.3 – L'urètre

L'urètre pelvien débute au-delà du col de la vessie et se termine au dessus du col ischiatique. Il est composé d'une partie prostatique et d'une partie membranacée contenant un muscle sphincter. La prostate déverse son produit de sécrétion dans l'urètre pelvien via de nombreux petits conduits prostatiques. Les glandes de Cowper sont portées par l'urètre pelvien et présentent de nombreux abouchements [1, figure 4].

L'urètre pénien débute en regard de l'arcade ischiatique par un renflement et s'attache aux autres éléments érectiles. Il se situe au sein du corps spongieux [1].

1.5 – Les glandes annexes de l'appareil génital mâle

1.5.1 – Les vésicules séminales

Ce sont des glandes tubulo-alvéolaires. Les vésicules séminales (ou glandes vésiculaires) et le conduit déférent se terminent par un conduit commun : le conduit éjaculateur qui débouche ensuite dans l'urètre. Les cellules épithéliales des vésicules séminales sécrètent des protéines (enzymes, inhibiteurs d'enzymes, protéines structurales) et un mucus gélatineux, épais et blanc, composé entre autre de fructose et de prostaglandines. Les prostaglandines jouent un rôle dans les contractions des voies génitales femelles, et favorisent donc la migration des spermatozoïdes dans ces voies femelles [1, 2, figure 4].

1.5.2 – La prostate

C'est une glande unique bilobée qui se situe sur le col de la vessie de part et d'autre de l'urètre. Dans chaque lobule, des glandes tubulo-alvéolaires de type séreux forment les éléments sécrétants. Leurs sécrétions sont déversées dans la lumière puis sont acheminées par des canaux dans l'urètre [1, figure 4].

Le liquide prostatique est riche en acides aminés et en enzymes (phosphatases alcalines et acides). Il permet de neutraliser l'acidité liée au métabolisme des spermatozoïdes. Cette acidité est due à la production de lactate de CO_2 et déclenche la mobilité des spermatozoïdes. L'activité de la prostate est sous la dépendance d'androgènes [2].

1.5.3 – Les glandes de Cowper

Elles déversent leur contenu au niveau de l'urètre membraneux. Le liquide qu'elles sécrètent est un liquide albumineux transparent. L'érection comprime les glandes de Cowper, favorisant ainsi l'élimination de leur contenu lors de l'éjaculation [1].

1.5.4 – Rôle des glandes annexes

Le rôle majeur du plasma séminal est l'apport de substrats énergétiques aux spermatozoïdes et la dilution des gamètes afin d'activer leur mobilité progressive et d'assurer leur transfert dans le tractus génital femelle. Cependant l'importance de ces glandes dans le pouvoir fécondant des gamètes est discutable puisqu'il n'y a pas de différence entre les taux de fécondation obtenus avec des spermatozoïdes prélevés dans la queue de l'épididyme ou avec des spermatozoïdes éjaculés [2].

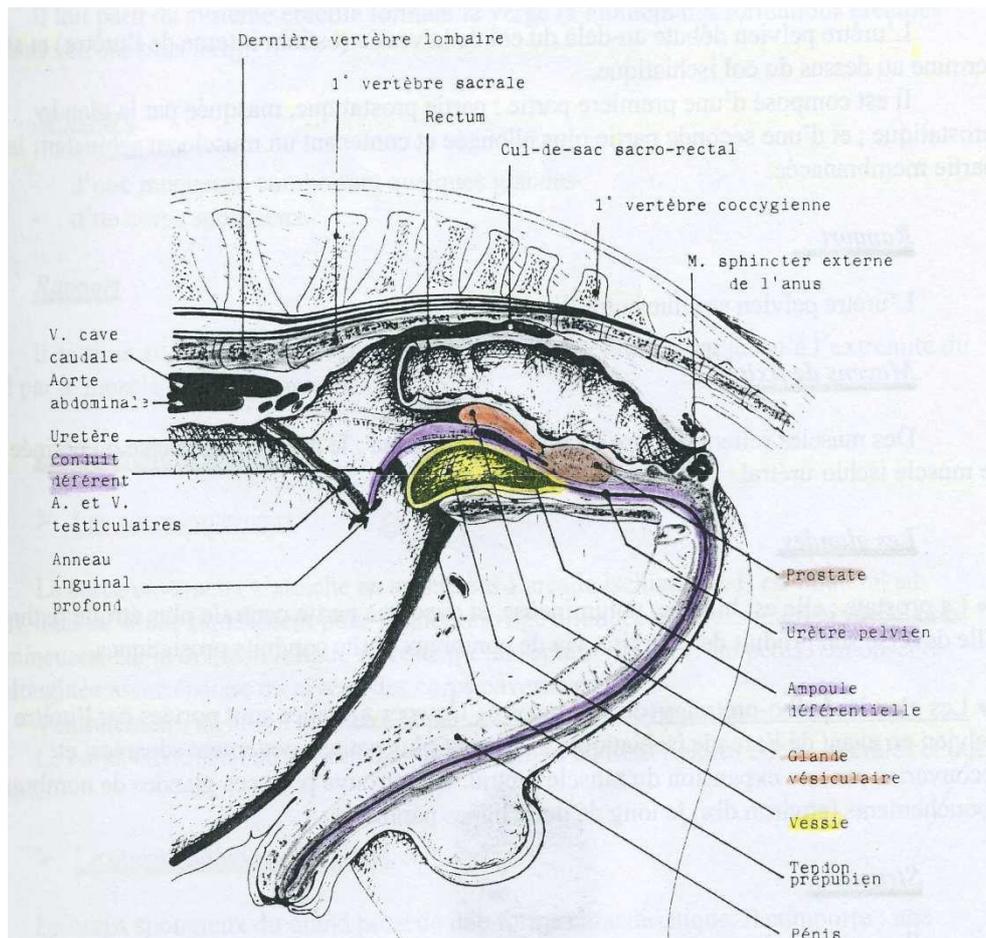


Figure 4 : coupe médiane de l'exploration rectale d'un étalon [1]

1.6 – La partie libre du pénis

La zone du périnée s'étend de l'anus aux enveloppes testiculaires. Le prépuce y fait suite et se termine par un ostium préputial. Le prépuce est un repli de peau en continuité avec la peau de l'abdomen qui entoure la partie libre du pénis. A l'intérieur on trouve une peau élastique, munie de nombreuses glandes prépucales. Les tissus érectiles sont constitués de tissu conjonctif parcouru par un système de capillaires qui s'élargissent en lacunes et cavernes qu'un afflux de sang peut dilater, permettant ainsi l'érection. Ils sont situés dans le corps spongieux et dans le corps caverneux [1, 2, figure 5].

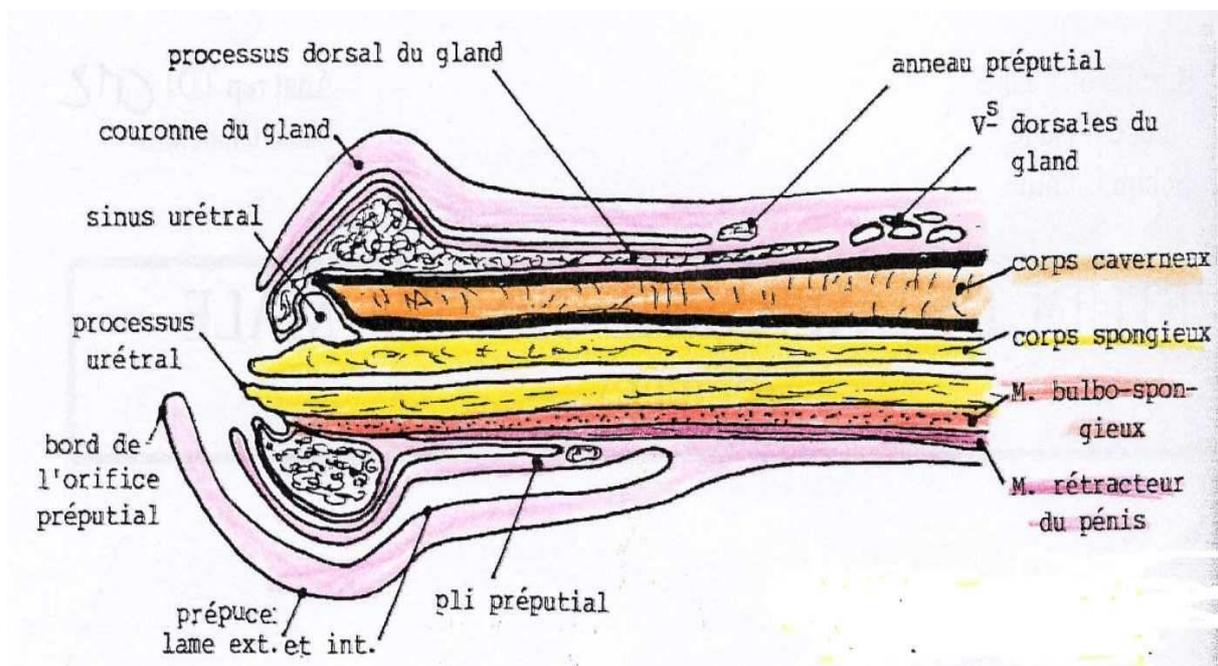


Figure 5 : coupe longitudinale de la partie libre du pénis [1]

2 – Physiologie sexuelle de l'étalon

2.1 – La saison sexuelle de l'étalon

L'étalon peut se reproduire physiologiquement toute l'année mais de part la saisonnalité de la jument, il exprime son comportement sexuel en même temps que cette dernière. Il est par contre possible de prélever des étalons toute l'année soit pour effectuer une analyse de la semence lors de problème de fertilité, soit pour congeler des paillettes de sperme [3].

2.2 – Evaluation de la libido et de l'aptitude au chevauchement

Une semence de très bonne qualité n'est intéressante que dans la mesure où elle est accompagnée d'une bonne libido et d'une aptitude à chevaucher la jument. Le comportement sexuel de l'étalon est jugé en le mettant en présence d'une jument en œstrus : un étalon avec une bonne libido manifeste immédiatement une attirance intense pour la jument, caractérisée par de l'agitation, du piaffer, des vocalisations, une activité précopulatrice intense avec flairage, léchage, mordillements de la jument, la manifestation du réflexe du flehmen (retroussement de la lèvre supérieure en réaction initiale au flairage de la région génitale ou de l'urine de la jument) et l'entrée en érection. Une cause très fréquente de baisse de la libido est une mauvaise gestion de la conduite des saillies telle qu'une surexploitation de l'étalon [4].

L'aptitude d'un étalon à avoir un comportement sexuel normal (érection, chevauchement, intromission, mouvements copulatoires et éjaculation) doit être déterminée lors de l'évaluation du statut reproducteur d'un étalon [4].

2.3 – Le mécanisme de l'érection

L'érection est contrôlée par le système nerveux autonome. Le mécanisme de l'érection est ensuite purement vasculaire. Les cavités du tissu érectile se remplissent de sang et la longueur du pénis passe alors de 60 à 90 cm. On observe également une augmentation du diamètre de la partie renflée du gland (10 cm de diamètre). Le système orthosympathique, via le nerf hypogastrique, permet le remplissage des lacunes par le sang en agissant sur la

vasomotricité du corps caverneux et a un rôle excito-sécrétoire sur les glandes annexes. Le système parasympathique provoque l'érection du corps spongieux de l'urètre et du corps érectile du gland via le nerf érecteur (rameau du nerf honteux). Le nerf honteux assure l'innervation sensitive du périnée, du scrotum et du pénis [4, 5].

II – Le sperme de l'étalon : de la production à la fécondation

Le sperme est composé des spermatozoïdes, du fluide testiculaire et des sécrétions des glandes annexes. Il est éliminé par le méat urinaire lors de l'éjaculation, à raison d'une moyenne de 100 (20 à 300) cm³ de sperme par éjaculat en moyenne [6].

1 – Aspect externe et composition

1.1 – Aspect externe

1.1.1 – Volume

L'éjaculat de l'étalon est composé de deux fractions majeures : une fraction liquide (contenant la majorité des spermatozoïdes) et une fraction gélatineuse. Si le tube collecteur dispose d'un filtre, le volume de la fraction liquide peut être lu directement sur ce tube collecteur. Par contre, le volume de la fraction gélatineuse doit être établi à partir de la portion retenue par le filtre. Certains étalons ont des éjaculats complètement dépourvus de gel [3, 4, 5].

1.1.2 – Couleur et consistance

La couleur normale de l'éjaculat équin est grisâtre à blanchâtre selon la concentration en spermatozoïdes. Cette couleur peut devenir rose, rougeâtre ou rouge vif lorsque le sperme contient du sang (hémospermie). Une couleur jaunâtre peut signaler la présence d'urine (urospermie) ou de pus (pyospermie). L'éjaculat est homogène et de consistance aqueuse sauf lorsqu'il contient une partie de la fraction gélatineuse. Il peut paraître trouble [3, 4, 5, figure 6].

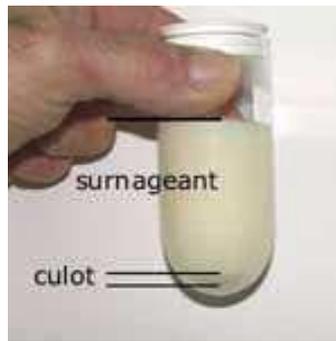


Figure 6 : aspect du sperme d'étalon après centrifugation

1.2 – Composition chimique

La composition chimique du sperme est la suivante :

- eau (80%)
- matière organique (6%)
- ions (calcium, phosphate...)
- lipides
- glucides (fructose)
- albumines et globulines
- bases aminées

2 – Spermatogénèse et spermiogénèse

La formation du spermatozoïde se fait en deux étapes : la spermatogénèse et la spermiogénèse, qui débutent au niveau des tubes séminifères puis se déroulent dans l'épididyme, pour finir dans les voies génitales femelles. La durée de la formation du spermatozoïde est de 49 jours chez l'étalon. La connaissance de cette durée est importante pour la préparation de l'animal en vue d'une saison de monte. De même un incident influençant la production des spermatozoïdes peut avoir des répercussions sur l'aptitude reproductrice 49 jours plus tard [5].

2.1 – Spermatogénèse

La spermatogénèse commence dans les testicules, en tout premier lieu dans les tubes séminifères. Elle se met en route après la puberté sous l'action de la LH (Luteinising Hormone) sur les cellules de Leydig et de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) sur les cellules de Sertoli [2, 5].

La lignée germinale mâle est constituée de deux types de spermatogonies : les spermatogonies de type A (cellules souches) et les spermatogonies de type B (cellules qui s'engagent dans la spermatogénèse) issues de ces dernières. Les spermatogonies de type B se divisent pour entrer en prophase méiotique et devenir des spermatocytes I. Ces dernières passent ensuite de la région périphérique du tube séminifère à la région centrale par dissociation transitoire des jonctions serrées entre les cellules de Sertoli. Une première division de méiose permet le passage de spermatocytes I en spermatocytes II. Ensuite, une seconde division de méiose conduit à la formation des spermatides [2, figure 7].

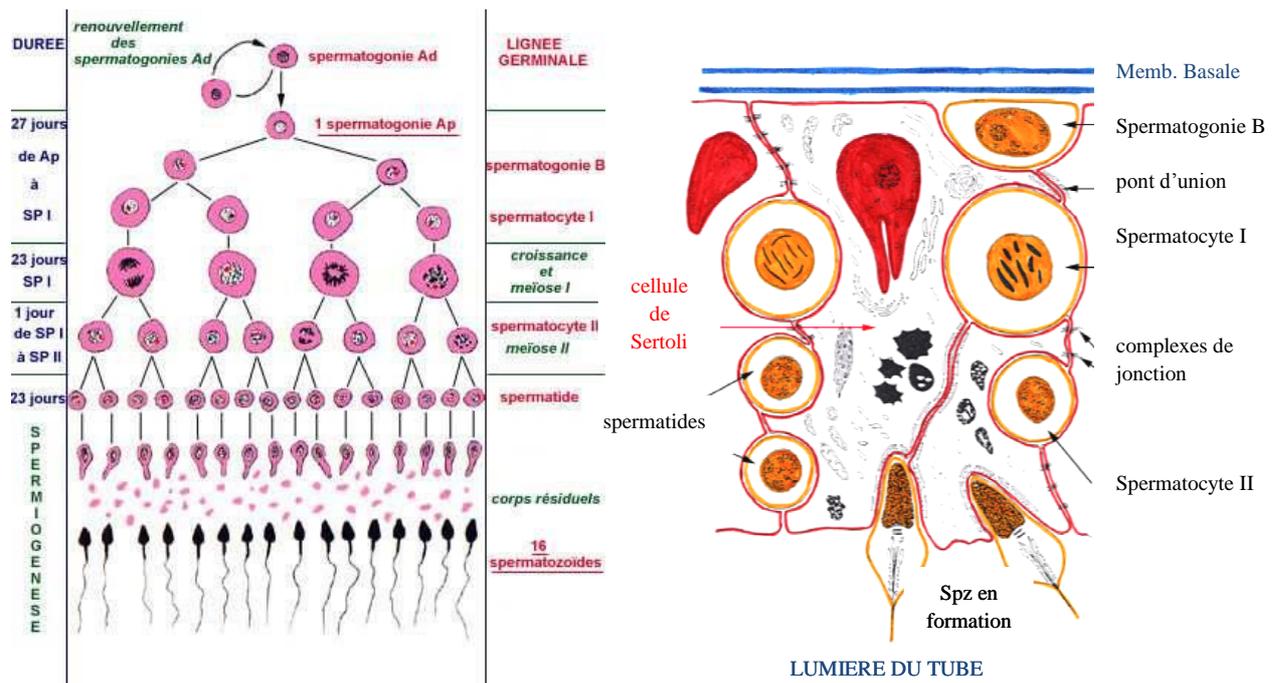


Figure 7 : la spermatogénèse (d'après Nicole Vacheret)

La transition entre spermatogonie et spermatocyte I est marquée par une légère phase d'accroissement qui correspond à des synthèses d'ARN. La plupart de ces ARNm sont transcrits en prophase méiotique et traduits au stade spermatide ou spermatozoïde. Il s'agit

d'ARNm codant des protéines intervenant en particulier dans la mobilité du spermatozoïde ou dans la reconnaissance de l'ovule par le spermatozoïde [2, 5].

Durant les étapes correspondantes au spermatocyte II et à la spermatide, il y a encore des synthèses d'ARNm qui sont traduits encore un peu plus tardivement lors de la transformation en spermatozoïde : il s'agit d'ARNm de tubuline, de protamines... [2]

Chez l'étalon, la spermatogénèse permet de produire 16×10^6 spermatozoïdes par jour par gramme de testicule [5].

2.2 La spermiogénèse

La spermiogénèse permet le passage de la spermatide (cellule arrondie ayant une organisation cytoplasmique banale) au spermatozoïde (petite cellule très effilée, mobile, pauvre en cytoplasme et en réserves). Elle est caractérisée par [2, 5, figure 8] :

- une condensation nucléaire : les histones riches en lysine sont éliminées et remplacées par des protamines, protéines basiques de faible poids moléculaire riches en arginine et cystéine. Le nucléole disparaît, les ARNm nucléaires sont éliminés et le noyau se déshydrate : l'ensemble du noyau devient une masse compacte d'hétérochromatine.
- la formation de l'acrosome : il se forme progressivement par confluence de vésicules golgiennes ; il y a d'abord mise en place d'une vésicule arrondie, la vésicule proacrosomiale, qui se positionne à l'opposé de l'appareil cinétique et donne la vésicule acrosomiale puis l'acrosome. Il continue à grossir par apport de vésicules golgiennes ; puis il s'étale sur la partie supérieure du noyau et finit par coiffer complètement le noyau.

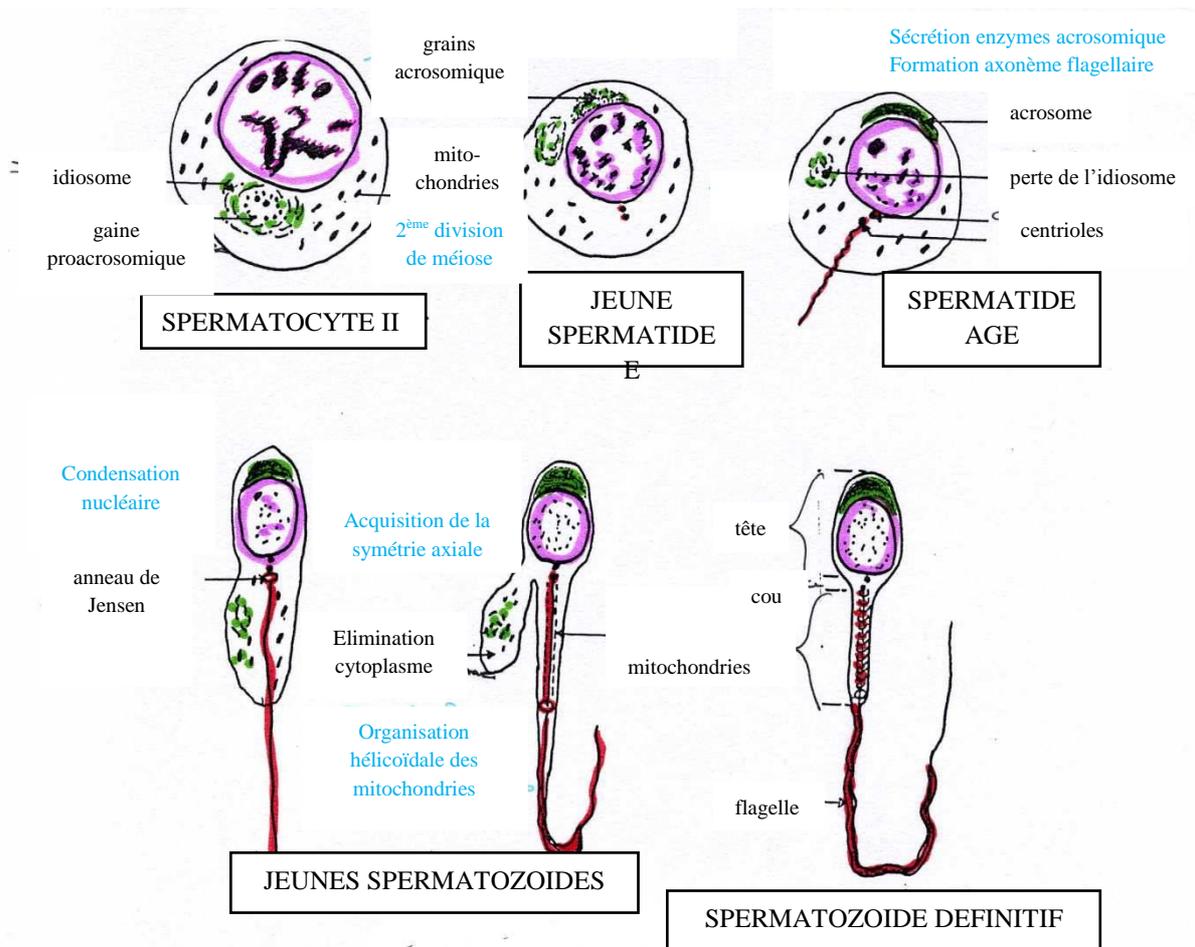


Figure 8 : formation de l'acrosome au cours de la spermiogénèse

- la différenciation de l'appareil cinétique : le complexe centriolaire, voisin de la vésicule proacrosomiale, migre à l'opposé du noyau. Le centriole proximal se positionne dans une invagination de la membrane nucléaire tandis que le centriole distal induit la polymérisation d'un axonème. Les mitochondries s'organisent en un manchon à la base de l'axonème.
- l'élimination du cytoplasme excédentaire : l'essentiel du cytoplasme est d'abord éliminé et phagocyté par les cellules de Sertoli, et seule une goutte de cytoplasme persiste à la base du flagelle qui sera éliminée lors du passage dans l'épididyme.

Les spermatozoïdes, au sortir du testicule, n'ont pas encore la capacité de féconder un ovule. Ils vont séjourner dans l'épididyme et subir encore une série de transformations. Lorsqu'ils quittent les testicules, ils sont dilués dans le liquide séminal sécrété par les voies génitales et les glandes annexes, puis stockés temporairement dans les vésicules séminales.

2.3 – Facteurs d'altération de la formation des spermatozoïdes

2.3.1 – Déficits gonadotropes

Ils correspondent à l'absence de stimulation hormonale du testicule par absence de sécrétion des gonadotrophines. Le plus souvent le déficit porte à la fois sur la sécrétion de LH et de FSH avec déficit de stimulation des deux fonctions testiculaires [2].

2.3.2 – Troubles primitifs de la spermatogénèse

Ils représentent une situation beaucoup plus fréquente, mais pour lesquels les mécanismes physiopathologiques sont moins clairement compris. Le phénomène pathologique initial semblerait siéger au niveau du testicule lui-même [2].

L'examen histologique d'une biopsie du parenchyme testiculaire permet de reconnaître divers types d'altérations morphologiques des tubes séminifères (lieu de production des spermatozoïdes) [2]:

- l'hypospermatogénèse : le nombre des tubes séminifères et des cellules germinales est diminué.

- le blocage de la spermatogénèse au stade de spermatocyte I, de spermatocyte II ou de spermatide.

- l'aplasie germinale : absence totale de cellules de la lignée germinale (cellules souches des spermatozoïdes).

- la scléro-hyalinose : l'architecture histologique du testicule est remaniée avec des tubes séminifères atrophiques d'épaisseur réduite et des aspects de hyalinose et de fibrose.

Diverses anomalies se trouvent associées à des troubles de la spermatogénèse [2]:

- anomalies chromosomiques (délétion du bras long du chromosome Y)

- varicocèle (dilatation des veines du cordon spermatique)

- cryptorchidie : il est probable qu'une altération constitutionnelle du testicule induise un trouble de la descente testiculaire pendant la vie intra-utérine et se manifeste aussi plus tard dans la vie par un trouble de la spermatogénèse.
- pathologie infectieuse génitale ou générale (orchite ourlienne)
- altération ischémique ou traumatique du testicule
- effets de substances toxiques et d'agents physiques (radiations, chimiothérapies, maladies fébriles)
- hyperthermie
- sous-nutrition

3 – Structure du spermatozoïde

Le spermatozoïde assure trois fonctions successives : le transport du contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle, la pénétration du génome mâle dans le gamète femelle et la fusion des deux noyaux gamétiques (ou caryogamie) aboutissant au zygote [6].

3.1 – La tête

Le cytoplasme est très peu présent et l'essentiel de l'espace est occupé par le noyau et l'acrosome. Le noyau présente exclusivement de l'hétérochromatine, qui est particulièrement condensée grâce à des protéines particulières : les protamines. Il s'agit de protéines riches en arginine et cystéine capables d'établir entre elles des ponts disulfures. Sous cette forme la chromatine est également protégée contre les altérations possibles lors du stockage ou lors du transfert dans les voies génitales femelles. L'acrosome est une poche limitée par une membrane. A l'avant, la membrane est accolée contre la membrane plasmique et à l'arrière, la membrane épouse la forme du noyau. Son contenu est riche en enzymes protéolytiques [6, figure 9].

3.2 – La région intermédiaire

Le cou comporte deux centrioles : le centriole proximal, bien individualisé et situé derrière le noyau et le centriole distal, incorporé à la base de l'axonème. La pièce intermédiaire comporte l'axonème dans sa partie centrale entourée d'un faisceau de fibres et d'un manchon de mitochondries. Ces dernières sont le reflet d'un métabolisme aérobie et assurent une production importante d'ATP (Adénosine Tri Phosphate) utilisée dans le fonctionnement de l'axonème. Chez les mammifères l'approvisionnement énergétique, en l'absence de toute réserve intracellulaire, est assuré par le liquide séminal (sous forme de fructose) [6, figure 9].

3.3 – Le flagelle

Le flagelle est la formation locomotrice qui permet d'amener le contenu chromosomique mâle jusqu'au gamète femelle. La pièce principale est constituée de neuf faisceaux de fibres denses ainsi que d'une gaine protéique fibreuse périphérique. La pièce terminale n'est constituée que de l'axonème enfermé dans la membrane plasmique [6, figure 9].

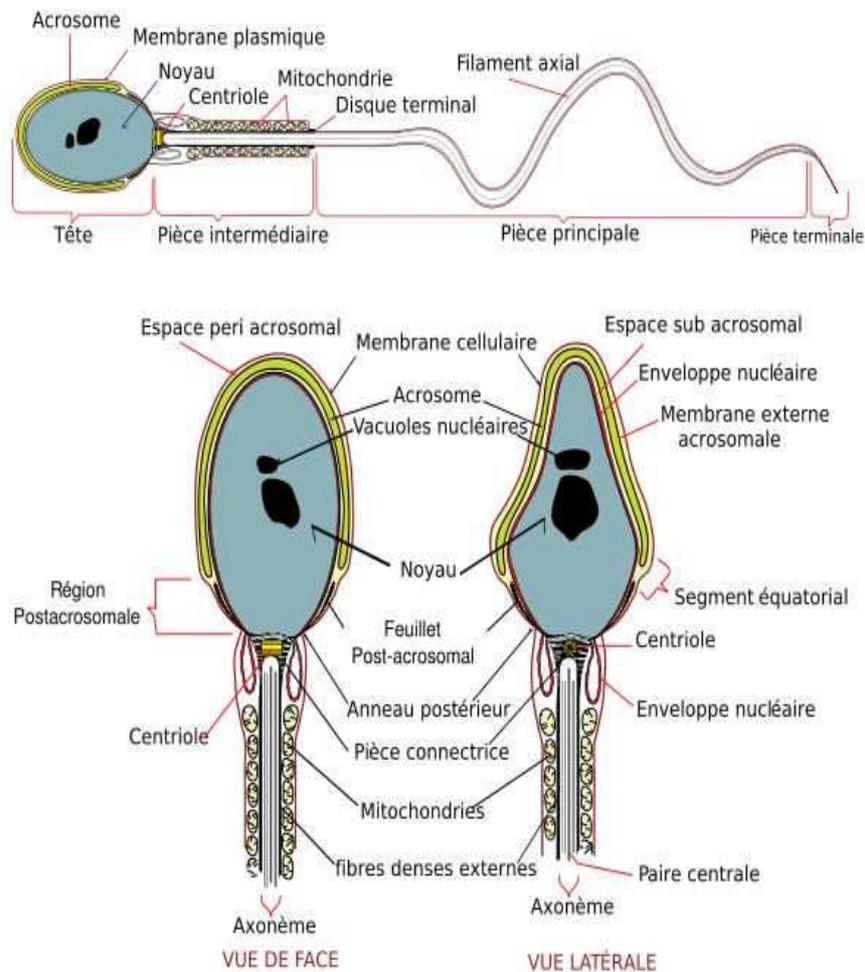


Figure 9 : structure d'un spermatozoïde (d'après Mariana Riuz)

4 – Devenir des spermatozoïdes

4.1 – La maturation dans l'épididyme

Au niveau de l'épididyme, plusieurs modifications se produisent [2, 5]:

- la condensation de la chromatine se poursuit par augmentation des ponts disulfures
- l'hélice mitochondriale achève sa mise en place ; parallèlement, le spermatozoïde acquiert la capacité de se déplacer suivant une trajectoire rectiligne

- la membrane plasmique est remaniée dans sa composition lipidique et protéique ; les protéines qui interviennent dans la reconnaissance du gamète femelle lors de la fécondation se mettent en place
- l'acrosome prend sa forme définitive, et des sécrétions de l'épididyme neutralisent les enzymes de l'acrosome évitant toute agression des voies génitales mâle ou femelle en cas de lyse de spermatozoïdes.

4.2 – La remontée des voies génitales femelles

Les spermatozoïdes remontent les voies génitales femelles grâce à leur mobilité propre et grâce aux contractions du tractus génital. Une source d'énergie extracellulaire, constituée de glycine, est nécessaire [2, 5].

4.2.1 - La capacitation

Les spermatozoïdes subissent la capacitation dans les voies génitales femelles : ils achèvent leur maturation et acquièrent leur pouvoir fécondant. Des enzymes protéolytiques produites par les voies génitales femelles libèrent les sites de reconnaissance de l'ovocyte, jusque là masqués lors du passage dans l'épididyme. Des remaniements membranaires interviennent, en particulier la diminution du ratio cholestérol/phospholipide qui rend la membrane plasmique très instable et rend possible l'exocytose de l'acrosome [2, 5].

4.2.2 - La sélection des spermatozoïdes : l'origine des pertes

Seules quelques centaines de spermatozoïdes arrivent dans la partie antérieure de l'oviducte. Les pertes ont plusieurs causes : le milieu vaginal acide défavorable aux spermatozoïdes et la glaire cervicale sécrétée par le col de l'utérus qui n'est favorable aux spermatozoïdes qu'au moment de l'ovulation [2, 5].

4.3 – La fécondation

4.3.1 – La traversée de la couronne radiée

Les cellules en expansion autour de l'oocyte entrent en contact avec les spermatozoïdes et les amènent au contact de l'aire pellucide. La traversée de la couronne radiée ne peut se faire que lorsque les spermatozoïdes sont capotés. La présence de hyaluronidases membranaires sur le spermatozoïde facilite l'insertion de ce dernier entre ces cellules qui sont « soudées » entre elles par un ciment riche en acide hyaluronique. De plus, la pénétration des spermatozoïdes à travers cette barrière cellulaire folliculaire est facilitée par la dissociation partielle du ciment intercellulaire sous l'action de l'enzyme sécrétée par la paroi antérieure de l'oviducte [2, 5, figure 10].

4.3.2 – L'adhésion à la membrane pellucide : fixation initiale

Le contact se fait initialement par la région apicale du spermatozoïde, puis le spermatozoïde augmente progressivement la surface de contact en se couchant sur la zone pellucide. La reconnaissance des gamètes se réalise par l'intermédiaire des glycoprotéines de la zone pellucide (ZP) et de protéines de surface du spermatozoïde (protéines CRISP ou cysteine-rich secretory proteins, P34H, zonadhésines, spermadhésines) [2, 5, figure 10].

4.3.3 – La réaction acrosomique

La réaction acrosomique se produit suite à la fixation du spermatozoïde sur la membrane pellucide. Il y a fusion progressive de la membrane plasmique et de la membrane acrosomique externe du spermatozoïde. Ceci donne lieu à la formation de « fenestration » au travers desquelles le contenu de l'acrosome est libéré.

Le contrôle de la réaction acrosomique est dépendant de la capacitation, par redistribution des protéines, modification de la composition lipidique (augmentation du taux de phosphatidylcholine, diminution du taux de lysophosphatidylcholine, chute du rapport cholestérol/phospholipides) et intervention du calcium.

L'exocytose de l'acrosome conduit à la mise à nu de la membrane acrosomique interne qui entre alors en contact avec l'aire pellucide. De nouvelles interactions moléculaires

ont alors lieu entre la membrane acrosomique interne et l'aire pellucide : c'est la fixation secondaire [2, 5, figure 10].

4.3.4 – La traversée de l'aire pellucide

Le spermatozoïde qui a effectué la réaction acrosomique traverse l'aire pellucide plus ou moins obliquement. A la suite de la capacitation, le spermatozoïde acquiert une mobilité renforcée qualifiée d'hypermobilité : la forte poussée du flagelle et le mouvement cisailant de la tête permettent une pénétration mécanique du spermatozoïde au sein de la zone pellucide. Cependant cette mobilité n'est pas suffisante en elle-même pour assurer la traversée, et nécessite la libération des enzymes (hyaluronidase et acrosine) par l'acrosome pour « déstabiliser » la membrane pellucide et faciliter ainsi le passage du spermatozoïde [2, 5, figure 10].

4.3.5 – La pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte

Le spermatozoïde entre en contact avec les microvillosités de l'ovocyte qui s'allongent, et emprisonnent le spermatozoïde et le maintiennent pendant la fusion. Le cytoplasme de l'ovocyte englobe le noyau du spermatozoïde et la région antérieure dans sa globalité. Le flagelle est en règle générale incorporé mais dégénère rapidement [2, 5, figure 10].

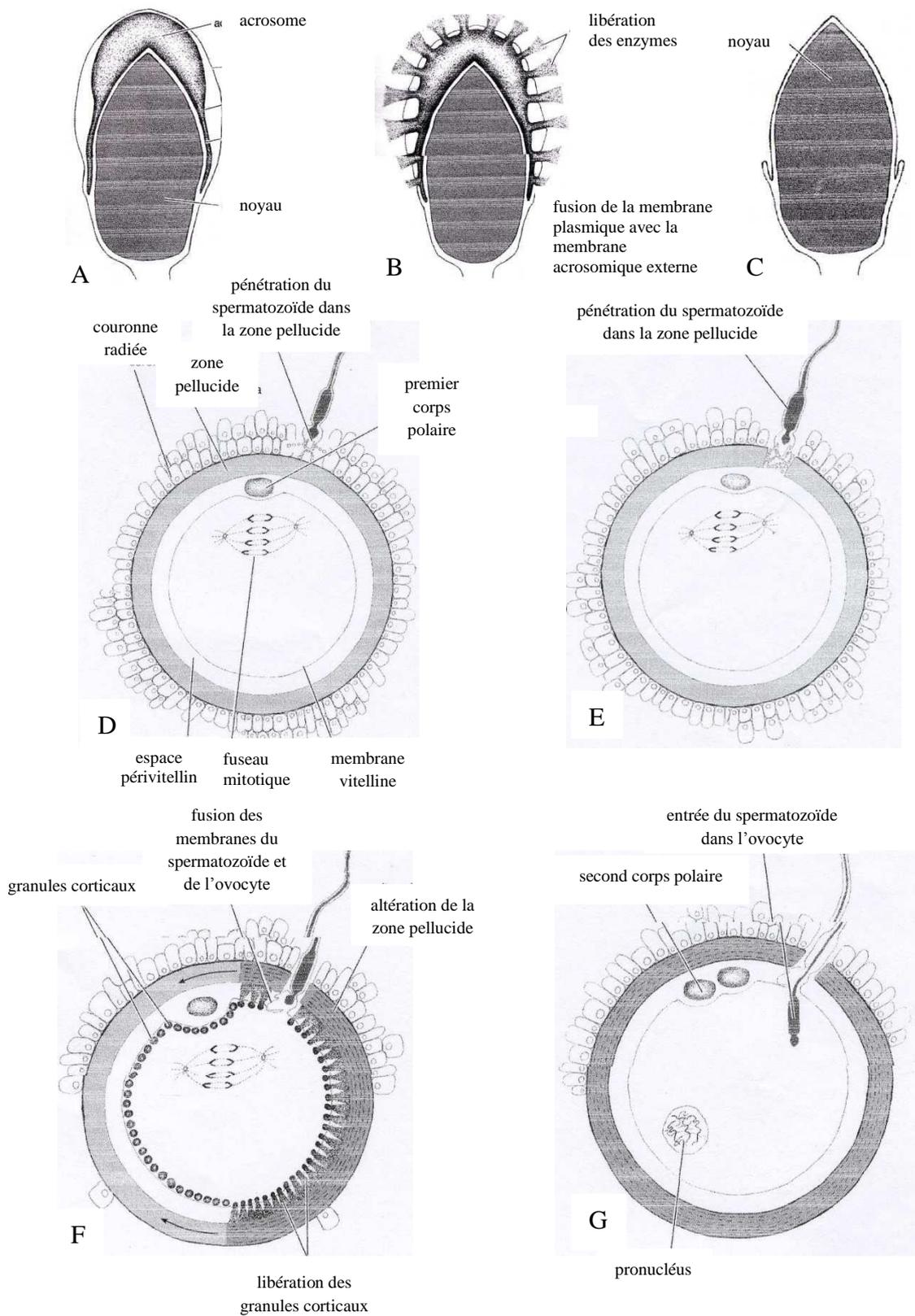


Figure 10 : la fécondation :
 A+B+C = modifications structurales de la tête spermatique lors de la réaction acrosomique
 D+E+F+G = différentes étapes de la fécondation

III – Les techniques habituelles d’analyse de sperme

1 – Prélèvement de sperme d’étalon

Le prélèvement de sperme est une phase essentielle lors de l’analyse de la semence. Il devra être fait dans les meilleures conditions de sécurité et d’efficacité avec comme objectif principal de ne pas détériorer la qualité de la semence [4].

1.1 – Le vagin artificiel

Un vagin artificiel permet de récolter la semence de l’étalon dans des conditions optimales de temps et de sécurité. Le principe d’un vagin artificiel est d’obtenir une « chambre » simulant les conditions de température, de pression et de lubrification du vagin de la jument.

1.1.1 – Choix du vagin artificiel

Le choix du vagin artificiel et sa préparation conditionnent l’efficacité et la qualité de la semence récoltée. De nombreux modèles de vagins artificiels sont disponibles, et présentent des particularités qui sont à privilégier selon les besoins spécifiques de l’étalon, le mode de traitement de semence, et la préférence du manipulateur. Les paramètres à prendre en compte lors de l’achat d’un vagin artificiel sont le prix d’achat, le coût d’entretien et d’utilisation, la longévité, le poids, la capacité à garder la température adéquate pendant une durée plus ou moins longue et la quantité de sperme « perdu » à chaque récolte du fait de la configuration [4, tableau 1].

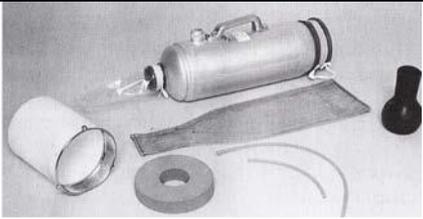
 <p>(d'après IMV technologies)</p>		 <p>(d'après IMV technologies)</p>
Vagin de type Missouri	Vagin de type Japonais	Vagin de type Colorado ou INRA
Constitué d'un étui de cuir et d'un manchon formé d'une double paroi délimitant la chambre à eau et raccordé à un cône en caoutchouc sur lequel peut être fixé un flacon récupérateur.	Constitué d'un étui en aluminium, d'un manchon en caoutchouc, d'un sachet de récupération du sperme, d'un pot isolant entourant ce dernier et d'un coussinet de rembourrage.	Constitué d'un étui de plastique rigide, de deux manchons en caoutchouc formant la chambre à eau, d'un flacon de récupération et d'une enveloppe protectrice.

Tableau 1 : les différents types de vagins artificiels [4]

1.1.2 – Préparation du vagin artificiel

Immédiatement avant le prélèvement de sperme, il convient de remplir la chambre à eau du vagin artificiel avec de l'eau à 45-50°C [figure 11]. La pression à l'intérieur du vagin artificiel rempli d'eau doit être ajustée pour fournir un contact uniforme et étroit tout autour du pénis, sans gêner la pénétration ou la dilatation de la verge à l'intérieur de l'instrument. La totalité du pénis est introduite dans le vagin artificiel au moment de la première poussée copulatrice pour permettre au gland de se dilater à l'extrémité du vagin artificiel et éviter ainsi une éjaculation dans l'instrument qui entrainerait un contact prolongé de l'éjaculat avec les parois chaudes du manchon. La température et la pression du vagin artificiel doivent être maintenues relativement constantes pendant le prélèvement pour obtenir un résultat optimal en termes de stimulation de l'éjaculation et de récupération de spermatozoïdes. Les trois paramètres essentiels de la récolte de sperme sont donc le modèle de vagin, la température et le volume d'eau [3, 4].



Figure 11 : préparation d'un vagin artificiel de type Missouri (mise en place du manchon de protection à usage unique à l'intérieur et remplissage d'eau)

Avant le prélèvement, la surface interne du vagin artificiel est lubrifiée avec un lubrifiant stérile et non spermicide. Le récipient de récupération du sperme est placé à température corporelle pendant la durée du prélèvement et de l'acheminement de l'échantillon jusqu'au laboratoire, ceci afin d'éviter d'éventuels chocs thermiques. Il est également préférable de protéger la semence de la lumière [4].

Afin d'augmenter le nombre de spermatozoïdes récupérés et réellement utilisables à chaque prélèvement, un filtre à sperme est placé à l'entrée du récipient de récupération de l'éjaculat. Il permet de séparer la partie liquide de l'éjaculat, qui renferme les spermatozoïdes, de la partie épaisse et gélatineuse, le gel, qui correspond à la dernière fraction de l'éjaculat. Les filtres en nylon sont plus intéressants que les filtres en polyester car ils piègent moins les spermatozoïdes. Le filtre contenant le gel doit être retiré immédiatement du flacon pour éviter tout écoulement dans la partie spermatique [3, 4].

1.1.3 – Entretien du vagin artificiel

Toutes les parties du vagin entrant en contact avec la semence ne doivent pas être spermicides. Tout ce qui n'est pas à usage unique doit être parfaitement nettoyé, débarrassé de tout résidu de produit chimique, puis séché, et si possible stérilisé entre chaque utilisation. Les savons et les désinfectants ne doivent pas être employés sur les manchons de caoutchouc des vagins artificiels car les traces résiduelles ont un fort risque d'être spermicides. Immédiatement après utilisation, les manchons de caoutchouc doivent être lavés à l'eau chaude, placés dans des bains d'alcool pendant 30 minutes à 24 heures afin de les désinfecter, puis laissés à l'air pour sécher dans une enceinte ou un meuble à l'abri de la poussière. Tous les manchons en latex peuvent être stérilisés dans des vapeurs d'oxyde d'éthylène pourvu

qu'ils soient ensuite laissés à l'air au minimum 48 à 72 heures. Il est préférable d'utiliser du matériel à usage unique stérile et non toxique pour éviter toute contamination chimique des éjaculats ou la transmission de maladies infectieuses d'un étalon à l'autre. Il existe notamment des manchons plastiques très souples et très fins, munis ou non d'une poche de recueil pour le sperme, à usage unique et dont les dimensions sont adaptées à chaque type de vagin artificiel [figure 12].

Cela permet d'effectuer des prélèvements de sperme dans des conditions d'hygiène et de propreté maximale sans risque de toxicité chimique pour les spermatozoïdes. Malheureusement, certains étalons refusent le prélèvement avec ces manchons et préfèrent le contact avec les parois de caoutchouc [3, 4].

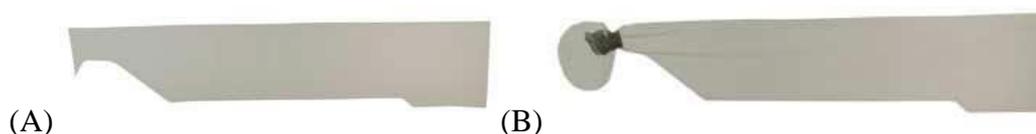


Figure 12: manchons plastiques (capotes) pour vagin de type Missouri sans (A) ou avec (B) poche de recueil (d'après IMV-technologies)

1.2 – Caractéristiques du mannequin

Un mannequin [figure 13] permet d'inciter l'étalon à reproduire les gestes de l'accouplement. L'étalon va monter sur le mannequin comme il le ferait sur une jument puis le pénis est introduit dans le vagin artificiel afin de récolter le sperme au moment de l'éjaculation. Les différents éléments souhaitables au niveau d'un mannequin sont [4] :

- une hauteur réglable, avec une hauteur moyenne légèrement plus faible que la taille moyenne de la race des étalons prélevés
- une largeur et/ou un volume suffisants pour permettre à l'étalon d'agripper fermement le mannequin entre ses antérieurs (la largeur totale incluant le rembourrage conseillée est de 56 à 61 cm)
- un rembourrage adéquat avec une surface externe résistante, non abrasive et facilement nettoyable

- un pied central pour éviter des lésions des pieds ou des membres postérieurs de l'étalon au moment du prélèvement du sperme
- une installation dans un local avec une large surface dégagée de tout obstacle et avec à proximité un travail ou un endroit pour placer la jument souffleuse
- un sol non glissant et homogène



Figure 13 : mannequin de récolte

La plupart des étalons acceptent sans difficulté de chevaucher un mannequin. Les étalons novices peuvent éventuellement nécessiter un conditionnement initial en plaçant une jument en œstrus le long du mannequin. L'étalon est alors autorisé à renifler la jument par-dessus le mannequin afin de stimuler sa libido et son comportement de chevauchement. L'étalon est ensuite détourné pour le faire monter sur le mannequin. Lorsqu'ils sont correctement conçus et installés, les mannequins améliorent considérablement l'efficacité et la sécurité des prélèvements [3, 4].

2 – Techniques générales de manipulation de la semence

Immédiatement après le prélèvement, la semence est rapidement transportée au laboratoire pour réduire les risques d'altération liée à l'action de la lumière ou à un choc thermique (température ambiante trop froide ou trop chaude). Tout le matériel entrant en contact avec la semence, ainsi que les milieux de dilutions, doivent être préalablement chauffés à température corporelle [figure 14]. Lorsqu'il n'y a pas de filtre de semence placé lors du prélèvement au niveau de l'entrée du récipient de recueil une filtration de l'échantillon au travers d'un filtre non toxique doit être immédiatement réalisée, afin d'éliminer le gel et les débris. La partie gélatineuse du sperme peut également être éliminée par aspiration avec une seringue mais la perte en spermatozoïdes est alors en général plus importante [4].



Figure 14 : cuve pour bain-marie contenant le milieu de dilution et les récipients allant accueillir le sperme, à température corporelle (36.8°C)

La concentration en spermatozoïdes, le volume, la couleur de la fraction sans gel de l'éjaculat et le pourcentage de spermatozoïdes mobiles progressifs sont ensuite déterminés. L'ensemble des caractéristiques de l'éjaculat est enregistré sur des fiches d'évaluation de l'éjaculat qui sont archivées ou stockées sous forme de fichiers informatiques. Le sperme est dilué dans un milieu adapté quelques minutes après la récolte afin de maintenir au maximum la viabilité des spermatozoïdes. Si la semence n'est pas stockée plus de une ou deux heures (à

la température du laboratoire et à l'abri de la lumière), une dilution de un volume de sperme pour un ou deux volumes de dilueur est en général correcte. Il est également possible de placer le dilueur chauffé à 37°C directement dans le flacon de récolte fixé au vagin artificiel pour assurer une protection et des éléments nutritifs aux spermatozoïdes dès l'éjaculation. Cette méthode est rarement nécessaire, excepté pour quelques étalons dont le plasma séminal semble réduire la mobilité et la durée de survie des spermatozoïdes [3, 4].

Pour mesurer de manière fiable la concentration de l'échantillon, le dilueur utilisé doit être transparent si la mesure est faite à l'aide d'un spectrophotomètre ou d'un densimètre. Sinon la mesure est soit effectuée manuellement à l'aide d'une cellule hématimétrique, soit déterminée à partir d'une goutte de sperme frais non dilué [3, 4].

Les dilueurs de semence augmentent la durée de survie des spermatozoïdes et sont le plus souvent à base de lactose ou de lait. L'ajout d'antibiotiques favorise l'élimination des bactéries qui contaminent de manière systématique les échantillons de sperme au moment du prélèvement. Les antibiotiques les plus couramment employés sont le sulfate de polymixine B (concentration de 200 à 1000 UI/mL), la pénicilline cristalline (100 à 1500 UI/mL), le sulfate de gentamicine (100 à 1000 µg/mL), le sulfate d'amikacine (100 à 1000 µg/mL) et la ticarcilline (100 à 1000 µg/mL). Lorsque la gentamicine ou l'amikacine sont utilisées, il faut ajouter dans le dilueur du bicarbonate sodique afin d'ajuster le pH du milieu. Un pH variant entre 6,6 et 7,2 est optimal pour conserver la mobilité des spermatozoïdes tout en évitant une capacitation prématurée. L'association pénicilline G potassium (1000 UI/mL) et sulfate d'amikacine (1000 µg/mL) dans un dilueur à base de lait conserve la mobilité des spermatozoïdes dans des conditions optimales tout en offrant une activité antibactérienne à large spectre [4].

3 – Evaluation macroscopique de la semence

L'évaluation de la semence doit être réalisée de manière méthodique et minutieuse par une personne expérimentée et dans un laboratoire correctement équipé.

Le volume de la fraction sans gel, la couleur et l'aspect macroscopique sont notés [figure 6]. La mesure du volume est utile pour calculer le nombre total de spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat et se fait généralement à l'aide d'une éprouvette graduée de 100 ml.

Le volume de l'éjaculat varie en fonction de la saison (plus faible en hiver qu'en été) et en fonction du temps de préparation de l'égalon (une stimulation sexuelle prolongée augmente le volume sans modifier le nombre de spermatozoïdes). L'évaluation macroscopique de l'aspect et de la couleur de l'éjaculat permet de détecter la présence éventuelle de sang, d'urine ou de pus dans l'éjaculat [3, 4].

Le pH de la fraction sans gel du sperme peut être mesuré rapidement à l'aide d'un papier pH, mais il est préférable d'utiliser un pH-mètre précis. Le pH doit être mesuré dès que possible après la récolte pour éviter le biais dû aux produits issus du métabolisme des spermatozoïdes. Le pH normal du sperme d'égalon varie entre 7,2 et 7,7. Il subit des variations physiologiques selon la saison, la fréquence des éjaculations et la concentration. Un pH supérieur à 7,7 indique souvent une infection ou une inflammation de l'appareil génital interne, une contamination par de l'urine ou un autre produit alcalin tel que le savon ou une éjaculation incomplète. Le pH peut également être affecté par la méthode de récolte et par le type de lubrifiant éventuellement utilisé. Les changements de pH et d'osmolarité provoqués par l'urospermie ont un effet négatif sur la mobilité des spermatozoïdes [3, 4].

4 – Détermination de la concentration en spermatozoïdes

La mesure de la concentration en spermatozoïdes de l'échantillon permet de calculer le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat. Elle se réalise selon trois techniques principales : la cellule hématimétrique, le spectrophotomètre et le compteur électronique de particules [3, 4].

4.1 – Utilisation de la cellule hématimétrique

Il s'agit de la méthode la moins chère pour déterminer la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat et consiste en un comptage direct des spermatozoïdes observés individuellement. L'utilisation de la cellule hématimétrique (cellule de Thoma [figure 15] ou cellule de Malassez) est assez fiable lorsque la dilution (en général au 1/100^{ème}) est faite de façon précise à l'aide d'une pipette de dilution pour le comptage des leucocytes et des plaquettes (l'Unopette system®).

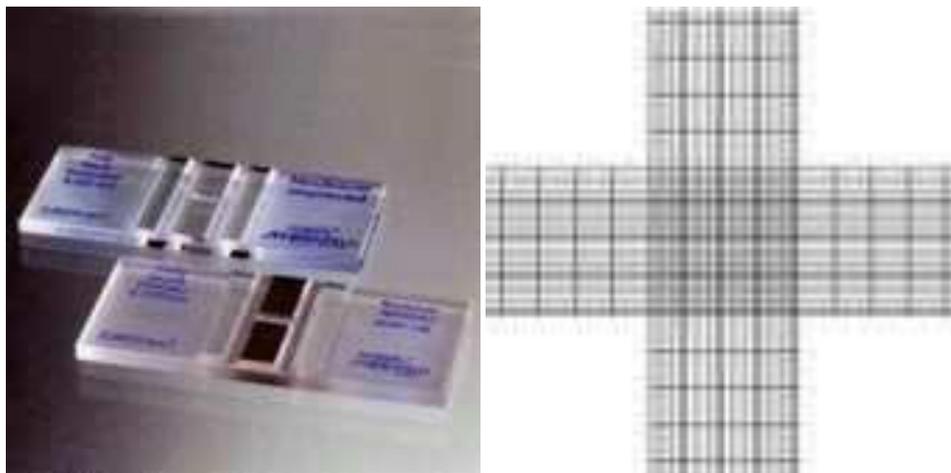


Figure 15 : cellules de Thoma (d'après les laboratoires Fiers) : les spermatozoïdes présents dans les grands carrés sont comptés.

Les étapes de la préparation sont les suivantes [3, 4] :

- Après avoir bien agité l'échantillon, le sperme est aspiré par capillarité jusqu'à la graduation 1.

- La pipette est ensuite remplie jusqu'à la graduation 100 avec une solution formolée.

- La semence ainsi diluée est mélangée en retournant la pipette puis placée au niveau des deux chambres des cellules de Thoma (après avoir éliminé les cinq premières gouttes). La lame est laissée à sédimenter pendant 5 à 10 minutes avant de commencer le comptage.

- La concentration est calculée à partir du nombre de spermatozoïdes comptés dans les carrés de la cellule [figure 16] ; seuls les spermatozoïdes dont la tête se trouve à l'intérieur des carrés sont comptés. Il est parfois nécessaire de varier le taux de dilution pour faciliter le comptage, en l'augmentant à $1/200^{\text{ème}}$ pour les éjaculats très concentrés ou en le diminuant à $1/50^{\text{ème}}$ pour les éjaculats très dilués. Il est préférable de faire un comptage dans un carré de chaque côté de la chambre de la cellule hématimétrique et de calculer la moyenne des deux, puis de multiplier ce nombre par un million pour connaître le nombre de spermatozoïdes par millilitre. Si ces deux comptages sont très différents, il est conseillé de reprendre toute la procédure depuis la dilution dans la pipette et de refaire le comptage. De nombreux laboratoires réalisent leurs comptages sur un nombre bien plus important de carrés, afin d'avoir une mesure plus juste.

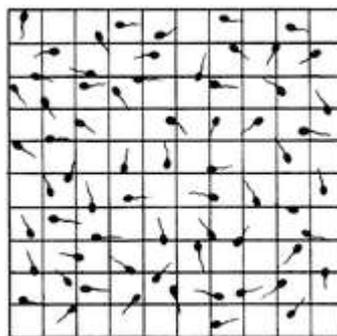


Figure 16 : représentation de l'image obtenue lors de l'observation des spermatozoïdes sur une cellule de Thoma (d'après Milian Swiss)

4.2 – Utilisation du spectrophotomètre

L'acquisition d'un spectrophotomètre [figure 17] est justifiée pour les praticiens spécialisés ou les grands haras, surtout quand l'insémination artificielle est utilisée. Cette technique est basée sur la corrélation entre la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et sa concentration. Les spectrophotomètres peuvent être plus ou moins sophistiqués et doivent être calibrés pour le sperme d'étalon. La courbe standard est généralement établie à l'aide de dilutions sériées d'un échantillon donné dont la concentration est calculée à l'aide d'une cellule hématimétrique. L'appareil est calibré pour une utilisation avec une lumière d'une longueur d'onde de 550 nm. Un réétalonnage régulier des appareils est nécessaire. L'estimation de la concentration en spermatozoïdes d'un éjaculat par mesure de la densité optique doit être considérée comme assez juste et utilisable en routine pour la préparation de doses d'insémination, mais pouvant être soumise à des biais de mesure [3, 4].

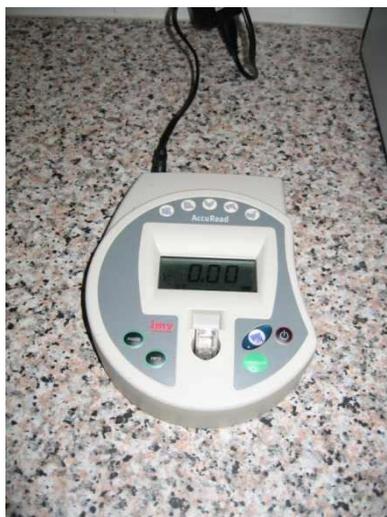


Figure 17 : photomètre AccuRead®(d'après IMV technologies)

4.3 – Utilisation du compteur de particules

La concentration du sperme peut être déterminée à l'aide d'un appareil comptant des particules de taille connue (« Coulter counter » tels que le SpermCue®, le modèle 10 sperm counter® ou le Micro-Reader®). Cette méthode est surtout utilisée dans les laboratoires de recherche. Les analyseurs informatisés de la semence sont capables de donner la concentration de l'échantillon lorsque le volume utilisé est précis et l'appareil bien calibré [3, 4].

4.4 – Détermination du nombre total de spermatozoïdes par éjaculat

Le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat, calculé en multipliant son volume par la concentration, est un paramètre important pour évaluer la fertilité d'un étalon. Il est soumis à des variations saisonnières, mais dépend également de nombreux facteurs tels que la fréquence des prélèvements et donc des éjaculations, l'âge, la taille des testicules, le rendement de la fonction de spermatogenèse (c'est-à-dire la quantité de spermatozoïdes produits par unité de poids de testicule), la quantité de spermatozoïdes contenus dans le réservoir extragonadique que constitue la queue de l'épididyme, et les différentes affections génitales possibles. Le nombre total de spermatozoïdes dans un éjaculat d'un étalon mature est en général compris entre 4 et 12 milliards. Chez les étalons pour lesquels un faible nombre de spermatozoïdes est dénombré dans l'éjaculat, il est conseillé de chercher à évaluer la production spermatique journalière (DSO ou « Daily Sperm Output »). Pour cela, un prélèvement de sperme quotidien est réalisé pendant 7 à 10 jours de suite avec une mesure du nombre total de spermatozoïdes dans chacun des éjaculats. Une fois que la réserve extragonadique en spermatozoïdes s'est stabilisée (4 jours pour les étalons ayant de petits testicules et 5 à 6 jours pour ceux ayant de gros testicules), il est possible d'estimer la DSO en faisant la moyenne du nombre de spermatozoïdes des éjaculats recueillis pendant 3 jours consécutifs. Lors d'une utilisation régulière comme reproducteur, l'étalon devrait ainsi pouvoir éjaculer chaque jour ce nombre de spermatozoïdes. Cette production quotidienne de spermatozoïdes par les testicules varie en fonction de la saison, de l'âge, de la taille des testicules, et de la présence ou non de troubles de la fonction testiculaire [3, 4].

5 – Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes

L'évaluation de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes est une étape indispensable lors de l'examen de la semence. La mobilité des spermatozoïdes reflète généralement la viabilité de l'ensemble des spermatozoïdes d'un éjaculat et une corrélation positive (mais non absolue) existe entre la mobilité et la fertilité [figure 18].

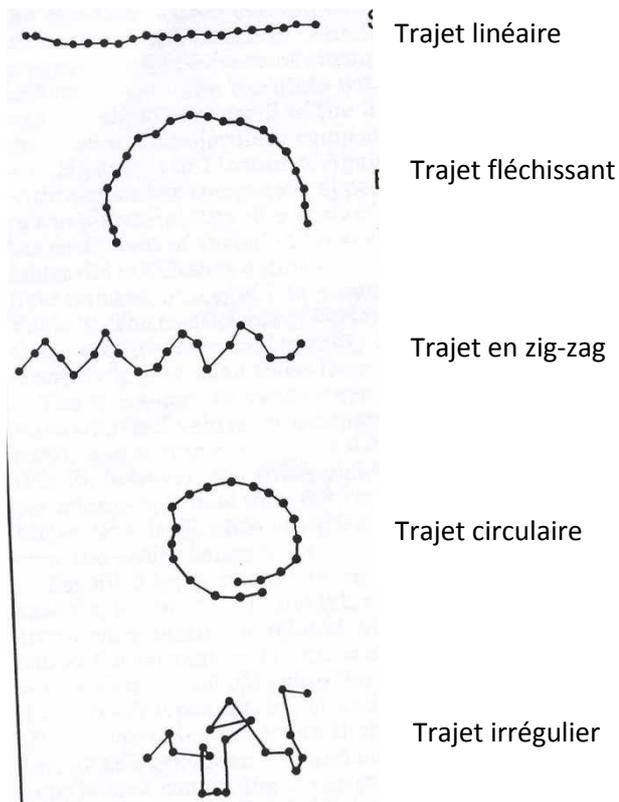


Figure 18 : représentation de cinq types de trajets de spermatozoïdes équins [7]

5.1 – Méthode classique

5.1.1 - Dilution

La mobilité des spermatozoïdes est d'abord évaluée au niveau de la semence « pure » (non diluée) afin de déterminer un éventuel effet délétère du dilueur de semence sur la semence : elle apporte une indication de la performance des spermatozoïdes dans leur milieu naturel. Elle peut cependant être difficile à évaluer lors de concentration spermatique élevée de par l'agglutination de spermatozoïdes sur la lame de verre. La mobilité des spermatozoïdes est ensuite évaluée après dilution de la semence dans un dilueur adapté [tableau 2]. La fiabilité et la répétabilité de cette évaluation sont ainsi généralement nettement améliorées. Il est préférable d'effectuer une dilution à une concentration définie (par exemple 20 millions de spermatozoïdes par millilitre) à l'aide d'un dilueur de semence identique afin de limiter les biais d'observation [3, 4].

NOMS	Composition
Dilueur de Kenney	<ol style="list-style-type: none">1. Mélanger du lait écrémé en poudre (2,4 g) avec du glucose (4,9 g) dans 92 mL d'eau déminéralisée.2. Ajouter de la pénicilline G cristalline (150 000 UI) et du sulfate de streptomycine cristallin (150 000 µg) ou du sulfate de gentamicine (100mg) mélangé dans 2 mL d'une solution de bicarbonate de sodium à 7,5%.
Dilueur au lait écrémé	<ol style="list-style-type: none">1. Chauffer 100 mL de lait écrémé non supplémenté à 92-95°C pendant 10 minutes au bain-marie.2. Refroidir.3. Ajouter du sulfate de polymyxine B (100 000 UI). <p>PS : aux Etats-Unis il n'y a pas de lait UHT d'où cette préparation ; en France le lait UHT demi-écrémé est fréquemment employé.</p>
Dilueur « crem-gel »	<ol style="list-style-type: none">1. Dissoudre 1,3 g de gélatine non parfumée dans 10 mL d'eau stérile déminéralisée. Stériliser.2. Chauffer un mélange moitié crème moitié lait à 92-95°C pendant 2 à 4 minutes au bain-marie. Enlever l'écume en surface.3. Mélanger 10 mL de la solution de gélatine avec 90 mL de la préparation lait-crème. Refroidir.4. Ajouter de la pénicilline G cristalline (100 000 UI) et du sulfate de streptomycine (100 000 µg) et du sulfate de polymyxine B (20 000 UI).

Tableau 2 : description des dilueurs de semence couramment employés [4]

5.1.2 – Evaluation visuelle

L'évaluation visuelle de la mobilité des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante [figure 19] et comporte une estimation de [3, 4]:

- la mobilité totale, à savoir le pourcentage de spermatozoïdes mobiles
- du pourcentage de spermatozoïdes fléchants, à savoir de spermatozoïdes présentant une trajectoire linéaire rapide
- la vitesse des spermatozoïdes : une note est attribuée (0=immobiles à 4=rapides)

Ainsi, un échantillon dont la mobilité serait notée 75/70(4) correspond à un éjaculat dont 75% des spermatozoïdes sont mobiles, 70% fléchants et avec une vitesse de déplacement rapide. Les pourcentages de spermatozoïdes fléchants et rapides sont souvent considérés comme étant les meilleurs critères d'analyse de la mobilité pour prédire la capacité fécondante du sperme [3, 4].

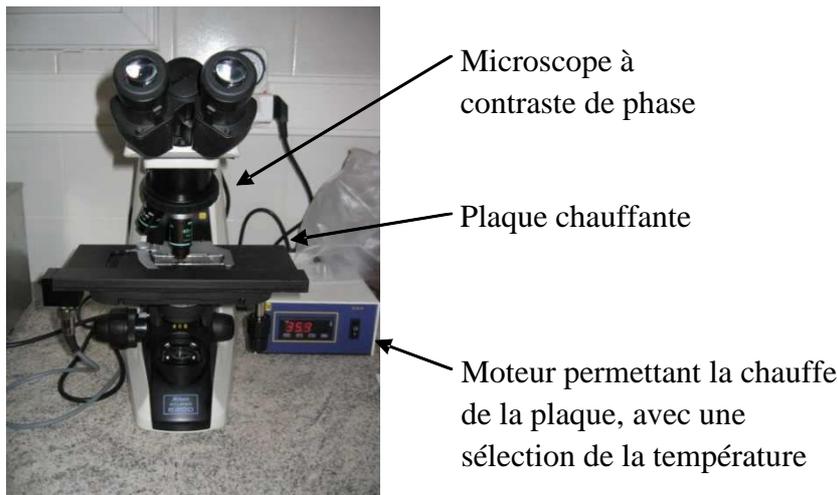


Figure 19 : microscope à contraste de phase muni d'une plaque chauffante

5.1.3 – Conservation de la semence

La mobilité peut être affectée par des conditions environnementales défavorables (températures excessives, lubrifiants, désinfectants, osmolarité ou pH de la solution de dilution). Il est donc indispensable de protéger la semence de ces conditions extérieures avant l'analyse. L'évaluation de la conservation de la mobilité se fait sur plusieurs échantillons dilués à 20 millions de spermatozoïdes par millilitre conservés à température ambiante (20-25°C) et réfrigérés (4-6°C). La conservation de la mobilité est améliorée dans la

durée pour le sperme réfrigéré. Le « Manuel d'évaluation de la qualité du sperme d'étalon » publié par la Société de Theriogenology [8] considère qu'un échantillon de sperme conservé à l'abri de la lumière, à température ambiante pendant 6 heures s'il est « pur » ou pendant 24 heures s'il est « dilué », doit avoir une mobilité minimale de 10% [3, 4].

5.2 – Autres méthodes

5.2.1 – Diversité des autres méthodes

Diverses techniques ont été développées afin d'obtenir un résultat sécurisé et objectif, sans biais : la microphotométrie à intervalles de temps réguliers, la vidéomicrographie reconstruite image par image, la spectrophotométrie ou l'analyse d'images automatisées. Ces méthodes sont cependant considérées comme étant fastidieuses et trop coûteuses pour être utilisées en routine [9].

5.2.2 – Description du système d'analyse d'images automatisées (CASA : computer-assisted spermatozoal analysis)

Le système d'analyse automatisée CASA est actuellement en place dans plusieurs laboratoires de référence afin d'estimer objectivement les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes. Il permet de visualiser et de numériser des images successives, de traiter et d'analyser les données et de fournir ensuite des informations exactes, précises et significatives sur la cinématique de cellules individuelles permettant d'apporter des données statistiques sur la population moyenne de cellules [10].

Ces analyseurs automatiques de mobilité fournissent un très grand nombre de mesures objectives sur les caractéristiques de mobilité des spermatozoïdes [4, 11]:

- le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (MOT : Total Spermatozoal Motility)
- le pourcentage de mobilité progressive (PMOT : Progressive Spermatozoal Mobility)
- le pourcentage de spermatozoïdes fléchants (dont la trajectoire a des caractéristiques supérieures à une vitesse et une linéarité de mouvement prédéfinie)
- l'amplitude de mouvements latéraux de la tête des spermatozoïdes pendant leur déplacement (ALH : Amplitude of Lateral Heat Displacement)

- la vitesse moyenne de déplacement linéaire (VSL : Straight-Line Velocity)
- la vitesse curviligne (VCL : Curvilinear Velocity) c'est-à-dire la vitesse mesurée sur la distance totale parcourue
- la fréquence des rythmes de croisements des trajectoires (BCF : Beat Cross Frequency)
- la moyenne de déplacements angulaires (MAD : Mean Angular Displacement).

5.2.3 – Systèmes CASA actuels

Aujourd'hui, les systèmes employés sont le système IVOS®, le système SM-CMA et le « Hobson Sperm Tracker ». Le système IVOS® a été développé en 1992 par Hamilton-Thorn. Il présente les innovations suivantes : un éclairage stroboscopique par illumination de diode pour produire des images nettes et plus précises, un système d'enregistrement pour favoriser le suivi de l'analyse du sperme, une classification automatisée des mouvements des spermatozoïdes et l'utilisation facultative d'une illumination fluorescente et d'un fluorochrome de l'ADN spermatique afin de distinguer les cellules de tout autre objet ambigu. Le système SM-CMA a été développé dans le début des années 90. Il est le seul système à pouvoir détecter la pièce intermédiaire du spermatozoïde pour déterminer si l'objet immobile est bien un spermatozoïde intact ou pour distinguer la trajectoire propre à deux cellules qui se croisent ou se trouvent dans une région floue et incertaine. Le « Hobson Sperm Tracker » a été introduit dans le milieu des années 90 [10].

L'analyse informatique des spermatozoïdes est principalement réservée au monde de la recherche où la standardisation, l'exactitude et la précision sont des conditions indispensables à l'obtention de mesures expérimentales. L'intérêt de l'utilisation d'un l'analyseur CASA dans un environnement commercial, comme un hôpital vétérinaire ou un centre de reproduction en équine, est sa capacité à recueillir des résultats objectifs sur la mobilité. Une incertitude existe cependant encore sur la relation entre la fertilité et les valeurs obtenues par le CASA.

Par ailleurs ces instruments permettent de sélectionner des caractéristiques diverses (fréquence et durée des prises d'images, valeur seuil démarquant la présence de mouvement, progression des mouvements, mesures de vitesse, taille et luminosité des têtes des spermatozoïdes) afin d'optimiser la capture des spermatozoïdes et de minimiser celle d'objets inertes. Chaque manipulation est importante pour améliorer la précision et la répétabilité des mesures données par les laboratoires [12, 13].

5.2.4 – Résultats des études employant les systèmes CASA

Une étude a comparé deux systèmes CASA différents : le « CellSoft Automated Semen Analyzer », qui utilise un microscope externe pour prendre des images des spermatozoïdes, et le « HTM-2000 Motility Analyzer », constitué de son propre système d'optiques qui enregistre les images sur un support vidéo lu ensuite par un microscope externe équipé d'une caméra. Le pourcentage de cellules mobiles est apparu statistiquement différent entre les deux analyseurs, bien que ces valeurs étaient plus comparables entre elles qu'en utilisant la méthode d'estimation subjective. La vitesse curviligne est également apparue différente avec les deux appareils car ils ne localisent pas le centre de la tête spermatique au même endroit. De même, la détermination de la linéarité et l'estimation de la concentration spermatique étaient différents. Cette étude fait donc ressortir des différences dans l'analyse des mouvements des spermatozoïdes entre deux analyseurs automatisés de marques différentes ainsi qu'avec l'estimation subjective. Une certaine prudence reste donc de mise lors de l'interprétation de tels résultats [11].

Le HTMA (Hamilton-Thorn motility analyzer), qui consiste en une analyse thermostatique d'un échantillon de sperme, est une technique fiable et répétable pour les mesures de MOT, PMOT, VCL et VSL du sperme d'étalon. Il est considéré comme meilleur que la vidéomicrographie pour l'analyse des variables de vitesse. Les éléments susceptibles d'entraîner des variations sont : les différents opérateurs, la variation de température ambiante ou les délais entre deux prises d'images. Le principal inconvénient de cette technique est le fort pourcentage d'erreurs dues à l'interprétation des trajectoires (comme deux trajectoires qui se croisent par exemple) [7].

5.2.5 – Avenir ?

Certains systèmes CASA sont équipés d'optiques fluorescents, option nommée « Viadent » permettant la détection de colorants comme celui de l'ADN SYBR-14. Il s'agit d'une méthode rapide, précise et objective d'évaluation de la viabilité et de la mobilité de la semence [8]. Des études ultérieures devront déterminer si la valeur prédictive de la mobilité spermatique peut être améliorée par cette méthode [11].

6 – Etude morphologique des spermatozoïdes

6.1 – Diversité des méthodes possibles

L'étude de la morphologie des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope avec un objectif à immersion au grossissement x1000. Les microscopes à lumière directe peuvent être utilisés pour examiner les frottis de semence à condition que les colorants utilisés soient appropriés [4].

6.1.1 – Les différents colorants

Les colorants cytologiques classiques à usage multiple, comme le Wright's, le Giemsa, l'hématoxyline-éosine, sont utilisés pour mettre en évidence les cellules germinales ou somatiques sur les frottis de sperme. Ils permettent une coloration différentielle des différentes parties du spermatozoïde et une identification d'autres éléments cellulaires telles que les bactéries ou les leucocytes. Une modification de la coloration Giemsa/Wright est disponible dans le commerce et permet la coloration de frottis en quelques secondes par passage des lames dans trois solutions différentes : solution de fixation, solution d'éosine Y et solution de bleu de méthylène [3, tableau 3].

Les colorants de fond, comme l'éosine-nigrosine ou l'encre d'Inde, sont les colorants les plus largement employés de par leur facilité d'utilisation. Une goutte de sperme et une goutte de colorant sont mélangées sur la lame avant d'être étalées pour obtenir un frottis qui est séché à l'air puis observé au microscope avec objectif à immersion. La visualisation des détails de la structure du spermatozoïde est considérablement améliorée par fixation des cellules dans une solution tamponnée de formol ou dans un fixatif similaire tel que le glutaraldéhyde [13], ainsi que par l'utilisation d'un montage en milieu humide avec un microscope à contraste de phase ou un microscope à contraste interférentiel. La coloration à l'éosine-nigrosine est utilisée pour l'étude morphologique des spermatozoïdes ainsi que pour la détermination du taux de spermatozoïdes vivants et morts. Ce colorant est constitué d'un mélange à parts égales d'une solution d'éosine à 5% et d'une solution de nigrosine à 10%. Les spermatozoïdes vivants apparaissent blancs alors que ceux qui sont morts sont colorés en rouge ou rose suite à la perméabilité de leur membrane à l'éosine. La coloration à l'encre de

chine est une préparation permettant d'avoir un meilleur contraste entre les spermatozoïdes (blanc) et la lame (fond noir) [3].

Coloration de Giemsa	<ol style="list-style-type: none"> 1. Préparer les frottis sur les lames propres dégraissées 2. Fixer les frottis par passage de 3 minutes dans la solution mère 2 fois 3. Placer dans la solution diluée au 1/20^{ème} (1 g de colorant de Jenner + 400 mL de méthanol) pendant 45 minutes 4. Passer chaque lame individuellement dans la solution d'acide acétique glacial au 1/100^{ème} 5. Rincer les lames à l'eau, les déshydrater rapidement à l'alcool absolu puis les laver au xylène 6. Observer au microscope au grossissement x 1000 sous huile d'immersion
Coloration de Wright	<ol style="list-style-type: none"> 1. Préparer les frottis de sperme et les sécher à l'air 2. Recouvrir les frottis avec 15 à 20 gouttes d'une solution de Wright pendant 1 minute 3. Ajouter 30 à 40 gouttes d'eau ou d'une solution tampon* et laisser au moins 2 minutes 4. Drainer la lame, monter et passer à l'observation microscopique <p style="text-align: center;">*Solution tampon : 0,5 g de phosphate de sodium dibasique 3,5 g de phosphate de sodium monobasique 1 litre d'eau bi-distillée</p>
Coloration à l'éosine B	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fixer le sperme en mélangeant 0,1 mL de sperme sans gel avec 0,9 mL de solution formolée tamponnée 2. Préparer les frottis en plaçant 6 µL de sperme fixé sur une lame dégraissée 3. Sécher les frottis à l'air et les maintenir à 23°C jusqu'à coloration 4. Colorer en trempant les lames dans une solution d'éosine B à 5% pendant 20 minutes 5. Observer à l'aide d'un microscope à contraste de phase, au grossissement x 400.

Tableau 3 : description des préparations de différentes colorations pour l'observation microscopique de la morphologie des spermatozoïdes [3]

6.1.2 – La microscopie électronique

L'observation du spermatozoïde au microscope électronique, à transmission ou à balayage, est parfois nécessaire pour caractériser une anomalie à un plus fort grossissement que celui apporté par la microscopie optique. Cette technique offre un fort pouvoir de résolution pour l'observation des détails morphologiques et permet ainsi un examen structural approfondi. Elle a été utilisée avec succès pour identifier et décrire avec précisions les anomalies ultrastructurales au niveau de l'acrosome, de la jonction entre la tête et la pièce intermédiaire et au niveau des microtubules de l'axonème. Le nombre de spermatozoïdes observables à l'aide de cette technique est limité d'où la nécessité que l'anomalie suspectée soit très fréquente dans l'échantillon [3]. La microscopie à balayage apporte une vision en trois dimensions des spermatozoïdes alors que la microscopie électronique à transmission permet l'observation en coupes de l'ultrastructure interne des spermatozoïdes [3, 4].

La préparation de la semence est la suivante [14] : (1) le sperme est fixé dans une solution de glutaraldéhyde 4% - cacodylate sodium à 0.1 mol/l, à pH 7,4, contenant du sucrose 5%, pendant une heure ; (2) les échantillons sont lavés trois fois à l'aide d'une solution tampon cacodylate à 0.1 mol/L puis fixés au tétroxyde d'osmium 1% - cacodylate 0.1 mol/L pendant une heure ; (3) trois lavages avec le tampon cacodylate sont ensuite réalisés et les échantillons sont déshydratés par passage successifs dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes ; (4) l'inclusion se fait dans le Polybed 812 ND et les coupes sont montées sur une grille de nickel et colorées à l'aide d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb.

6.2 – Evaluation et classification

Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes sont traditionnellement classées en anomalies primaires, secondaires et tertiaires. Les anomalies primaires sont considérées comme celles résultant d'une perturbation au cours de la spermatogenèse et par conséquent ayant une origine testiculaire. Les anomalies secondaires auraient pour origine des altérations au moment de leur passage dans les voies génitales excrétrices. Les anomalies tertiaires se produiraient *in vitro*, du fait d'une mauvaise technique de récolte ou d'une mauvaise manipulation au laboratoire. Un minimum de 100 spermatozoïdes doit être observé pour évaluer ces défauts de morphologie [4, 9].

A l'heure actuelle, la classification consiste à répertorier les spermatozoïdes en fonction de la localisation de l'anomalie observée : têtes détachées sans queue, têtes anormales, acrosomes en bouton, gouttelettes cytoplasmiques proximales ou distales, pièces intermédiaires pliées ou irrégulières, queues coudées ou enroulées [figure 20]. Cela permet une observation plus explicite et plus représentative de l'ensemble des spermatozoïdes tout en évitant les hypothèses plus ou moins erronées sur l'origine de tel ou tel défaut. De plus, certaines anomalies morphologiques comme le détachement de tête peuvent être primaire, secondaire, ou tertiaire d'où des erreurs d'interprétation évitées. Aussi un choc osmotique peut provoquer une coudure ou un enroulement de la queue du spermatozoïde et donc être abusivement interprété comme étant une anomalie morphologique secondaire, quand bien même il s'agit d'une anomalie tertiaire [3, 4, 9].

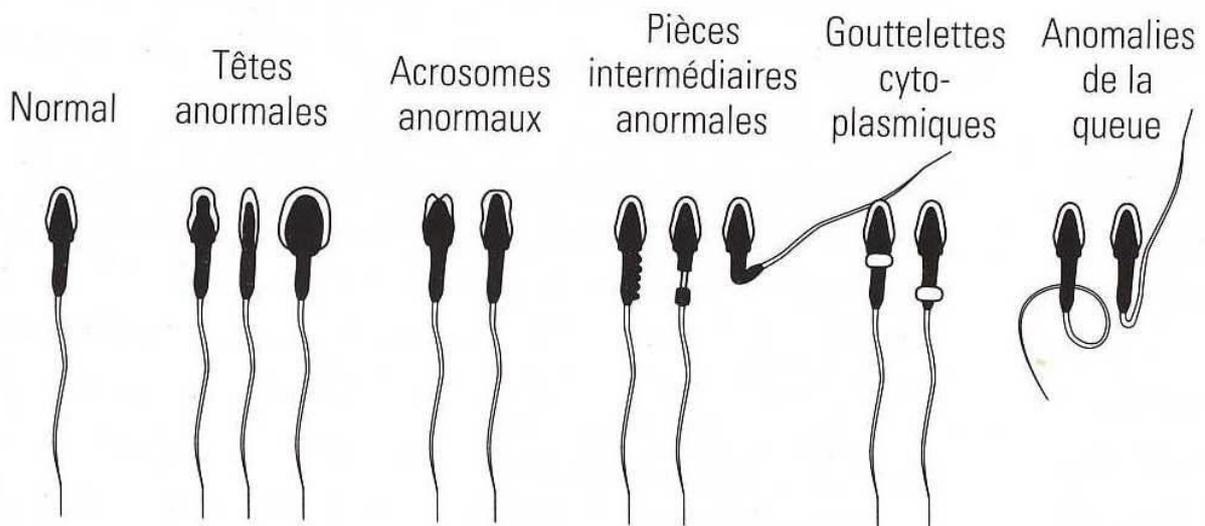


Figure 20 : représentation schématique des anomalies chromosomiques possibles [4]

6.3 – Interprétation de la qualité de la semence

L'examen morphologique fournit des informations sur les caractéristiques individuelles des spermatozoïdes. Ce renseignement est important car la semence peut posséder une bonne mobilité avec des spermatozoïdes ayant des anomalies morphologiques. De plus, un étalon peut avoir de nombreux spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques sans que cela n'ait une incidence sur la fertilité. Un certain nombre de

défauts morphologiques (gouttelettes cytoplasmiques ou queues anormales) semble n'avoir que peu d'effet sur la fertilité alors que d'autres (pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement anormaux, têtes détachées, anomalies de forme de la tête, pièces intermédiaires pliées ou irrégulières, queues enroulées et cellules germinales prématurées) ont un effet délétère sur la fertilité [15].

La variation au niveau de la morphologie des spermatozoïdes au cours de la saison de monte pour un même étalon peut être importante, sans que cela n'affecte sa fertilité [15]. Ainsi, l'observation morphologique des spermatozoïdes dans le cadre de la prédiction de la fertilité d'un étalon doit être interprétée avec prudence : certains étalons peuvent avoir un grand nombre de spermatozoïdes anormaux alors que leur exploitation comme reproducteur permet d'enregistrer des taux élevés de gestations. De plus, étudier la fertilité prévisible d'un étalon sur une saison de monte à partir d'un unique prélèvement est réducteur et conduit à de mauvaises interprétations. En général, un spermatozoïde à morphologie anormale n'exerce pas une influence directement négative sur un spermatozoïde normal. Par conséquent, le nombre total de spermatozoïdes morphologiquement normaux dans un éjaculat donne une meilleure information sur la fertilité d'un étalon que le pourcentage ou le nombre absolu de spermatozoïdes morphologiquement anormaux. En général, le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux dans un échantillon de semence est similaire au pourcentage de spermatozoïdes progressivement mobiles [4].

Couleur	Blanc laiteux
Volume	30 à 300 mL
Concentration	30 à 600 millions / mL
Ratio spermatozoïdes morts/vivants	6,5 :3,5
Morphologie	Plus de 65% de spz morphologiquement normaux
Mobilité	Minimum 40% de spz activement mobiles
Longévité à température ambiante	45 à 50% de spz vivants après 3 heures 10% de spz vivants après 8 heures
pH	6,9 à 7,8
Globules rouges	Moins de 5000/mL
Globules blancs	Moins de 1500/mL

Tableau 4 : caractéristiques du sperme d'étalon [3,4,5]
(spz : spermatozoïdes)

IV – Nouvelles techniques d'évaluation des spermatozoïdes

1 – Evaluation de l'intégrité de la chromatine spermatique

L'intégrité de l'ADN spermatique est essentielle pour permettre la transmission de l'information génétique et peut être testée selon différentes méthodes que nous allons développer successivement.

1.1 – Test de la Structure de la Chromatine Spermatique (SCSA = Sperm Chromatin Structure Assay)

Everson et al. [16] ont étudié la relation entre l'hétérogénéité de la chromatine spermatique et la fertilité chez le taureau, la souris, et l'homme à l'aide de la cytométrie en flux. Cette technique consiste à faire défiler à grande vitesse des molécules ou des cellules dans le faisceau d'un laser, la lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permettant de classer la population suivant plusieurs critères. Appliquée au noyau spermatique chauffé, cette méthode révèle une diminution de la résistance à la dénaturation de l'ADN spermatique sur des échantillons de sperme de souris, de taureaux, d'homme et d'étalon [16, 17, 18].

1.1.1 – Réalisation pratique

La mesure par cytométrie en flux de l'ADN nucléaire spermatique est réalisée en utilisant de l'acridine orange, un fluorochrome métachromatique. Les échantillons de semence sont placés à une température située entre 35°C et 37°C. Un volume de 2 à 7 µL de semence est dilué à 200 µL dans une solution tampon. Ce mélange est mélangé avec 400 µL d'une solution d'acide détergent. Après 30 secondes, 1.2 ml d'une solution d'acridine orange sont ajoutés. Ce mélange est recouvert d'un film d'aluminium puis placé dans un flux liquide qui passe dans un tube pendant 2 minutes ce qui permet le comptage des cellules à la vitesse de 100 à 200 cellules par seconde.

La cytométrie en flux est standardisée en fonction de la fluorescence : fluorescence verte au canal 500 (FI-1@500) et fluorescence rouge au canal 150 (FI-3@150). La fluorescence verte est associée à l'ADN double brin natif alors que la fluorescence rouge est associée à l'ADN simple brin dénaturé. Un graphe avec la fluorescence rouge sur l'axe de X et la fluorescence verte sur l'axe des Y est représenté [figure 21]. Physiologiquement, la population majoritaire de cellules doit ainsi présenter une dominance de fluorescence verte (forme elliptique sur la gauche du graphe) alors que les cellules dont l'ADN est dénaturé et donc présentant une fluorescence rouge doit être minoritaire. Le pourcentage de simple-brins obtenu est appelé l'index de fragmentation de l'ADN (DFI ou « DNA Fragmentation Index ») [17, 18, 19].

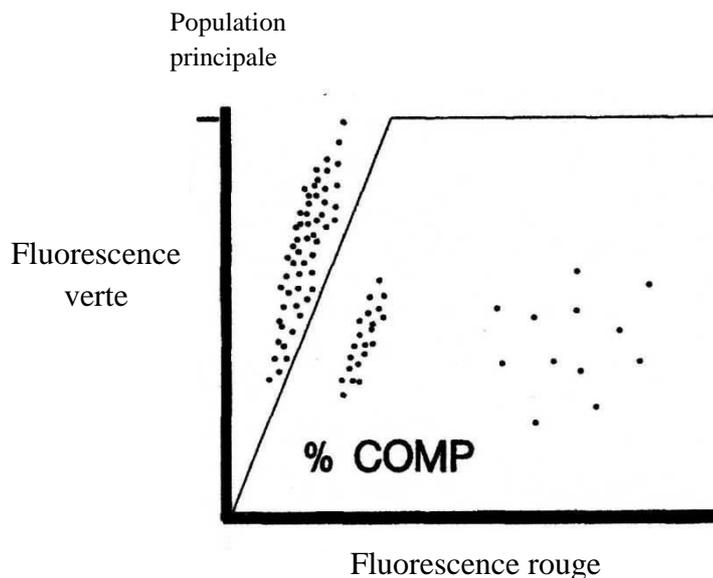


Figure 21 : graphe de la distribution des spermatozoïdes selon la couleur de leur fluorescence [18] (le % de COMP – cells outside the main population - représente les spermatozoïdes en dehors de la population principal

Composition des solutions :

- Solution tampon : 0.186g de disodium EDTA
0.790 g de Tris-HCl
4.380 g de NaCl
500 mL d'eau déminéralisée, à pH 7.4

- Solution d'acide détergent : 2.19 g de NaCl
1.0 mL d'une solution de 2NHCl
0.25 mL de Triton-X
250 mL d'eau déminéralisée

- Solution d'acridine orange : 3.8869 d'acide citrique monohydrate
8.9429 g de Na₂HPO₄
4.3850 g de NaCl
0.1700 g de disodium EDTA
4 µg/mL de solution d'acridine orange à 1mg/ml
500 mL d'eau, à pH 6.0.

1.1.2 – Résultats des différentes études

Une relation étroite entre la fertilité et la susceptibilité de l'ADN nucléaire spermatique à être dénaturé a été démontrée chez différentes espèces dont l'étalon [17, 18].

Au cours de la spermatogenèse, les molécules d'histones sont remplacées par des protamines [figure 22] responsables de la condensation de la chromatine qui offre à l'ADN une forte stabilité et une inactivité de sa transcription. Un déficit en protamines sera donc responsable d'une fragilité de l'ADN et d'une tendance à la fragmentation, ce qui aura des conséquences sur la fertilité [20, 21, 22]. Les spermatocytes I semblent contenir des facteurs induisant la formation des protamines et des ponts disulfures. Si ces facteurs sont altérés, le nombre de ponts disulfures diminue et la chromatine devient moins stable. Le stade de la spermatogenèse, et de ce fait le type de cellules spermatiques atteintes par un quelconque stress, a donc une influence majeure sur l'éventuelle atteinte de la chromatine [20].

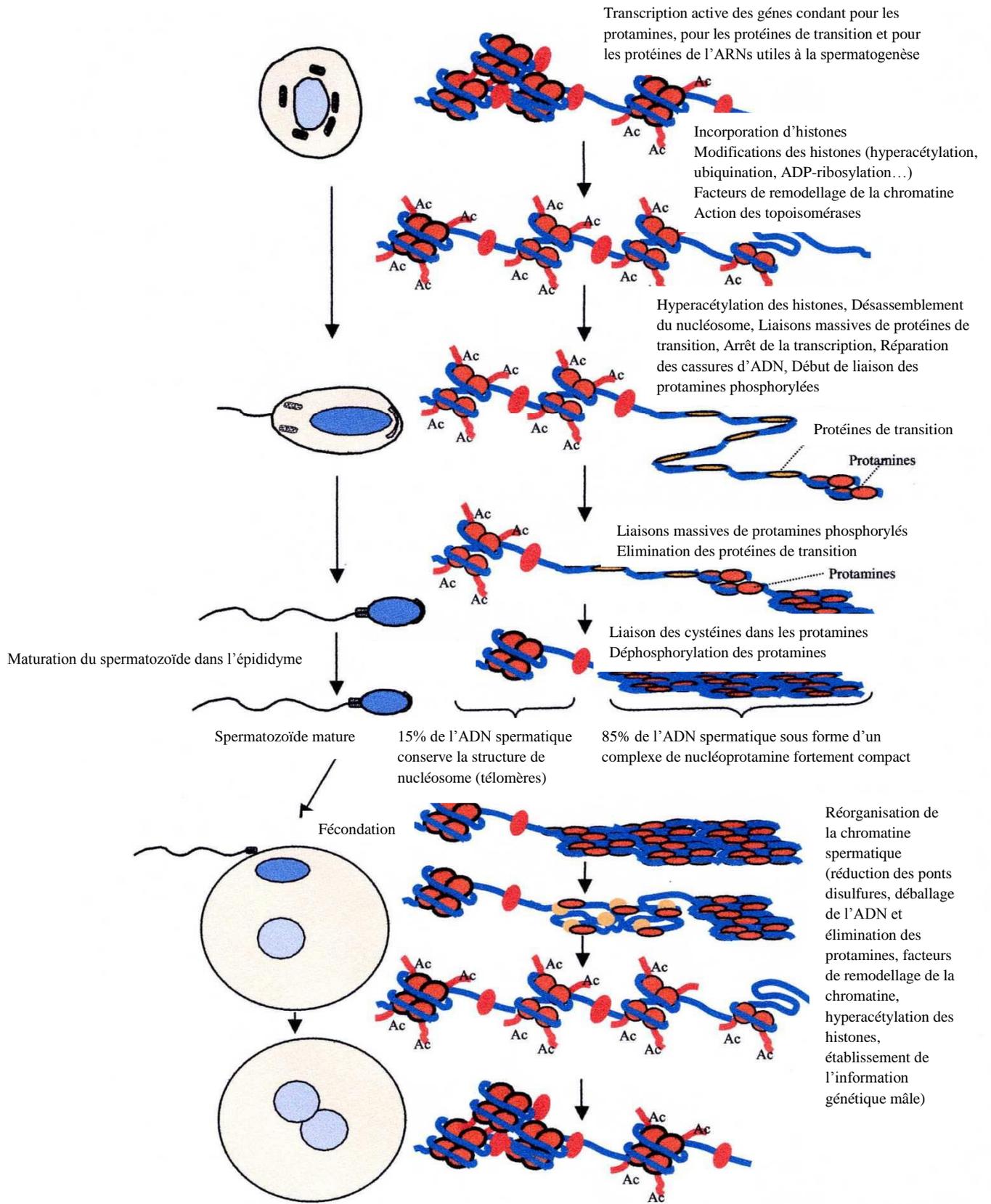


Figure 22 : représentation schématique des changements majeurs de la chromatine durant la spermatogénèse [23]

Les dommages causés par une oxydation de l'ADN sont beaucoup plus importants si l'oxydation se produit lors de la spermatogenèse plutôt que si elle a lieu sur un spermatozoïde mature. Plus la mutation a lieu tôt dans la spermatogenèse, plus elle pourra être reproduite sur les futures populations spermatiques, et donc plus les conséquences seront importantes. Lorsque la chromatine est condensée, les réparations des erreurs d'ADN deviennent impossibles [24].

L'exposition du scrotum de souris à une élévation de la température de 38°C à 42°C pendant 60 minutes montre des altérations de la spermatogenèse : diminution du poids testiculaire, changement dans les proportions des types de cellules testiculaires (haploïdes vs diploïdes), modification de la morphologie de la tête des spermatozoïdes et altération de la structure de la chromatine de la queue des spermatozoïdes [25].

Une irradiation aux rayons X ou aux rayons gamma de testicules de taureaux induit des erreurs d'ADN sans influencer sur la mobilité, la morphologie, l'intégrité de la membrane plasmatique, l'acrosome et les mitochondries. Ces erreurs d'ADN sont dose-dépendantes : plus la dose d'irradiation est forte, plus le nombre de cellules touchées est conséquent. Les cellules irradiées ne présentent aucun signe d'apoptose et peuvent fertiliser les ovocytes normalement. Par contre, le développement embryonnaire est bloqué au stade de la formation des blastocytes sur un nombre beaucoup plus important de cellules irradiées que de cellules non irradiées (28% vs 3%). Ce blocage s'accompagne d'une initiation de l'apoptose après 2 ou 3 clivages qui entraînent une décondensation de l'ADN et une désorganisation des polymères. Ces résultats montrent que les erreurs d'ADN n'affectent le développement embryonnaire qu'après le début de l'expression des gènes embryonnaires. De plus, les réparations de l'ADN après fécondation paraissent assez limitées [26].

1.1.3 - Interprétation

Les molécules de protamine ont plusieurs rôles au sein de l'ADN : condensation du noyau spermatique, protection du message génétique délivré par les spermatozoïdes, participation dans le processus de maintien de l'intégrité et de la réparation de l'ADN, et participation à l'empreinte génétique de l'ADN [24]. La dénaturation de l'ADN est fortement liée aux cassures de brin qui peuvent être associées à différents facteurs : l'apoptose [27], le stress oxydatif (un déséquilibre se crée entre les réactifs oxydatifs - peroxyde d'hydrogène, superoxyde, et radicaux libres - et les agents antioxydants du plasma séminal) [24, 27], la chaleur [20, 25], la radiation [26, 27, 28, 29], une déficience en protamines

[20, 21, 22, 23, 25], une augmentation du nombre de leucocytes dans le sperme [28], ou tout autre stress environnemental (exposition à des toxiques). Chaque lésion de l'ADN peut créer une déficience génétique du spermatozoïde. Ce dernier pourra alors apparaître normal lors des tests de laboratoire classique (mobilité, intégrité de la membrane plasmique) tout en induisant une erreur embryonnaire après la fécondation [26].

La chromatine spermatique est fortement condensée par rapport à celle d'un noyau de cellule somatique, ce qui induit une haute résistance aux mutations ainsi qu'un maintien de l'intégrité de l'ADN jusqu'à la fécondation. Du fait de son architecture chromatiniennne très condensée, le gamète mâle des mammifères est transcriptionnellement silencieux et il ne possède pas ou peu de cytoplasme capable d'abriter de traduction : même si ces cellules possèdent un set complet d'ARNm (Acide Ribonucléique messenger), les complexes ribosomiaux 80S ne sont pas présents en quantité suffisante pour permettre une translation de cet ARNm. Cependant, les spermatozoïdes peuvent traduire ces ARNm de novo grâce aux polysomes mitochondriaux sous certaines conditions [30, 31]. Il existe aujourd'hui des éléments tendant à prouver que l'ARN spermatique peut affecter le phénotype de la descendance : le spermatozoïde est ainsi non seulement parfaitement adapté à son rôle de délivrance du génome paternel mais des bénéfices supplémentaires pourraient être apportés par la délivrance additionnelle d'ARN spermatique. Etudier les rôles biologiques de l'ARN spermatique paraît donc intéressant dans les études de fertilité : une fragmentation de l'ARNm présent dans les spermatozoïdes et pouvant être translaté pourra en effet induire des dysfonctionnements fonctionnels, responsables d'une baisse de la fertilité [30, 31].

Le rapport étroit entre fertilité et susceptibilité de l'ADN à la dénaturation peut s'expliquer lors de la fusion spermatozoïde-ovocyte. En effet, au moment de la fécondation, la chromatine spermatique se décondense dans le cytoplasme de l'ovocyte, par réduction des ponts disulfures et des molécules de protamine. La chromatine devient alors plus sujette aux mutations [20].

1.1.4 - Bilan

Lors d'une analyse de la fertilité, il convient de définir si le niveau de qualité du sperme est cohérent avec le niveau de fertilité de l'étalon. Le test de la structure de la chromatine spermatique peut alors être appliqué, en plus des tests classiques, pour analyser le niveau de sensibilité de l'ADN à se dénaturer lors de stress et évaluer les effets de l'environnement et du stockage sur l'ADN spermatique [17].

Cependant, il convient de rester prudent lors de l'interprétation des résultats : lorsque les introns (protéines non codées) sont touchés, le développement embryonnaire n'est pas affecté. Dans ce cas, l'ADN pourra conduire à une gestation viable malgré le fort pourcentage de fragmentation. De même, l'ovocyte est capable de réparer certaines erreurs de l'ADN spermatique [27].

Enfin, l'utilisation de cette technique reste limitée en laboratoire et les résultats diffèrent d'un laboratoire à l'autre, d'où la nécessité d'établir des valeurs de référence propres à chaque établissement [27].

1.2 – Autres méthodes utilisées en humaine

Nous allons décrire brièvement les autres méthodes appliquées en médecine humaine pour mesurer la fragmentation de l'ADN et les interruptions de chromatine et pouvant avoir une application éventuelle dans le futur en reproduction équine :

- le marquage des brins d'ADN avec la terminale désoxynucléotidyle transférase = le TUNEL (Terminal transferase dUTP nick end labeling) : ce test mesure la fragmentation réelle de l'ADN [27] et établit une relation entre le type de protamine (P1 ou P2) et l'intégrité de l'ADN spermatique. Il quantifie l'incorporation de déoxyuridine triphosphate (dUTP) au niveau des cassures de simple et double brins d'ADN grâce à une réaction catalysée par l'enzyme terminal déoxynucléotide transférase (TdT) qui met en évidence les terminaisons 3'-OH. L'incorporation de dUTP au niveau des cassures est quantifiée par la cytométrie en flux avec une observation au microscope optique ou à fluorescence. Ce test ne peut pas être utilisé en routine car il manque de valeurs seuils [28, 32].
- le déplacement de brèche (Nick Translation, NT) : ce test mesure la fragmentation réelle de l'ADN [27] en quantifiant l'incorporation de dUTP dans les cassures simple brin d'ADN. L'ouverture d'une brèche dans la structure primaire d'un des deux brins d'un fragment d'ADN est obtenue par l'action de la désoxyribonucléase pancréatique. L'ADN polymérase synthétise alors un nouveau brin d'ADN à partir de l'extrémité 3'OH terminale d'un côté de la brèche ainsi créée. Simultanément l'activité 5'→3' exonucléase de l'ADN polymérase hydrolyse les nucléotides du côté 5'-phosphate de

la même brèche. Il en résulte un déplacement de la brèche le long de l'ADN avec un remplacement des nucléotides du brin coupé. L'opération est réalisée en présence de nucléotides substrats marqués et donc incorporés dans l'ADN synthétisé. Le déplacement de brèche identifie ainsi les spermatozoïdes qui contiennent des erreurs endogènes d'ADN à un niveau sensible et variable [28, figure 23].

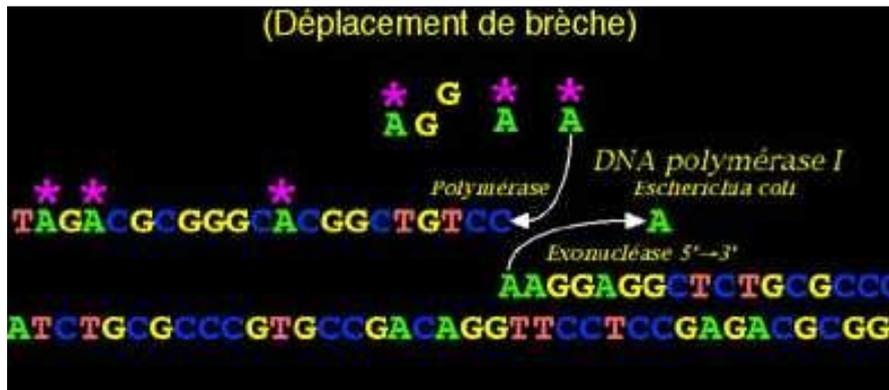


Figure 23 : schéma de la technique de déplacement de brèche [33]:

L'ADN polymérase I issu de la bactérie E-coli sert de sonde radioactive (marquée d'une étoile). L'action de l'exonucléase 5' → 3' entraîne une brèche dans la structure primaire d'un des deux brins d'ADN. L'ADN polymérase synthétise un nouveau brin d'ADN à partir de l'extrémité 3'OH terminale d'un côté de la brèche. Simultanément l'exonucléase hydrolyse les nucléotides du côté 5'-P de la même brèche. Il en résulte donc un déplacement de brèche le long de l'ADN avec un remplacement des nucléotides du brin coupé. Si cette opération est réalisée en présence de nucléotides fortement marqués, le marqueur radioactif sera incorporé dans l'ADN nouvellement synthétisé.

- le test de dispersion de la chromatine spermatique (Sperm Chromatin Dispersion, SCD) : ce test mesure la susceptibilité de l'ADN à être dénaturé [28]. C'est une méthode simple et peu chère pour analyser les fragmentations d'ADN. Elle est basée sur le principe que des spermatozoïdes contenant des cassures d'ADN ne peuvent pas produire le halo caractéristique obtenu lorsque l'on mélange de l'agarose (polymère non-ramifié à base d'agar-agar purifié) aqueux dénaturé par un traitement acide, et des protéines nucléaires [28].
- le test des comètes (single-cell gel electrophoresis, SCGE) : ce test mesure les erreurs au niveau de l'ADN par quantification des cassures de simple-brin et double-brin d'ADN. Les spermatozoïdes sont fixés sur une lame dans de l'agarose puis colorés avec une teinture fluorescente à l'ADN. Les images obtenues après électrophorèse

mesurent la migration de l'ADN et ressemblent à des « comètes » [figure 24]. Elles permettent de mesurer l'étendue des erreurs d'ADN. Les caractéristiques utilisées pour l'analyse sont le diamètre et la longueur de la comète. Un des principes de ce test est que les grandes cassures double-brin d'ADN se situent au niveau de la tête de la comète, alors que les cassures courtes, double ou simple brin, se trouvent au niveau de la queue de la comète. Ainsi, les spermatozoïdes contenant un fort niveau de cassures de brin d'ADN montrent une forte intensité de fluorescence au niveau de la queue de comète, ainsi qu'une grande longueur de cette queue. Cependant, aucun seuil n'a pour le moment été établi pour ce test [28, 29].



Figure 24 : image de comète obtenue suite au test des comètes (d'après la société BIO-TOX)

- le test d'immunofluorescence d'évaluation du niveau de protamines : il utilise la coloration MitoTracker® pour quantifier l'immunofluorescence des protamines, colorant qui se localise dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde viable. Chaque cellule spermatique est évaluée en « viable » ou « non viable » suivant la présence ou non d'une fluorescence de protamine. Les signaux de MitoTracker® sont classifiés en « positif » ou « négatif » suivant le seuil d'intensité de l'immunofluorescence. Lors de déficience en un type de protamine, le nombre de taches fluorescentes est particulièrement réduit avec une intensité de la fluorescence diminuée. Il a été démontré des variations significatives dans le niveau de protamine des cellules spermatiques humaines permettant d'établir une relation significative entre la viabilité des cellules spermatiques et les erreurs d'ADN. Cela a une incidence clinique puisqu'une déficience en protamine peut être diagnostiquée lors d'infertilité [21].

2 – Caractérisation de la réaction acrosomique et de la capacitation

Les spermatozoïdes éjaculés ne sont pas immédiatement capables de féconder l'ovocyte : ils doivent subir des modifications et une maturation finale à l'intérieur des voies génitales de la jument. La réaction acrosomique aboutit à la fusion de la membrane plasmique du spermatozoïde avec la paroi externe de l'acrosome ce qui entraîne la libération du contenu de l'acrosome. Ceci a pour but de faciliter la traversée du spermatozoïde à travers les enveloppes externes de l'ovocyte. Certaines molécules telle que le ionophore du calcium, le fluide folliculaire, les glycoprotéines de la zone pellucide, les facteurs d'activation des plaquettes, les glycosaminoglycanes, ou la progestérone sont capables d'induire la réaction acrosomique in vitro [34, 35]. Elles sont notamment employées dans différents types de tests pour mesurer le pourcentage de spermatozoïdes qui ont effectué leur réaction acrosomique.

2.1 – Induction à la progestérone

La progestérone est sécrétée par la zone pellucide de l'ovule et se retrouve dans le fluide folliculaire. Meyers et al. [34] ont montré l'action de la progestérone sur du sperme d'étalon d'une part pour induire la capacitation et la réaction acrosomique et d'autre part pour déterminer la fertilité selon sa capacité à réaliser la capacitation et la réaction acrosomique. Les récepteurs membranaires impliqués dans cette induction de capacitation par la progestérone ont ensuite été mis en évidence [35, 36].

2.1.1 - Technique

- Induction de la capacitation :

La semence est centrifugée à 50 x g durant 10 minutes à 25°C dans un tube en polypropylène (Corning) pour séparer la fraction de gel restant et les débris séminaux des spermatozoïdes. Le surnageant est transféré dans un autre tube et la mobilité des spermatozoïdes est évaluée. La semence est ensuite traitée par centrifugation en gradient de

Percoll. Cette méthode utilise des particules de gel de silice recouvertes de polyvinylpyrrolidone permettant de produire des densités de l'ordre de 1.3 g/mL tout en maintenant de faibles pressions osmotiques et de faibles viscosités. Approximativement 1 à 2 mL du surnageant sont placés dans un gradient à double couche de 42% de Percoll (couche du haut) et de 84% de Percoll (couche du bas) dans un milieu de TALP durant 20 minutes à 300 x g à température ambiante. Les spermatozoïdes sont aspirés par pipette, placés dans un nouveau Corning avec 2 ml de TALP puis centrifugés 10 minutes à 300 x g à température ambiante. La concentration finale est ajustée à 10×10^6 spermatozoïdes mobiles par millilitre par l'ajout de milieu TT puis la suspension est répartie dans 4 Cornings à raison de 400 μ L par tube. Ils sont incubés sur une pente inclinée à 45°, à 39°C durant 5 heures, dans une atmosphère à 5% de CO₂ [34].

Milieu de TALP :

- 1.505 g de NaCl,
- 0.0825 g de CaCl₂·2H₂O,
- 0.075 g de KCl,
- 0.02642 g de Cl₂Mg·6H₂O,
- 0.0249 g de NaH₂PO₄,
- 0.966 g de NaHCO₃,
- 0.00775 g de pénicilline G potassique,
- 0.6255 g de glucose D (+),
- 0.03437 g de C₃H₃O₃Na,
- 0.00125 g de rouge phénol,
- 200 mL d'eau distillée

Milieu TT (TALP-TEST-yolk [jaune d'œuf]) :

- 50% de milieu TALP
- 50% de milieu TEST-yolk [jaune d'œuf] :
 - 176 mmol/mL de TES (NTris[hydroxyméthyl]méthyl-2-aminoéthane sulfonique acide)
 - 80 mmol/mL de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
 - 9 mmol/mL de dextrose
 - 1 UI/mL de pénicilline G
 - 1 g/mL de streptomycine sulfate
 - 20% de jaune d'œuf

- Induction de la réaction acrosomique :

La préparation de la progestérone est réalisée le jour même en diluant 5 mg de progestérone (Sigma) dans 5 mL de diméthyl-sulfoxyde (DMSO). 100 µL de cette solution à 1 mg/mL sont ajoutés à 900 µL d'eau distillée juste avant l'induction de la réaction acrosomique. Après 5 heures d'incubation, la progestérone est ajoutée dans 4µL d'eau distillée-DMSO pour chaque tube, dont un tube contrôle. Les échantillons sont incubés 10 minutes à 39°C puis 8µL de H258 (le colorant nucléaire Hoechst 33258) sont additionnés dans chaque tube. Ils sont de nouveau incubés pendant 5 minutes à 39°C avant de rajouter 400µL de paraformaldéhyde 2% pour fixer les membranes spermatiques. Les tubes sont alors placés dans le noir durant 8 minutes. Le sperme est ensuite prélevé et rincé pour supprimer le H258. Le sperme est perméabilisé avec 95% d'éthanol à -20°C et le contenu acrosomique est marqué avec le FITC-PSA (Fluorescein Isothiocyanate Conjugated - Pisum sativum agglutinine). La réaction acrosomique est évaluée sur les filtres montés sur des lames microscopiques et elle est notée en utilisant un microscope ajusté avec des optiques fluorescentes à fort grossissement (x625) [34].

La différence de fluorescence (bleue pour le H258 et verte pour le FITC-PSA) est utilisée pour évaluer le statut de l'acrosome et la viabilité de chaque spermatozoïde. Les spermatozoïdes viables avec une membrane plasmique intacte excluent le H258 et n'affichent pas de fluorescence bleue. Un spermatozoïde avec une vive fluorescence bleue au-dessus de la tête est considéré comme mort. Un spermatozoïde avec une vive fluorescence verte au-dessus de la région acrosomique est noté comme possédant un acrosome intact. Un spermatozoïde au contenu acrosomique absent ne montre pas de fluorescence au-dessus de la région acrosomique ou seulement une fine bande verte au-dessus de la région équatoriale de la tête : il est considéré comme « acrosome réactif » s'il est viable et comme « acrosome manquant » s'il est mort. Ainsi, quatre catégories d'acrosomes sont notées [34, figure 25] :

- acrosome intact, viable
- acrosome intact, mort
- acrosome réactif, mort
- acrosome manquant, mort

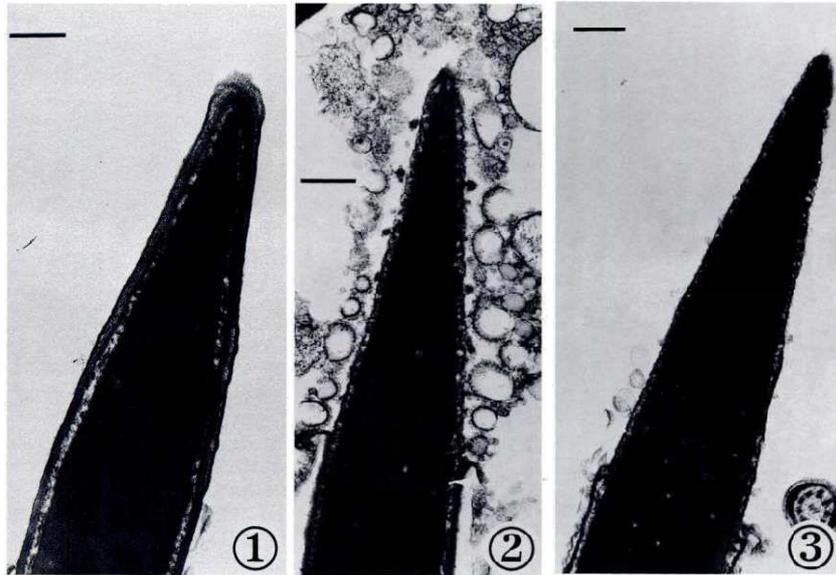


Figure 25 : images obtenues au microscope Leitz Ultralux des têtes spermatisques [34] :
 (1) spermatozoïde à l'acrosome intact suite à l'ajout de progestérone
 (2) spermatozoïde réalisant sa réaction acrosomique (acrosome actif : fusion et vésiculation de la membrane plasmique) 3 minutes après l'ajout de progestérone
 (3) spermatozoïde ayant terminé sa réaction acrosomique (acrosome manquant) 3 minutes après l'ajout de progestérone

Après avoir été formulé chez l'homme, ce classement a été validé chez l'étalon par Casey et al. [37] en utilisant la microscopie électronique à transmission pour évaluer l'ultrastructure des spermatozoïdes capacités avant et après la réaction acrosomique.

2.1.2 Résultats

Le pourcentage de réactions acrosomiques dans les échantillons témoins ne diffère pas entre les étalons fertiles et les subfertiles mais il est supérieur chez les étalons fertiles que chez les subfertiles après un traitement à la progestérone : ce pourcentage est équivalent entre les étalons subfertiles après un traitement à la progestérone et les étalons « témoins » [37].

Ces résultats montrent que la réaction acrosomique peut être induite sur des spermatozoïdes capacités par la présence de progestérone. Cette étude est la première à montrer une relation entre l'habilité à effectuer une réaction acrosomique et la fécondation in vivo dans l'espèce équine. Les problèmes de subfertilité non résolus pourraient donc avoir une étiologie moléculaire [34].

2.1.3 – Les récepteurs à progestérone

Une technique d'immunofluorescence indirecte employant des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs intracellulaires à progestérone humains (C-262) a permis de valider la présence de récepteurs à progestérone dans le sperme d'étalon [35]. Un nombre important de cellules viables montrent une affinité pour le C-262 au niveau de la membrane plasmique de l'acrosome dans la région de la tête du spermatozoïde. Inversement, la majorité des cellules détériorées présentent le marquage au niveau du cytosol de la région post-équatoriale de la tête. L'incubation avec du P-PSA-FITC conduit à une induction de la réaction acrosomique : après 5 heures d'incubation en milieu de capacitation, la semence est traitée avec de la progestérone (P), de l'isothiocyanate fluorescent (FITC) comme marqueurs des récepteurs et du PSA (*Pisum sativum* agglutinine), d'où la dénomination P-PSA-FITC [35, 36]. Un colorant supravital, l'éthidium homodimer, est ajouté. L'analyse par microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux montre une coloration vive de l'acrosome des spermatozoïdes ayant exposé leurs récepteurs à progestérone [35, 36].

L'incubation avec du P-PSA-FITC entraîne une induction de la réaction acrosomique uniquement lors d'incubation avec de la progestérone libre. Par conséquent, le couplage de la progestérone à ses récepteurs situés au niveau de la membrane plasmique apparaît comme étant une étape importante de l'induction de la réaction acrosomique [35].

A cet égard, le pourcentage de spermatozoïdes exposant des récepteurs de progestérone après la capacitation est fortement corrélé à la fertilité de l'étalon : plus la proportion de spermatozoïdes exposant des récepteurs à progestérone est importante, plus la proportion de spermatozoïdes pouvant s'attacher à la zone pellucide est grande, et donc plus la fertilité est élevée. L'exposition des récepteurs à progestérone est ainsi un paramètre potentiel de prédiction de la fertilité chez l'étalon [36].

2.2 – Induction de la réaction acrosomique à l'ionophore du calcium A23187

La perte de cholestérol de la membrane plasmique et la diminution résultante du rapport cholestérol/phospholipide est une étape précoce importante de la capacitation. La perméabilité de la membrane spermatique au calcium est alors augmentée ce qui provoque un

flux rapide de Ca^{2+} à l'intérieur du spermatozoïde, étape indispensable à la réaction acrosomique [38, 39, 40, 41].

Le test de réactivité acrosomique (ARA = Acrosomal Responsiveness Assay) permet de tester la fonctionnalité de l'acrosome spermatique, c'est-à-dire son habilité à réagir lors de l'application d'un puissant inducteur : le ionophore du calcium A23187 [38, 39, 40, 41].

2.2.1 - Technique

La semence est traitée avec du A23187, ou calcymicine, à 10 $\mu\text{mol/L}$ durant deux heures à 37°C. L'A23187 s'incorpore aux membranes biologiques et induit un influx de calcium extracellulaire dans les cellules. Une fixation dans du glutaraldéhyde 2% dans 0.1 mol/L de cacodylate tampon est ensuite réalisée avant de centrifuger l'échantillon 10 minutes à 800 x g à température ambiante. Les spermatozoïdes sont observés par microscope électronique à transmission afin de déterminer le statut acrosomique [38, 39, 40, 41]. Les extraits lipidiques sont obtenus par la méthode de Floch [42]. La teneur en cholestérol total et en phospholipides totaux de l'ensemble « spermatozoïdes et plasma séminal » est déterminée par informatique en utilisant des lecteurs Microplate® [39].

Cette technique d'analyse de la réaction acrosomique avec de l'ionophore de calcium a été réalisé avec diverses concentrations de A23187, à différentes températures d'incubation (22°C et 37°C), durant un temps d'incubation variable. La température a eu un effet plus important sur la réaction acrosomique que la concentration en A23187 : le pourcentage de spermatozoïdes est plus élevé lors d'une exposition de 2 heures à 37°C à l'A23187 (10 $\mu\text{mol/L}$) [40]. La durée d'exposition des spermatozoïdes à l'A23187 a également une influence sur le niveau de réaction acrosomique : les spermatozoïdes incubés durant 8 heures avec de l'A23187 ont un pourcentage de réaction acrosomique significativement supérieur à celui des spermatozoïdes incubés seulement pendant une heure [40].

2.2.2 – Résultats

Varner et al. [38] ont identifié un groupe d'étalons subfertiles dont la caractéristique des spermatozoïdes est d'avoir une diminution drastique de l'habilité à effectuer une réaction acrosomique lorsqu'ils sont exposés au A23187 durant 3 heures. Le taux moyen de réaction acrosomique était de 84% chez les étalons fertiles contre 6% chez les étalons subfertiles.

Une autre étude montre qu'après 2 heures d'incubation avec l'A23187, la proportion de réactions acrosomiques est très importante chez les étalons fertiles (96%) alors qu'elle est quasi inexistante chez les étalons à l'infertilité inexplicée (3%) [39]. Le rapport cholestérol/phospholipides est presque deux fois supérieur chez les étalons subfertiles que chez les étalons fertiles, ceci alors que les concentrations de cholestérol et de phospholipides prises indépendamment sont identiques chez les étalons fertiles et subfertiles. Il apparaît ainsi qu'une élévation du rapport cholestérol/phospholipides dans le sperme est associée à une altération de la réaction acrosomique. Des études ultérieures seront nécessaires pour élucider l'étiologie sous-jacente et déterminer des stratégies thérapeutiques appropriées [39].

En pratique, un vétérinaire ne peut actuellement s'adresser qu'à un laboratoire de recherche ayant l'habitude de réaliser ces deux types d'analyse pour faire un test d'induction de réaction acrosomique. En France, il n'existe à l'heure actuelle aucun laboratoire capable de réaliser ce test [4].

2.3 – Diversité des méthodes

2.3.1 – Coloration au bleu de Coomassie

Bien que la microscopie électronique à transmission reste un bon moyen pour détecter la réaction acrosomique des spermatozoïdes d'étalon [40], l'acrosome peut également être évalué par la microscopie à fond clair en utilisant le bleu de Coomassie comme colorant. Les spermatozoïdes sont fixés dans du paraformaldéhyde 4% puis colorés avec le bleu de Coomassie après avoir été étalés sur une lame en verre. Le pourcentage de spermatozoïdes avec un acrosome intact obtenu avec cette méthode est équivalent à celui obtenu avec la méthode de cytométrie en flux utilisant le marqueur FITC-PSA. La coloration au bleu de Coomassie est donc une méthode simple permettant d'évaluer l'état de l'acrosome chez les spermatozoïdes d'étalons [43].

2.3.2 – Fluorescence à la chlorotétracycline

Le test à la chlorotétracycline (CTC-FA) permet d'évaluer la capacitation et la réaction acrosomique, et a été décrit en 1984 chez des souris [40, 44, 45, 46].

Le fluorochrome chlortétracycline à 500 $\mu\text{mol/L}$ est dilué dans une solution tampon contenant du Tris à 20 $\mu\text{mol/L}$, du NaCl à 130 $\mu\text{mol/L}$ et de la cystéine à 5 $\mu\text{mol/L}$ à un pH de 7.8. La chlorotétracycline doit être fraîche du jour et conservée dans un container opaque à la lumière à 4°C : 5 μL de la solution spermatique est mélangé au volume équivalent de chlorotétracycline sur une lame de microscope et du glutaraldéhyde 0.1% est ajouté pour fixer les spermatozoïdes. Une lame est placée sur le mélange final et évaluée au grossissement x 400. Avant l'examen, les lames doivent être placées à température ambiante à l'abri de la lumière. Les spermatozoïdes sont classés en 5 catégories (CTC-I, CTC-II, CTC-III, CTC-IV, CTC-V) selon le type de fluorescence observée [40, tableau 5, figure 26].

classes	fluorescence	interprétation
CTC-I	Fluorescence sur la totalité de la tête, avec une ligne plus vive sur le segment équatorial	Spermatozoïde non capacité à l'acrosome intact
CTC-II	Fluorescence augmentée sur la zone de l'acrosome de la tête, avec un segment noir sans fluorescence en région post-acrosomique	Spermatozoïde capacité, pouvant subir la réaction acrosomique
CTC-III	Pas de fluorescence sur la tête, noir uniforme	Probablement spermatozoïde en cours de capacitation
CTC-IV	Fluorescence uniformément vive de la tête	
CTC-V	Fluorescence vive de la région post-acrosomique et absence de fluorescence de la tête	

Tableau 5 : classification des 5 catégories de spermatozoïdes présents lors de test à la chlorotétracycline [40]

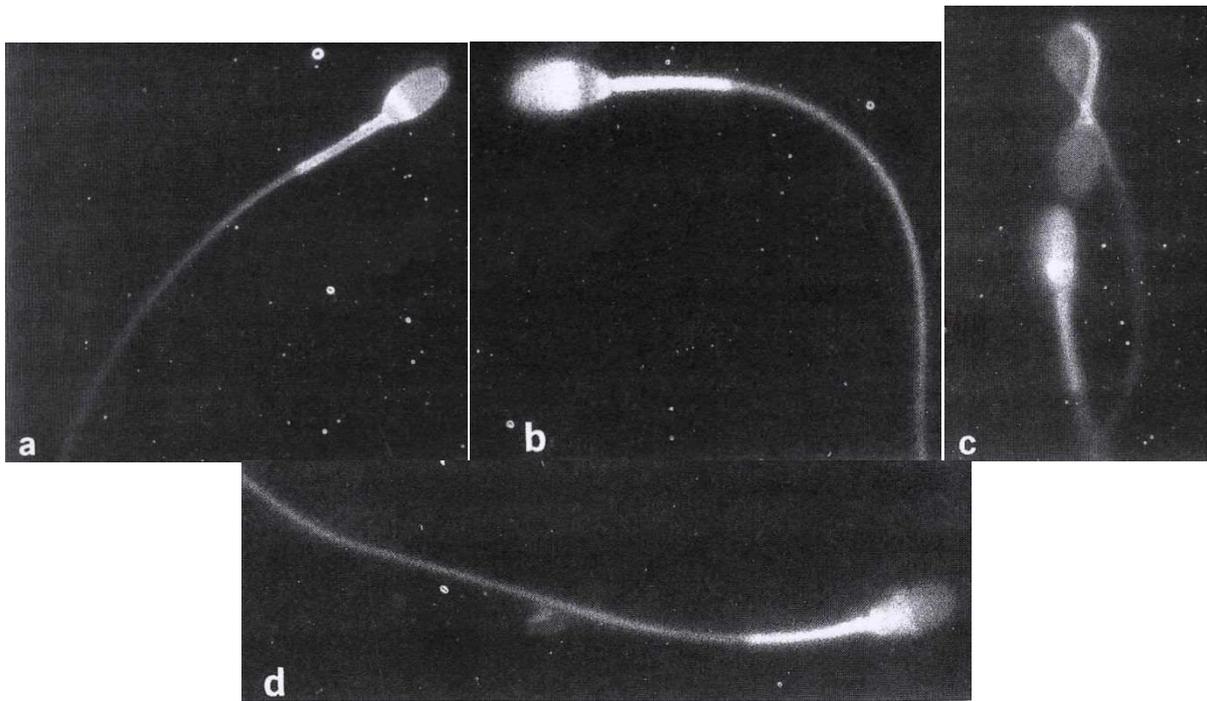


Figure 26 : spermatozoïdes observés au microscope x 100 suite à une coloration à la chlorotétracycline [40] : (a) = CTC-I ; (b) = CTC-II ; (c) = CTC-III et CTC-IV ; (d) = CTC-V

Cette méthode permet ainsi de situer le spermatozoïde par rapport à la capacitation, et donc d'évaluer son aptitude à réaliser la réaction acrosomique.

2.3.3 – Coloration à la mérocyanine 540

La mérocyanine 540 est un colorant fluorescent hydrophobe qui se fixe sur les membranes cellulaires et permet d'évaluer des éventuels désordres lipidiques lors de la capacitation [47]. Elle s'intercale entre les lipides en donnant une fluorescence d'autant plus intense que les lipides sont désordonnés, comme dans le cas de spermatozoïdes capités [45, 46]. Les mouvements lipidiques de la membrane lors de la capacitation peuvent ainsi être contrôlés [45, 46, 47].

Le test à la mérocyanine 540 détecte les modifications liées à la capacitation plus précocement que celui à la chlortétracycline, probablement car les changements détectés par la mérocyanine 540 précèdent l'influx de calcium dont dépend la détection à la chlortétracycline. Ainsi les tests à la mérocyanine 540 ou au FITC-PSA sont préférables à celui à la chlortétracycline car la cytométrie en flux est plus performante, plus rapide, plus objective et plus exacte que la microscopie par fluorescence [45].

2.3.4 – Détection des asymétries de la membrane spermatique par les fluorochromes Annexin V et Ro-09-0198

D'autres méthodes utilisant le fluorochrome conjugué Annexin V ou le Ro-09-0198, un fluorochrome conjuguant le streptavidin et le biotinylated, sont de plus en plus employées pour surveiller les asymétries de la membrane des spermatozoïdes humains. Ces deux colorants détectent respectivement des phospholipides présents dans la partie cytoplasmique de la bicouche lipidique des spermatozoïdes non capités : la phosphatidylsérine pour l'Annexin V et la phosphatidyléthanolamine pour le Ro-09-0198. L'exposition de ces phospholipides à la surface de la membrane traduit ainsi la réalisation d'une étape de la capacitation des spermatozoïdes [48, 49].

Après centrifugation, les spermatozoïdes isolés sont incubés dans un milieu basique (l'Hepes-buffered bicarbonate-free Tyrode ou HBT) durant 4 heures à 38°C avant d'être mis en présence de l'Annexin-V à 1µg/mL ou du Ro-09-0198 à 0.5µg/mL. Ces deux fluorochromes sont associés à de la fluorescéine isothiocyanate pendant 5 minutes à 38°C dans une atmosphère à 5% de CO₂, ainsi qu'avec du R-phycoerythrin peanut agglutinine (PRE-PNA) à 1µg/mL (pour discriminer les spermatozoïdes à acrosome intact de ceux détériorés) et avec du propidium iodide à 25nmol/L (pour différencier les cellules vivantes des cellules mortes) [48, 49].

Milieu HBT (ou Hepes-buffered bicarbonate-free Tyrode) [49]: bicarbonate + milieu de Tyrode (TALP) + solution tampon Hepes (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique)

L'analyse se fait ensuite par cytométrie en flux ou par microscopie confocale [48, 49]. La proportion de spermatozoïdes présentant les modifications membranaires lipidiques dues à la capacitation obtenue avec ces deux méthodes correspond à celle obtenue avec la coloration à la chlortétracycline. Le remaniement des phospholipides est limité à la membrane plasmique apicale de la tête du spermatozoïde [48].

Dans l'avenir, l'Annexin V et le Ro-09-0198 pourront éventuellement être utilisés sur de la semence d'étalon afin de vérifier sa capacité à réaliser la capacitation, et donc expliquer un problème de fertilité ne trouvant pas d'origine dans les tests de routine.

2.3.5 – Cytométrie en flux

La lecture par marquage fluorescent peut être réalisée par la microscopie optique ou par la cytométrie en flux afin de contrôler la réaction de l'acrosome et les dommages de l'acrosome [34, 41, 50]. La cytométrie en flux permet d'évaluer à la fois la viabilité cellulaire, l'intégrité de l'acrosome, la fonction mitochondriale, la capacité des spermatozoïdes à réaliser la capacitation et la réaction acrosomique, et l'intégrité de la chromatine. Par exemple, le mouvement de cholestérol de la membrane plasmique durant la capacitation, ainsi que d'autres modifications de cette membrane, entraînent une augmentation de la fluidité membranaire qui peut être mesurée par cytométrie en flux. Cette technique permet d'évaluer 50000 spermatozoïdes en moins d'une minute à un coût raisonnable [50].

3 – Evaluation de la fonction mitochondriale

Le spermatozoïde actif contient une grande quantité d'ATP (Adénosine TriPhosphate) formée au cours de la phosphorylation oxydative réalisée par les mitochondries au niveau de la pièce intermédiaire et par la glycolyse au niveau de la pièce principale [51, 52]. Lors d'une suspicion de déficit en source d'énergie responsable des mouvements du flagelle, l'analyse de la concentration en ATP totales est ainsi envisageable.

Les marqueurs fluorescents sélectifs des mitochondries sont abondants : la rhodamine 123 et le 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine (JC-1). Ce sont des cations lipophiles qui permettent de détecter une hétérogénéité membranaire au sein des mitochondries [53]. Par ailleurs les MitoTracker® comprennent un assortiment de marqueurs dont les caractéristiques spectrales et l'adaptabilité à la perméabilité et à la fixation diffèrent, de même que sa capacité de fixation selon le stade de respiration de la mitochondrie. Ces molécules diffusent à travers la membrane plasmique et s'accumulent dans les mitochondries. Ils ont été principalement développés chez l'homme, puis appliqués chez la souris et le sanglier mais pas encore chez l'étalon.

3.1 – La rhodamine 123

La rhodamine 123 émet une fluorescence verte (515 à 575 nm) qui s'accumule lorsque les mitochondries présentent un potentiel de membrane [54]. Après avoir été largement utilisée, elle est maintenant remplacée par d'autres marqueurs de part ses nombreux inconvénients : (1) le temps nécessaire pour obtenir un équilibre de distribution au sein de la membrane mitochondriale, (2) le degré de fixation non spécifique aux composants de la membrane, (3) les effets toxiques sur l'intégrité de la fonction mitochondriale, (4) la procédure d'échantillonnage, (5) l'instabilité à la lumière, et (6) la nécessité d'un grand nombre de matériels biologiques [55]. Elle permet de distinguer les cellules vivantes mais ne peut pas être utilisée pour différencier des mitochondries avec un fort ou un faible potentiel de membrane. En effet, elle ne présente qu'une seule population de cellules, marquées en vert [54].

3.2 – Le Mito Tracker®

Une partie des traceurs du MitoTracker® n'émettent pas de fluorescence jusqu'à l'oxydation. Ils permettent ainsi de facilement apprécier le stade de respiration de la mitochondrie [9]. Ce colorant donne une fluorescence verte au spermatozoïde lorsque ses mitochondries présentent un potentiel de membrane avec une émission à 516 nm [54].

3.3 – Le JC-1

Le marqueur JC-1 (J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1) permet d'évaluer le niveau d'énergie mitochondrial : la couleur des pics d'émission passe du vert (510-520 nm) au rouge-orange (590 nm) lorsque la polarisation de la membrane augmente. Ce phénomène traduit la formation réversible d'agrégats rouge-oranges lorsque le potentiel membranaire est élevé par rapport aux monomères verts lors de faible potentiel membranaire [9, 54, 56, 57]. Ainsi, il existe une corrélation significative entre le rapport [fluorescence orange /

fluorescence verte] et la valeur du potentiel membranaire [54, 55]. C'est le fluorochrome qui apporte le plus de rigueur dans l'estimation de la fonction mitochondriale [57].

Les spermatozoïdes mobiles montrent une forte coloration orange au niveau de la pièce intermédiaire, ce qui indique un potentiel de membrane des mitochondries élevé. A l'opposé, les spermatozoïdes immobiles, ayant un faible potentiel membranaire, présentent une coloration verte [57].

En comparant les trois colorants mitochondriaux, les spermatozoïdes marqués aux JC-1 ont la plus grande proportion de mitochondries marquée alors que ceux marqués avec le MitoTracker® présentent la plus faible. Par contre, les trois fluorochromes identifient des populations de spermatozoïdes qui sont significativement corrélées avec la mobilité estimée visuellement [54].

La fréquence des battements du flagelle semble dépendre de la concentration en ATP : une forte concentration d'ATP (environ 1000pmol/10⁶ spermatozoïdes) correspond à une fréquence élevée de battements de queue (20Hz) alors qu'une faible concentration d'ATP (environ 200pmol/10⁶ spermatozoïdes) correspond à une fréquence réduite de battements (moins de 1 Hz). Seule la concentration en ATP présente dans la pièce principale du flagelle est prise en compte pour prédire la mobilité puisqu'il n'a pas été prouvé que l'ATP présente dans la tête ou dans la pièce intermédiaire puisse être transportée jusqu'à la queue, et donc influencer les mouvements du flagelle [52].

Pour conclure, l'analyse de la fonction mitochondriale des spermatozoïdes par fluorescence à la JC-1 semble être une méthode fiable et prometteuse dans son application éventuelle à l'étalon.

4 – Evaluation de l'intégrité de la membrane plasmique

La membrane plasmique, composé de lipides, protéines et carbohydrates, crée une enveloppe semi-perméable autour du spermatozoïde et intervient dans la régulation des fonctions spermatiques de par la création d'un gradient ionique. De ce fait, l'évaluation de son intégrité semble être une composante importante de l'évaluation de la semence. Différentes procédures de laboratoire ont été développées pour tester cette intégrité [9].

4.1 – Le test de gonflement hypo-osmotique (HOST)

Le test de gonflement hypo-osmotique (hypo-osmotic swelling test = HOST) consiste à exposer le spermatozoïde à une solution hypoosmotique pour tester la fonction d'osmorégulation. Une membrane intacte doit en effet théoriquement permettre une entrée d'eau excessive dans le cytosol et résulter en un gonflement cytosolique. Lorsqu'un spermatozoïde fonctionnel est exposé à cette solution hypoosmotique, son cytosol va ainsi se gonfler pour rétablir l'équilibre osmotique, principalement au niveau de la queue. Inversement, le spermatozoïde incompetent dans son osmorégulation ne montre pas de changements visibles au niveau de son flagelle [9, 58].

Il s'agit d'une méthode simple et accessible qui peut être utilisée en complément des méthodes de routine pour l'analyse de la semence de l'étalon. Elle présente l'avantage d'être peu sensible aux chocs thermiques et de permettre une évaluation individuelle des spermatozoïdes [58].

4.2 – Diversité des colorants fluorescents

Une large gamme de colorants fluorescents auxquels la membrane plasmique est imperméable est disponible dans le commerce et peut être utilisée pour tester l'intégrité de la membrane plasmique par cytométrie en flux : des colorants d'ADN, le propidium-iodide (PI) [59], le biz-benzimide (Hoechst 33258), le YO-PRO®-1, le TOTO®-1, et l'éthidium homodimer-1. Par ailleurs, les spermatozoïdes peuvent également être lavés en présence de produits fluorescents pour lesquels la cellule est perméable et qui sont alors hydrolysés dans le cytosol en produits fluorescents auxquels la membrane est imperméable : la diacétate carboxyfluorescéine (CFDA) [58], la calcéine AM ou la dihydrocalcéine AM (hydrolysée par des estérases pour former la calcéine, laquelle, alternativement, forme des complexes fluorescents avec le calcium et d'autres métaux) et le SYBR® (désacétylé dans le cytosol avec des produits exprimant une forte fluorescence quand il se lie avec l'acide nucléique).

4.3 – La diacétate carboxyfluorescéine (CFDA)

Cette méthode est basée sur l'hydrolyse dans la cellule de la diacétate carboxyfluorescéine par des estérases cytosoliques non spécifiques produisant de la carboxyfluorescéine libre, laquelle est retenue lorsque la membrane plasmique est intacte. L'observation se fait au microscope à épifluorescence au grossissement x 400 : les spermatozoïdes présentant une fluorescence verte dans l'ensemble de la cellule possèdent une membrane intacte [58]. Etant donné que le principe de cette méthode repose sur une réaction enzymatique, le temps a une importance considérable car la fluorescence va continuer d'augmenter avec le temps [59].

4.4 – Le propidium iodide (PI)

Le propidium iodide pénètre au niveau de la tête du spermatozoïde dans les cellules présentant des dommages membranaires pour se lier à l'ADN [58, 59]. L'observation se fait au microscope à épifluorescence au grossissement x 400 : les spermatozoïdes dont la tête présente une fluorescence rouge sont considérés comme ayant une membrane endommagée [58].

4.5 – Le SYBR-14

Le SYBR-14 est un colorant nucléaire perméable à la membrane qui pénètre au niveau de la tête, forme un complexe avec l'ADN et provoque une fluorescence verte au niveau des noyaux des cellules vivantes [59, 60]. Il. L'avantage de ce colorant est qu'il ne repose pas sur un système enzymatique et qu'il n'est donc pas dépendant du temps. Son absorption maximale a lieu à 488 nm et son émission est visible à la lumière à 518 nm [60].

4.6 – Double coloration PI/SYBR-14

Il est possible de combiner un colorant de « membrane perméable » avec un colorant de « membrane imperméable » afin de rendre compte de l'intégrité de la membrane. Par exemple, un mélange de SYBR-14 et de propidium-iodide utilisé sur des spermatozoïdes de différentes espèces de mammifères produit trois populations de spermatozoïdes selon la couleur : (1) membrane intacte lorsque les cellules sont vertes, c'est-à-dire colorées avec le SYBR-14, donc spermatozoïdes viables ; (2) membrane endommagée lorsque les cellules sont rouges, c'est-à-dire colorées avec le propidium-iodide, donc spermatozoïdes morts, et (3) membrane en cours de dégradation lors de double coloration, donc spermatozoïdes mourants. La coloration au SYBR-14 est ainsi progressivement remplacée par la coloration au PI lorsque les spermatozoïdes perdent de leur viabilité : ce dernier perd en effet sa capacité de résister à l'afflux de colorant auquel la membrane est imperméable (comme le PI) d'abord au niveau de la région postérieure de la tête [59, 61]. En utilisant cette méthode, une forte corrélation a été montrée chez l'étalon entre le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et le pourcentage de spermatozoïdes présentant une membrane intacte [62].

Ainsi, certains colorants fluorescents de la membrane plasmique peuvent être combinés avec des colorants des mitochondries [62] ou avec des colorants de l'acrosome [63, 64] afin de donner un diagnostic plus minutieux au niveau de la compartimentation.

4.7 – Triple coloration PI/SYBR-14/JC-1

Des triples colorations de spermatozoïdes ont été décrites chez l'étalon afin de tester simultanément plusieurs compartiments du spermatozoïde. L'association propidium-iodide/SYBR-14/JC-1 distingue ainsi quatre populations de spermatozoïdes : (1) spermatozoïdes présumés viables, avec une coloration verte de la tête et de la pièce intermédiaire (formation de monomères avec le JC-1) ; (2) spermatozoïdes non viables présentant uniquement la fluorescence PI ; (3) spermatozoïdes viables, avec la coloration verte de la tête et orange de la pièce intermédiaire (formation d'agrégats avec le JC-1) ; (4) ensemble des spermatozoïdes restants, qui n'entrent pas dans les critères des autres populations. La population 1 est fortement corrélée à la mobilité totale alors que la population

3 l'est nettement moins. La population 2 augmente lorsque le pourcentage de spermatozoïdes morts augmente. Cette étude révèle donc une forte corrélation entre l'intégrité de la membrane spermatique et la mobilité. De plus, la corrélation entre les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes et les mesures de fluorescence est supérieure lors de triple coloration PI/SYRBCE/JC-1 que lors d'une double coloration SYRBCE/PI. L'ajout de JC-1 permet donc de faciliter l'identification des différences de mouvement [62].

4.8 – Triple coloration PI/FITC-PNA/carboxy-SNARF-1

L'utilisation d'une triple coloration PI (propidium-iodide) / FITC-PSA (un marqueur de l'acrosome) / carboxy-SNARF-1 (un indicateur du pH intracellulaire) chez l'étalon fait apparaître deux populations de spermatozoïdes : (1) spermatozoïdes vivants, SNARF positifs ; (2) spermatozoïdes morts, PI positifs. Au sein de la population 1, deux sous-populations sont mises en évidence : (1') les spermatozoïdes vivants à l'acrosome intact, SNARF positifs / FITC-PSA négatifs ; et (1'') les spermatozoïdes vivants à l'acrosome endommagé, SNARF positifs / FITC-PSA positifs. Cette triple coloration apporte une méthode précise pour l'évaluation de la viabilité spermatique et estime en même temps l'intégrité de l'acrosome [63].

4.9 – Cytométrie en flux

Les avantages de la cytométrie en flux est de permettre l'étude d'une large population de cellules (des milliers) en un laps de temps réduit (moins d'une minute) avec peu de préparation, contrairement à la microscopie qui n'évalue que 100 à 200 cellules par échantillon de par la grande perte en spermatozoïdes au cours des longues procédures de préparation. De plus, c'est une méthode objective, précise et exacte permettant d'évaluer plusieurs caractéristiques des spermatozoïdes simultanément [50, 57, 59, 63, 65].

4.10 – Lecteur de microplates

L'utilisation de lecteurs de microplates à fluorescence est rapportée avec la coloration à JC-1. Cet instrument peut évaluer l'intensité relative de la fluorescence en quantifiant de manière objective et exacte la fluorescence à des longueurs d'ondes précises. Le pourcentage de spermatozoïdes dont les mitochondries présentent un fort potentiel membranaire obtenu avec cette méthode est identique à celui obtenu par la cytométrie en flux [66].

4.11 – Conclusion

Tous ces tests d'évaluation de l'intégrité de la membrane plasmique ont un intérêt dans l'évaluation de la semence de l'étalon. Ils pourraient être utilisés en complément des tests de routine. Mais ils ne sont pas employés à l'heure actuelle car leur interprétation reste floue. Par exemple, l'humidité a un impact sur la perméabilité cellulaire vis-à-vis de l'éosine Y ; elle entraîne donc un biais lors d'interprétation des résultats d'une coloration à l'éosine Y [8].

V – Marqueurs biochimiques potentiels

L'identification de marqueurs biochimiques des fonctions du spermatozoïde ont été développée dans plusieurs espèces (homme [67, 69, 71, 74, 78, 79, 80, 92, 101, 111, 112, 115], le taureau [73, 89, 112], sanglier [82, 87, 88, 90, 109, 110], rat [93, 97, et 16]) pourraient avoir des applications comme outil diagnostique chez l'étalon [68, 70, 72, 75, 76, 77, 81, 83, 85, 86, 91, 94, 105, 106, 107, 108, 114, 117, 119].

1 – Marqueurs testant l'intégrité de l'acrosome et la réaction acrosomique

1.1 – Activité de l'acrosine amidase

L'acrosine est une sérine protéinase spécifique de l'acrosome des spermatozoïdes de mammifères. Elle joue un rôle important dans la réaction acrosomique, dans la fusion spermatozoïde-ovocyte et dans la pénétration du spermatozoïde. Cette enzyme est présente sous une forme immature, la proacrosine, qui est activée durant la réaction acrosomique. Son activité peut être quantifiée par la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), c'est-à-dire par un dosage radioimmunologique, ou par l'utilisation de film de gélatine. Cependant ces méthodes sont complexes et longues, d'où le développement d'une méthode plus rapide par hydrolyse d'un substrat de l'arginine amide [67] : un détergent (le N-benzoyl-DL'-arginine para-nitroanilide-HCl ou BAPNA) libère les enzymes acrosomiques à pH basique afin d'activer la proacrosine en acrosine qui par la suite hydrolyse le BAPNA en un produit chromogénique. Les spermatozoïdes sont extraits du plasma séminal par centrifugation et incubés à température ambiante durant trois heures dans le noir dans une préparation de substrat détergent (BAPNA dans du TritonX-100 à pH=8.0) afin de faciliter les remaniements de l'acrosome et libérer les enzymes acrosomiques. Du benzimide est ensuite ajouté pour stopper la réaction et les échantillons sont centrifugés pour isoler les spermatozoïdes. L'activité de l'acrosine amidase est déterminée par spectrophotométrie à une absorbance de 410 nm. Cette activité a une relation linéaire avec le nombre total de

spermatozoïdes et est fortement influencée par la qualité de l'éjaculat de l'étalon. L'ajout d'un dilueur à la semence de même que le retrait du plasma séminal par centrifugation permettent d'augmenter l'activité de l'acridine [68].

Ce test présente une bonne répétabilité [67]. D'autres études sur le sperme humain tendent à démontrer que les mesures d'activité de l'acridine permettent d'identifier des populations d'hommes infertiles ou subfertiles qui ne sont pas détectées par les méthodes de routine [67].

Par ailleurs, un test modifié de l'activité de l'amidase plus rapide et nécessitant une quantité moindre de sperme a été mis en place. Il repose sur l'utilisation d'une microplaque qui lit les mesures et calcule la différence d'absorbance de 96 échantillons en une minute. Des outils informatisés de capture et de calcul sont alors utilisés pour réaliser la manipulation des données. Il n'y a pas nécessité de réaliser une centrifugation. Les résultats obtenus avec ce nouveau protocole ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec le test de base [69].

La détermination de l'activité de l'acrosine amidase dans les spermatozoïdes d'étalon pourrait fournir une méthode alternative pour tester la fonction spermatique in vitro [68]. Les futurs tests devront prouver la relation entre l'activité de l'amidase et la fertilité chez l'étalon.

1.2 – protéine SNARE

Les protéines SNARE (SNAP receptors) (SNAP = soluble NFS attachment proteins) sont des protéines transmembranaires localisées de part et d'autre des membranes. Elles interviennent dans le mécanisme de fusion de deux cellules, dont la fécondation : les protéines SNARE de chaque cellule se reconnaissent et s'associent pour former un « complexe SNARE ». Ces protéines sont particulièrement présentes sur l'acrosome de nombreuses espèces de mammifères et interviennent dans la réaction acrosomique. Des analyses immunocytochimiques de sperme d'étalon révèlent que différentes familles de protéines SNARE sont présentes sur l'acrosome, notamment à l'apex de l'acrosome et au niveau du segment équatorial [70] : les SNARE cibles (t-SNARE) comme la syntaxine, les SNARE vésiculaires (v-SNARE) comme la synaptobrevine (ou VAMP), la N-éthyl-maléimide sensitive factor (NSF) ATPase, et les détecteurs de calcium comme la synaptotagmine.

La cavéoline-1 est une protéine de fixation du cholestérol qui est responsable de la morphologie et de l'organisation des caveolae. Les caveolae sont des microdomaines de la membrane plasmique impliqués dans la régulation des mécanismes de signalisation et ayant une fonction d'endocytose et d'internalisation du cholestérol [70, 71].

Les étalons subfertiles produisent des spermatozoïdes qui possèdent une quantité moindre de protéines SNARE et de cavéoline-1 avec une quantité de cellules présentant une coloration pour les NSF, synaptotagmines et cavéolines-1 plus faibles [70].

2 – Marqueurs testant la capacitation

2.1 – Protéines fixant l'héparine

Les protéines présentes dans le plasma séminal sont des protéines sécrétoires provenant essentiellement de l'épididyme et des glandes sexuelles accessoires. Elles sont impliquées dans le remodelage de la surface du spermatozoïde durant son transit dans le tractus génital mâle et après l'éjaculation. Durant cette « maturation post-testiculaire », le spermatozoïde acquiert l'habileté de fertiliser l'ovocyte. Elles contribuent également aux étapes initiales et intermédiaires de la fertilisation : formation du réservoir de spermatozoïdes dans l'oviducte, modulation de la capacitation et interaction des gamètes. Elles appartiennent à trois classes de protéines [72] :

- les protéines de type Fn-2 impliquées dans la modulation de la capacitation et des propriétés de la membrane plasmique. Elles ont également une capacité de fixation de l'héparine, or des études chez le taureau ont montré une meilleure fertilité lorsque les spermatozoïdes présentent des protéines fixant l'héparine [73].
- les protéines sécrétoires riches en cystéine (CRISP ou cysteine-rich secretory proteins) impliquées dans différentes fonctions durant la fusion spermatozoïde-ovocyte, la fonction de défense de l'hôte et le blocage des ions [72].
- les spermadhésines dont le rôle est encore difficile à établir chez l'étalon [72].

2.2 – Protéines d'activité de la phosphorylation

La phosphorylation de la protéine tyrosine du spermatozoïde est associée à la capacitation, aux changements de mobilité, à la fusion spermatozoïde-ovocyte et à la capacité de fertiliser. Lors d'asthénozoospermie (baisse de la mobilité des spermatozoïdes) les spermatozoïdes d'étalon sont incapables d'accroître la phosphorylation de la protéine tyrosine durant la capacitation. L'incubation de ces spermatozoïdes avec un analogue de l'AMPc (Adénisine MonoPhosphate cyclique) permet d'inverser ce phénomène ce qui implique une possible déficience au niveau de la membrane plasmique.

Ainsi, lors d'asthénozoospermie les spermatozoïdes présentent une faible mobilité, une incapacité à réaliser la capacitation et à développer une hyperactivation, suite à une altération de la phosphorylation de la tyrosine causée par une diminution de la fluidité membranaire [74].

2.3 – Anion superoxyde

Les radicaux libres (ROS=Réactive Oxygen Species) sont générés par le spermatozoïde en faible quantité dans certaines conditions physiologique indispensables à la fécondation telles que la capacitation, l'exocytose acrosomique et la fusion spermatozoïde-ovocyte. Ainsi, un faible niveau de production de l'anion superoxyde est un indicateur important des fonctions spermatiques telles que la capacitation. Toutefois, une production excessive d'anion superoxyde peut également détériorer la fonction spermatique (diminution de la mobilité, atteinte des membranes spermatiques ou de la chromatine). Ainsi, l'estimation de la quantité de radicaux libres dans un spermatozoïde peut être une méthode pour comprendre la physiologie et la pathologie de la fonction spermatique [75].

L'anion superoxyde est un des principaux radicaux libres formés par le spermatozoïde. L'utilisation du dihydroéthidium (DHE) comme marqueur de l'anion superoxyde dans les spermatozoïdes de chevaux a été envisagée [75].

Après centrifugation de l'éjaculat, les spermatozoïdes sont placés en présence de DHE et de calcéïne-acétométhylester (CAM) :

- les cellules sont incubées avec de la xanthine-xanthine oxydase (pour générer une production d'anion superoxyde) avec ou non l'ajout de superoxyde dismutase (SOD) : la fluorescence du DHE déterminée par la cytométrie en flux, augmente lors d'incubation avec la xanthine-xanthine oxydase mais est freinée par la SOD. Le DHE est donc spécifique à la détection d'anion superoxyde.
- les spermatozoïdes sont ensuite incubés 15 minutes avec du DHE/CAM, traité avec de l'ionophore du calcium A23187. La fluorescence de l'ionophore du calcium augmente de manière dose-dépendante la production d'anions superoxydes.
- les cellules sont par la suite incubées 15 minutes avec du DHE/CAM traité avec du NADPH avec ou sans Triton X. Ces cellules n'ont pas montré un niveau d'expression d'anions superoxydes différent des cellules témoins.
- les spermatozoïdes sont enfin incubés avec du DHE/CMA dans les conditions de capacitation. La quantité d'anions superoxydes est alors plus importante.

Par conséquent, le DHE peut être utilisé comme marqueur de l'anion superoxyde dans les spermatozoïdes d'étalons. Une élévation intracellulaire du taux de calcium ou de la capacitation est associée, in vitro, à une augmentation de l'anion superoxyde. L'application de cette technique pourrait faciliter les études sur les spermatozoïdes de chevaux en déterminant le niveau de radicaux libres présents dans un spermatozoïde [75].

3 – Marqueurs de l'apoptose : les caspases

L'apoptose est un mécanisme physiologique de mort programmée des cellules, contrôlé par des molécules, des facteurs exocrines et des facteurs physiques. Ce phénomène est bien connu pour les cellules somatiques mais l'est moins pour les cellules germinales.

Les caspases (cystéinyl aspartate-specific protéinases) sont des protéases à cystéine qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose, de nécrose et d'inflammation. Elles sont présentes sous forme inactive, les procaspases, et sont activées en caspases à la suite d'un clivage, ou éventuellement d'une dimérisation. La caspase-3 est considérée comme la principale exécutrice de l'apoptose [76, 77, 78].

L'apoptose d'un spermatozoïde équin, caspase-dépendent, peut être causée par un choc thermique au niveau de la tête du spermatozoïde et par le résultat de l'externalisation de phosphatidylsérine de la membrane plasmique [76] : un choc thermique à 45°C au niveau de la tête d'un spermatozoïde conduit à une fragmentation de l'ADN chez plus de 80% des cellules avec une externalisation de la phosphodiesterase et une augmentation de l'activité de la caspase. Cette activité est localisée dans la pièce intermédiaire mais semble aussi être transloquée dans le noyau, causant la fragmentation de l'ADN.

Brum et al. [77] ont répertorié des marqueurs de l'apoptose dans les spermatozoïdes d'étalon avant et après cryopréservation. L'activation de la caspase a été testée par incorporation de FITC-VAD-FMK, un marqueur fluorescent permettant de visualiser la caspase-3 par microscopie confocale, et la fragmentation de l'ADN testée par le test TUNEL. Les populations de spermatozoïdes à faible mobilité ont eu des valeurs d'activation de la caspase et de fragmentation d'ADN significativement différentes de celles de spermatozoïdes à mobilité normale. De plus, l'activation de la caspase est augmentée après cryopreservation. Cette étude confirme le fait que la fragmentation de l'ADN, et donc l'apoptose, dépendent des caspases. L'évaluation des caspases peut donc servir de marqueur de l'apoptose et expliquer ainsi un éventuel dysfonctionnement de la fonction spermatique [77].

4 – Marqueurs testant la chromatine : la chromomycine A3

De nombreux fluorochromes peuvent être utilisés pour évaluer la chromatine des spermatozoïdes de mammifères comme l'aniline bleue, le méthyle vert, le Giemsa, l'acridine orange ou la chromomycine A3. La chromomycine A3, fluorochrome spécifique des séquences d'ADN riches en guanine-cytosine, met en évidence des erreurs d'ADN spermatique. Chez l'homme, un fort pourcentage de chromomycine A3 est présent dans certaines formes d'infertilité masculine. Ce test pourrait donc devenir un outil diagnostique utile d'infertilité sans atteinte de la morphologie spermatique [79]. La coloration de la chromatine à l'aniline acide bleue (AAB) est inversement corrélée à la morphologie normale des spermatozoïdes. Les résultats obtenus avec la chromomycine A3 sont meilleurs qu'avec l'aniline acide bleue [80].

5 – Marqueurs testant la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes : la lactate déshydrogénase

Le plasma séminal a de nombreuses fonctions : l'activation des spermatozoïdes immobiles, une action bactéricide, la neutralisation des métabolites du sperme, la nutrition du sperme éjaculé dans le tractus de la femelle, la protection des épithéliums, la lutte du sperme contre l'acrosine grâce à des inhibiteurs des protéinases. De plus, le plasma séminal est important pour la capacitation et l'immunosuppression [81, 82].

Pesch et al. [81] ont étudié chez l'étalon la corrélation entre la concentration en spermatozoïdes et la présence de fer, de zinc et des enzymes du plasma séminal (l'aspartate-amino-transférase ou AST, la γ -glutamyl-transférase ou GGT, l'alkaline phosphatase ou AIP, l'acide phosphatase ou AcP et la lactate déshydrogénase ou LDH). Le plasma séminal a été isolé par double centrifugation à 1000xg durant 10 minutes et les méthodes utilisées sont indiquées dans le tableau 5.

Enzyme / Métal	Méthode
AST	Photométrie par UV
GGT	Test de cinétique des couleurs
AIP	Méthode standard optimisée
AcP	Test de l'humanzym M-couleur
LDH	Méthode standard optimisée (test UV à 340nm)
Fe	Photométrie de flamme
Zn	Photométrie de flamme

Tableau 6 : méthodes utilisées lors d'analyse du fer, du zinc et des enzymes du plasma séminal [81]

Une corrélation positive a été trouvée entre la concentration spermatique et aussi bien le fer, le zinc que les enzymes étudiées d'où une probable origine testiculaire et épидидymale de ces éléments. L'activité de la LDH a été significativement corrélée à la mobilité totale et à la mobilité progressive, au rapport spermatozoïdes vivants/morts et à la pathomorphologie. Ceci est un signe que la LDH extracellulaire garantit le métabolisme du spermatozoïde, peut-être lors de conditions anaérobiques. La LDH semble être l'enzyme la plus prédictive de la qualité de la semence de l'étalon [81].

6 – Marqueurs testant l'activation de l'ovocyte : la phospholipase C

La fécondation est caractérisée par une augmentation de la concentration en ions calcium Ca^{2+} dans le cytosol suite à la production d'inositol triphosphate [84]. Le calcium est responsable de l'activation de l'ovocyte et de l'initiation du développement embryonnaire. Chez les mammifères, les oscillations de la concentration en Ca^{2+} [Ca^{2+}] sont exposées à une fréquence et à une persistance spécifiques de chaque espèce. Un facteur spermatique, nommé SF (Steroidogenic Factor), pourrait être l'inducteur des oscillations de [Ca^{2+}] après son introduction dans l'ovocyte. Son composant actif pourrait être la phospholipase C₂ qui est une phospholipase spécifique du spermatozoïde certainement responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate en inositol triphosphate [83, 84]. Une injection d'ADNc codant pour la phospholipase C₂ déclenche une série d'oscillations de Ca^{2+} prolongées dans des œufs de souris dont l'amplitude est proportionnelle à la quantité de phospholipase C₂ injectée [84, figure 27].

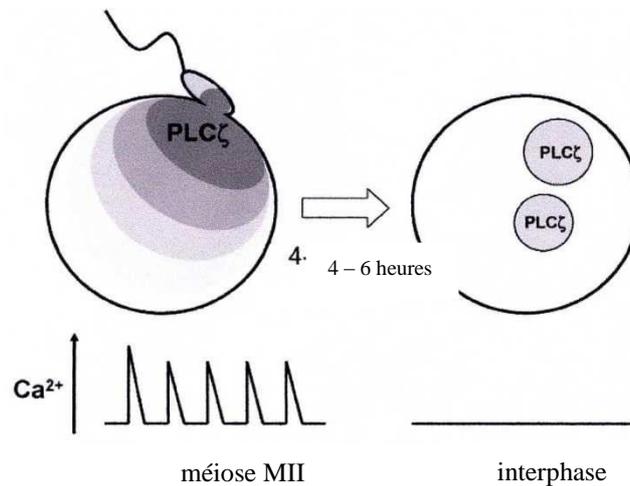


Figure 27 : diagramme schématique de la localisation de la phospholipase C_ζ lors de la fécondation [84]. Lors de la fusion des gamètes, la phospholipase C_ζ est libérée de la tête du spermatozoïde. Elle diffuse alors dans le cytoplasme de l'ovocyte, entraînant une série d'oscillations de calcium. Ces dernières sont perçues lors de la métaphase de la deuxième division de méiose et cessent lorsque l'ovocyte entre en interphase et le zygote forme deux pronuclei séquestrant chacun une phospholipase

Gradil et al. [83] ont montré que grâce à l'utilisation de Westernblot et de deux types d'anticorps anti-phospholipase C_ζ de souris la quantité de phospholipase C_ζ est plus faible chez les étalons subfertiles que chez les étalons fertiles. La phospholipase C_ζ étant par ailleurs exprimée après la méiose, une diminution de son expression pourrait être le signe d'un défaut global de l'expression des gènes du spermatozoïde.

7 – Marqueurs testant les dommages oxydatifs

7.1 – C₁₂BODIPY ^(581/591)

De nombreuses études suggèrent que la peroxydation des lipides membranaires est une cause majeure de dysfonctionnement spermatique. La sensibilité des spermatozoïdes aux dommages oxydatifs réside en la forte concentration de graisses insaturées dans les membranes phospholipidiques, la faible quantité d'antioxydants présents dans le spermatozoïde et l'habilité des spermatozoïdes à générer des radicaux libres [86]. Neild et al. [85] ont étudié le stress oxydatif au niveau des membranes spermatiques de l'étalon durant un

stress oxydatif à l'aide d'un traceur fluorescent de la membrane : le C11-Bodipy-fatty acide (4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoïque acide ou C₁₁-BODIPY^(581/591)). L'analyse par cytométrie en flux montre une fluorescence rouge (540 nm) lorsque la membrane est intacte et verte après peroxydation (520 nm) [85, 87, 88].

La semence est décongelée dans un bain-marie à 37°C pendant 30 secondes. Le plasma séminal est alors éliminé par centrifugation. Les spermatozoïdes à la concentration de 100 à 200 x 10⁶ par mL sont mis en suspension dans un milieu de Tyrodes contenant du bicarbonate et du C₁₁BODIPY^(581/591). Le stress oxydatif est appliqué avec différentes concentrations de tert-butylhydrogène peroxyde comme oxydant. Le degré de peroxydation des lipides est examiné après une nuit d'incubation à 38°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂[85, 86, 88, 89].

La peroxydation du C₁₁BODIPY^(581/591) s'observe surtout au niveau de la pièce intermédiaire du spermatozoïde [85, 88, 89] ce qui est en contradiction avec le fait que les membranes les plus sensibles au stress oxydatif soient situées au niveau de la tête du spermatozoïde. Le niveau de peroxydation augmente significativement avec la concentration de l'oxydant. Celle-ci doit être conséquente pour induire ce phénomène de peroxydation, ce qui indique que le spermatozoïde équin est relativement résistant à l'oxydation. La « congélation-décongélation » diminue la résistance du sperme au stress oxydatif [85]. Cette constatation est confirmée dans une étude sur les spermatozoïdes de sanglier [87].

Le C₁₁BODIPY^(581/591) a aussi été utilisé pour comparer la capacité du α -tocophérol et celle de son ester, le α -tocophérol succinate, à prévenir la peroxydation et à maintenir la mobilité des spermatozoïdes équins. L'ester est apparu plus efficace [86].

Le traceur de membranes C₁₁-BODIPY^(581/591) est donc un outil intéressant pour contrôler le niveau d'oxydation des membranes lipidiques du spermatozoïde d'étalon [85, 86, 87, 88, 89].

7.2 – Malondialdéhyde

Le processus de peroxydation des lipides entraîne la formation de malondialdéhyde (MDA), produit de dégradation des lipides polyinsaturés et donc marqueur du stress oxydatif. Des études reposant sur une évaluation fluorométrique directe ont adapté la réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA) pour mesurer le MDA dans la semence de l'étalon [90, 91]. Le problème est que durant les tests de laboratoire, d'autres composants aux mêmes caractéristiques spectrales que le MDA ressortent. Pour y pallier, une chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été proposée pour séparer le complexe TBA-MDA des composants interférants et des autres substances TBA réactives (TBARS) [91].

Après collecte, la semence est centrifugée pour éliminer le plasma séminal puis remis en suspension pour obtenir une concentration de 80 à 250 x 10⁶ spermatozoïdes par mL [91]. Ensuite les spermatozoïdes dilués sont mixés avec du thichloroacétique acide pour précipiter les protéines lors d'une centrifugation de 1500 x g durant 10 minutes. Puis 1 mL du surnageant est incubé avec 1 mL de TBA à 0.67% dans un bain d'eau bouillant à 100°C pendant 10 minutes. Après réfrigération, l'absorbance est déterminée [90]. La peroxydation est donc évaluée par utilisation de la réaction du TBA pour évaluer le MAD par fluorométrie (λ_{ex} 532 nm ; λ_{em} 550 nm) avec ou sans séparation HPLC préalable [91].

La production de MDA est proportionnelle à la concentration spermatique, que ce soit par fluorométrie ou par HPLC. Il existe d'ailleurs une forte corrélation entre ces deux méthodes. Les sucres et les protéines présents dans les dilueurs de semence peuvent produire du MDA et donc interférer avec le test MDA-TBA. L'utilisation de HPLC pour doser le MDA ne fournit cependant pas un intérêt supplémentaire pour pallier à ce problème. Il est donc nécessaire de bien laver les spermatozoïdes de leur dilueurs avant une évaluation du MDA [89, 91].

Pour conclure, la fluorométrie est une méthode rapide et efficace pour déterminer les substances TBA réactives (TBARS), et une séparation chromatographique préalable n'améliore pas la spécificité. De plus, les dilueurs induisent des artéfacts dans l'évaluation de la peroxydation des lipides par détection de MDA [91]. L'évaluation de la quantité de MAD par fluorométrie permet donc de rendre compte du stress oxydatif que les spermatozoïdes ont subi et d'expliquer une éventuelle sub-fertilité non diagnostiquée par les tests

classiques [90, 91, 92, 93]. A noter que l'utilisation de C₁₂BODIPY^(581/591) reste une méthode plus efficace [89].

7.3 – Glutathione peroxydase

La phospholipide hydroperoxyde glutathione peroxydase (PHGPx) est une sélénoprotéine qui protège les biomembranes des dommages oxydatifs et constitue la principale source de sélénium des testicules de mammifères. Il existe au moins trois formes différentes de cette protéine : cytosolique, mitochondriale, et nucléaire. Durant la dernière étape de la spermatogenèse, une réduction du peroxyde d'hydrogène par la PHGPx est couplée d'une oxydation des protéines sulfhydriles et de la formation de ponts entre deux chaînes polymères (cross-link). L'oxydation des protéines thiol, catalysée par la PHGPx, est fonction de la stabilité de la protéine structurale spermatique et de la condensation du noyau. Cependant, cette activité enzymatique est infime dans le spermatozoïde mature où la PHGPx est transformée en une protéine oxydativement inactive qui acquiert une fonction uniquement structurale, constituant le composant majeur de la capsule mitochondriale. Cela a permis de suggérer une nouvelle approche pour comprendre la dépendance du sélénium dans la fertilité masculine [94]. En effet, l'infertilité chez des animaux déficients en sélénium, caractérisée par une mobilité spermatique affaiblie et une altération de la morphologie des pièces intermédiaires, est considérée comme le résultat d'un manque de PGHPx [95].

Les éjaculats sont dilués avec du PBS et centrifugés à 600 x g. La partie contenant les spermatozoïdes est lavée et stockée à -20°C pendant une semaine. La solution est ensuite remise en suspension pour atteindre une concentration en protéine de 0,5 mg/mL avant de subir plusieurs purifications. L'activité enzymatique de la PHGPx est déterminée par spectrophotométrie à température ambiante avec une mesure de l'absorbance à 340 nm.

La première étude, datant de 2006, sur l'activité du PHGPx dans la semence de l'étalon n'a montré aucune relation entre les caractéristiques séminales et l'activité de la PHGPx mais le nombre de sujets était trop réduit [94]. D'autres études ont montré qu'une teneur diminuée en PHGPx est présente chez des hommes et des taureaux infertiles et qu'il existe une corrélation positive entre l'activité de la PGHPx, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes [95]. Chez l'homme et le taureau, la PGHPx semble donc indispensable à

l'intégrité structurale des spermatozoïdes et à la mobilité spermatique. La PGHPx peut donc être considérée comme utile pour la mesure des capacités de fécondation [10].

7.4 – Réactifs oxygènes

Comme abordés précédemment dans la partie traitant de l'anion superoxyde, les radicaux libres sont générés de façon physiologique par les spermatozoïdes. L'anion superoxyde peut subir rapidement une dismutation spontanée ou subir une réaction par l'action de la superoxyde dismutase pour donner le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 est considéré comme plus toxique que O_2^- car plus stable et traversant plus facilement les membranes plasmique. L' H_2O_2 est le principal radical libre responsable des dommages oxydatifs des spermatozoïdes. Dans les spermatozoïdes humains, la réduction par le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) entraîne la formation de O_2^- [96, 97, 98, 99, 100].

Les spermatozoïdes sont séparés du plasma séminal puis mis en suspension dans un milieu de Tyrode modifié (milieu de Tyrode + albumine + lactate + pyruvate). Du peroxyde d'hydrogène est produit lors de l'utilisation d'une technique de fluorométrie utilisant du 10-acétyl-3,7-dihydroxyphenoxazine pour détecter la présence de H_2O_2 dans des lecteurs de microplate [98]. D'autres méthodes existent : recours à la cytométrie de flux après incubation avec des générateurs de radicaux libres (xanthine / xanthine oxydase, menadione) et coloration à l'hydroéthidine (substrat oxydable) et au 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (colorant de l'ADN pour exclure les spermatozoïdes morts) [99], utilisation d'un luminomètre après addition d'une molécule stimulant l'activité de la NADPH oxydase [96, 97, 100].

Bien que la production de radicaux libres varie beaucoup selon les populations, les hommes subfertiles en produisent une quantité supérieure aux hommes fertiles [97, 100]. La quantité de H_2O_2 générés augmente considérablement avec le temps [98], avec la concentration en spermatozoïdes [98, 100] et lors d'addition d'un réducteur, comme le NADPH, ou de calcium ionophore [98]. Une corrélation négative existe entre la capacité des spermatozoïdes humains à produire des radicaux libres et celle d'entraîner la fusion des gamètes suite à l'exposition au calcium ionophore, entraînant la peroxydation des acides gras insaturés de la membrane plasmique [97]. Les spermatozoïdes anormaux produisent une quantité de H_2O_2 significativement plus importante que les spermatozoïdes normaux [98].

Une explication est que la rétention de résidus cytoplasmiques augmente l'activité de la glucose-6-phosphate deshydrogénase, enzyme qui contrôle le flux de glucose à travers la voie à l'origine de la génération du NADPH. Or le NADPH sert de source d'électrons lors de l'élaboration du O_2^- dans le spermatozoïde [97, 98]. Par contre, le taux de production de ROS n'est pas corrélé à la mobilité spermatique [100]. Ces résultats suggèrent que les prélèvements dont le taux de radicaux libres augmente contiennent une semence pauvre ayant de mauvais résultats aux tests de routine. Ce qui amène à se demander si la production de radicaux libres est une cause ou une conséquence de la subfertilité [100]. Enfin, une étude chez le rat [96] a montré qu'avec l'âge, la capacité des enzymes antioxydantes des spermatozoïdes diminue, ce qui entraîne une augmentation de la production des radicaux libres. Ceci pourrait expliquer en partie certains problèmes de fertilité liés à l'âge.

8 – Marqueurs testant la maturation du spermatozoïde : la créatinine kinase (HspA2)

Une protéine créatinine kinase a été mise en évidence dans le sperme humain : la HspA2 (Heat Shock Protéin HspA2). Elle est présente dans les spermatocytes en faible quantité, dans les spermatides et dans la queue des spermatozoïdes matures. Elle s'exprime lors de la phase terminale de la spermatogenèse, simultanément à l'extrusion cytoplasmique et au remodelage de la membrane plasmique. Ainsi, lorsque la maturation est altérée, avec une absence d'expression de la HspA2 au niveau des spermatozoïdes, une rétention cytoplasmique et un échec de la fixation à la zone pellucide sont observés. La présence de cette protéine est ainsi corrélée à la maturité des cellules spermatiques, et donc à la fonction spermatique et à la fertilité : un faible taux de HspA2 dans le sperme humain permet de prédire une diminution de la fertilité [101].

9 – Marqueurs testant l'interaction spermatozoïde/ovocyte

9.1 – Protéine CRISP

Des sites complémentaires des CRISP se trouvent à la surface de l'ovocyte, au niveau de la zone fusogénique. Leur expression temporaire est corrélée avec l'acquisition de la capacité de fusion de l'ovocyte avec le spermatozoïde [102, 103]. Les protéines CRISP (abordées dans la partie sur les marqueurs de la capacitation) interviennent ainsi également dans l'interaction spermatozoïde/ovocyte. Elles sont localisées dans la région équatoriale et post-acrosomique du spermatozoïde ainsi qu'au niveau de la queue et sont secrétées dans la lumière de l'épididyme [102]. Le nombre de molécules CRISP est directement corrélé à la fertilité de l'étalon [72] : la CRISP3 est majoritairement présente et jouerait un rôle au niveau des fonctions du plasma séminal dans le tractus de la femelle, alors que les CRISP1 et 2 interviendraient directement dans le processus de fusion spermatozoïde/ovocyte.

Le polymorphisme qui touche la séquence aminoacide des CRISP1 a une influence sur la fertilité de l'étalon [105]. Si une association entre un certain génotype de CRISP1 et une performance reproductive favorable pouvait être établie, un test PCR (Polymerase Chain Reaction, c'est-à-dire réaction en chaîne par polymérase) pourrait alors être développé pour établir une sélection des reproducteurs.

9.2 – Hyaluronidase PH-20

L'ovocyte ovulé est entouré par un ensemble de cellules qui produisent une matrice riche en acide hyaluronique durant la maturation folliculaire. La hyaluronidase spermatique PH-20, isolée dans les spermatozoïdes de souris, singe et homme, est impliquée dans la pénétration du spermatozoïde dans la matrice extracellulaire de l'ovocyte, dans la pénétration de la zone pellucide et dans l'incorporation du spermatozoïde dans l'ovocyte [106]. Elle joue donc un rôle dans l'interaction des gamètes et influence ainsi la fertilité des mammifères [107].

Chez l'étalon, les extraits de membrane plasmique des spermatozoïdes équin montrent trois protéines majeures ayant une activité hyaluronidase de 54, 59, et 83 kDa à l'immunofluorescence indirecte [107, 108].

Une hyaluronidase a été identifiée à la surface de la membrane postérieure de l'acrosome et ressemble en de nombreux points à la PH-20. Elle jouerait un rôle significatif dans la pénétration, la reconnaissance spermatozoïde-oocyte et la fusion des gamètes [106].

La hyaluronidase est un facteur de maturation spermatique : elle semble « masquée » lors du transit épидидymal puis démasquée lors de la capacitation [106].

Les récepteurs associés à la hyaluronidase sont redistribués durant le transit épидидymal et leur maturation se produit durant la fin du transit. La hyaluronidase pourrait potentiellement être utilisée comme marqueur de la maturation épидидymale chez l'étalon et donc comme marqueurs d'éventuels développements spermatiques anormaux [108].

9.3 – Protéine AWN d'adhésion

Comme vu précédemment, les spermadhésines sont des protéines du plasma séminal qui contribuent à certaines étapes de la fécondation, notamment l'interaction des gamètes. Leur rôle reste flou chez l'étalon [72].

Chez le sanglier la spermadhésine AWN, synthétisée par le rete testis et les vésicules séminales, est présente à la surface des spermatozoïdes observés tout au long du tractus génital ainsi que sur les restes de membrane cytoplasmique des spermatozoïdes attachés à la zone pellucide [109]. Elle s'attache aux α -galactosides et aux glycoprotéines de la zone pellucide ce qui lui suggère un rôle dans l'interaction des gamètes [110].

Dans l'avenir, la reconnaissance des spermadhésines, et notamment des AWN, pourrait servir à expliquer un problème de fertilité lié à une incapacité d'établir l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte.

9.4 – Protéine P34H

La protéine P34H a été décrite chez l'homme comme intervenant lors de l'interaction du spermatozoïde avec la zone pellucide, étape critique de la fécondation [111, 112].

Le niveau d'expression de la protéine P34H est moins important chez les hommes infertiles par rapport aux hommes fertiles dans plus de la moitié des cas [111]. Par contre, l'interaction spermatozoïde-zone pellucide semble être aussi efficace chez les individus infertiles présentant une quantité normale de P34H, que chez les individus fertiles. Mais la capacité d'interaction est drastiquement réduite chez les individus infertiles présentant une quantité de P34H nettement diminuée. Ces résultats montrent qu'une faible quantité de la protéine épидидymale P34H peut être associée à une infertilité idiopathique et que cette dernière peut donc être considérée comme un marqueur de la maturation épидидymale du sperme humain [111].

Chez le taureau, la protéine P25b a été caractérisée comme ayant de nombreuses similitudes avec la P34H. Synthétisée par l'épithélium épидидymal et s'ajoutant à la surface du spermatozoïde durant le transit épидидymal au niveau de l'acrosome, elle jouerait un rôle dans l'interaction spermatozoïde-zone pellucide [112]. La recherche d'une protéine similaire intervenant dans l'interaction spermatozoïde-zone pellucide chez l'étalon pourrait ainsi être envisageable pour apporter des informations lors d'infertilité idiopathique ou de subfertilité.

9.5 – Zonadhésine

Les zonadhésines sont des molécules spermatiques participant à l'adhésion spermatozoïde-zone pellucide. Ce sont les seules protéines connues à ce jour comme étant capable de l'adhésion à la zone pellucide de manière directe et spécifique d'espèces [113, 114, 115]. La zonadhésine est une protéine de haut poids moléculaire avec de multiples domaines qui varient dans leur expression selon l'espèce [116]. Elle est localisée au niveau de la région apicale des spermatozoïdes et semblerait subir des modifications durant la maturation spermatique et/ou la capacitation [114, 115].

Des différences de composition polypeptidique de cette protéine ont été identifiées entre des étalons fertiles et subfertiles. Ces différences peuvent survenir d'un défaut de développement dans l'expression génétique de la zonadhésine. La variation entre étalons de l'expression de la zonadhésine pourrait servir de marqueur de fertilité chez l'étalon et expliquer les différences de fertilité [113, 114].

10 – Marqueurs testant la fertilité des spermatozoïdes : la protéine SP22

La protéine SP22, située principalement au niveau du segment équatorial de la tête du spermatozoïde, est présente chez de nombreuses espèces [117]. C'est la seule protéine spermatique de membrane dont la concentration a été significativement associée à la fertilité aussi bien in vivo que in vitro chez les rats [118]. Elle intervient dans la pénétration de la zone pellucide par le spermatozoïde et dans la fusion des membranes [118]. Chez l'étalon, le tissu spécifique SP22 semble être incorporé dans le spermatozoïde à un stade précoce du développement et la sécrétion de SP22 semble être continuellement sécrétée par l'épididyme et incorporée dans le spermatozoïde mature [119]. L'investigation du rôle de cette protéine sur la fertilité de l'étalon pourrait être étudiée comme éventuel futur marqueur de fertilité.

Conclusion générale

Les tests d'évaluation de la semence équine dits de routine, c'est-à-dire utilisés classiquement en clientèle, sont les suivants:

- l'évaluation macroscopique de la semence (volume, couleur, pH)
- la détermination de la concentration en spermatozoïdes avec l'utilisation de la cellule hématimétrique, de la spectrophotométrie ou de compteurs de particules
- l'estimation de la mobilité des spermatozoïdes par évaluation visuelle de la semence après dilution
- la morphologie des spermatozoïdes grâce à diverses colorations de la semence

Une variété de techniques et de protocoles est par ailleurs validée pour cette même évaluation, mais leur application reste limitée au domaine de la recherche (système d'analyse automatisée).

De nouveaux tests sont en plein développement et ne sont pas utilisables en clientèle car leur application est encore fastidieuse et chère. Par contre ils peuvent se révéler utiles pour améliorer le diagnostic de subfertilité ou la validation de solutions de préservation ou de cryopréservation du sperme [9]. Cette nouvelle génération de tests regroupe :

- l'évaluation de l'intégrité de la membrane plasmique: test de la structure de la chromatine spermatique (SCSA), marquage des brins d'ADN avec la terminale désoxynucléotidyle transférase (TUNEL), déplacement de brèche (NT), test de dispersion de la chromatine spermatique (SCD), test des comètes (SCGE), test d'immunofluorescence d'évaluation du niveau de protamines (MitoTracker®)
- la caractérisation de la réaction acrosomique et de la capacitation: induction à la progestérone ou au calcium ionophore A23187, coloration au bleu de Coomassie, fluorescence à la chlorotétracycline, coloration à la mérocyanine 540, détection des asymétries de la membrane spermatique par les fluorochromes Annexin V et Ro-09-0198
- l'évaluation de la fonction mitochondriale: coloration à la rhodamine 123, au MitoTracker®, au JC-1
- l'évaluation de l'intégrité de la membrane plasmique: test de gonflement hypo-osmotique (HOST), coloration fluorescente simple, double ou triple (CFDA, PI, SYBR-14), lecteurs de microplates

- l'utilisation de marqueurs biochimiques potentiels testant : l'intégrité de l'acrosome et la réaction acrosomique, la capacitation, l'apoptose, la chromatine, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes, l'activation de l'ovocyte, les dommages oxydatifs, la maturation du spermatozoïde, l'interaction spermatozoïde/ovocyte, la fertilité des spermatozoïdes

De nombreuses informations scientifiques concernent la fonction et la structure de spermatozoïdes mais de nombreuses incertitudes restent encore irrésolues notamment au niveau des interactions moléculaires spécifiques nécessaires pour établir un potentiel optimal de fécondation des spermatozoïdes. Extrapoler les données obtenues dans d'autres espèces de mammifères chez l'étalon est probablement voué à l'échec, du fait de la méconnaissance des différences inter-espèces au niveau des caractéristiques et de la physiologie des spermatozoïdes. Néanmoins, un certain nombre de ces informations pourrait avoir une certaine pertinence chez les équidés : l'identification de gènes candidats de certaines caractéristiques spécifiques du spermatozoïde, la mise en évidence de mutation de gènes pour des protéines spécifiques de la fonction de reproduction et l'utilisation d'agents du silence génétique. L'utilisation de techniques moléculaires pourrait permettre d'élucider les mécanismes de contrôle du développement et de la fonction des spermatozoïdes chez l'étalon [9].

La carte génétique de l'étalon a été considérablement étudiée ces dernières années, avec la localisation de gènes sur les chromosomes, le linkage, la radiation hybride, la cytogénétique et la comparaison des cartes entre homme et cheval [120]. Le génome équin a été récemment séquencé dans son intégralité ce qui permet d'envisager l'identification des gènes responsables du développement et de la fonction des spermatozoïdes, ainsi que de facteurs génétiques responsables de problèmes de reproduction. La technologie de criblage à haut débit par puce (ADNc et oligonucléotides) est de plus en plus utilisée pour étudier l'expression différentielle des gènes [121]. La transcription reverse et les étapes d'amplification sont appliquées pour quantifier l'activité des gènes dans des cellules ciblées, et pour démêler la complexité des gènes [122, 123]. Toutes les informations obtenues grâce à ces technologies émergentes sont appliquées à la fertilité du mâle [124], dont celle de l'étalon [125, 126, 127].

L'impact des produits chimiques de l'environnement sur la fertilité de l'étalon, comme sur celle des autres espèces, mérite une attention particulière. Un déclin apparent de la qualité et de la quantité des spermatozoïdes chez l'homme a été décrit ces dernières années [128, 129]. Un taux accru d'autres problèmes reproducteur, comme le cryptochidisme ou le

cancer des testicules, a également été rapporté [130]. Les toxiques environnementaux touchant la reproduction sont considérés comme les principaux responsables de ces pathologies [131]. Les techniques d'ADNc microarray et de RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) en temps réel ont révélé différents profils d'expression de certains gènes apparentés à la spermatogenèse (la protéine de choc de la tête 70-2, le facteur de croissance d'insuline fixant la protéine 3 et la glutathion S transférase) suite à une exposition à des toxiques, de telle sorte que ces gènes pourraient servir de biomarqueurs dans le dépistage d'une toxicité testiculaire [132].

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de régulation du développement et de la fonction des spermatozoïdes pourrait probablement conduire à des nouvelles techniques de diagnostic et à des nouvelles stratégies thérapeutiques lors d'une diminution de la fertilité chez les étalons. Indubitablement, les générations futures devront regarder au-delà de la morphologie et de la mobilité pour caractériser les déficiences des spermatozoïdes. Par ailleurs, ils utiliseront probablement le spermatozoïde comme un vecteur pour la production de chevaux transgéniques [133, 134], ainsi que pour la transplantation de cellules souches ou pour des techniques de greffes testiculaires pour étudier la fonction testiculaire ou pour développer une lignée génétique [135, 136, 137, 138, 139, 140].

CONCLUSION :

L'analyse de la science d'étalon répond à la fois à une exigence de la part des propriétaires de poulinières d'utiliser un étalon fertile pour la mise à la reproduction de leur jument, et de la part des propriétaires d'étalon de déterminer l'origine exacte de la subfertilité éventuelle de leur animal.

Les techniques utilisées sur le terrain sont bien maîtrisées mais ne permettent qu'une évaluation restreinte des paramètres de la semence (concentration, morphologie générale et mobilité des spermatozoïdes. Or certains étalons présentant des valeurs satisfaisantes tout en étant sujet à une baisse, voire à une absence de fertilité. De ce fait, les nouvelles méthodes d'évaluation de la semence trouvent leur intérêt puisqu'elles permettent d'une part de détecter une anomalie non mise en évidence par les tests de routine, et d'autre part, de localiser précisément cette anomalie au sein du spermatozoïde. Cependant, ces techniques ont un coût élevé et nécessitent des manipulations de maintenance et de standardisation qui les rendent difficilement applicables, à l'heure actuelle, en clientèle.

BIBLIOGRAPHIE

- [28] Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update* 2003;9:331-45.
- [97] Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FCW. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *Journal of Andrology* 1989;10:214-20.
- [86] Almeida J, Ball BA. Effects of alpha-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2005;72:230-8.
- [10] Amann RP, Katz DF. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology* 2004;25:317-25.
- [22] Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *Journal of Andrology* 2005;26:741-8.
- [21] Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *Journal of Andrology* 2006;27:890-8.
- [113] Bailey LB, Brady HB, Tardif S, Thompson LD, Hardy DM. Zonadhesin expression and localization in stallion testes. *Animal Reproduction Science* 2006;94:56-9.
- [68] Ball BA, Fagnan MS, Dobrinski I. Determination of acrosin amidase activity in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1997;48:1191-8.
- [98] Ball BA, Vo AT, Baumber J. Generation of reactive oxygen species in equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 2001;62:508-15.
- [133] Ball BA, Sabeur K, Allen WR. Uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm-mediated gene transfer. *Animal Reproduction Science* 2006;94:115-6.
- [1] Baronne R. Chapitre II: Appareil génital mâle. In: *Anatomie compare des mammifères domestiques*. Tome 4. Splanchnographie II. Vigot 2001, 83-250.
- [29] Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology* 2003;58:301-2.
- [73] Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, et al. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *Journal of Animal Science* 1998;76:2032-9.
- [79] Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 1996;2:139-44.
- [4] Blanchard TL, et al. *Manual of equine reproduction*. 2nd edition. Mosby 2003
- [111] Boue F, Sullivan R. Cases of human infertility are associated with the absence of P34H and epididymal sperm antigen. *Biology of Reproduction* 1996;54:1018-24.

- [114] Breazeale KR, Brady HA, Bi M, Uppuluri S, Thompson LD, Bruemmer JE, et al. Biochemical properties and localization of zonadhesin in equine spermatozoa. *Theriogenology* 2002;58:359-62.
- [39] Brinsko SP, Love CC, Bauer JE, Macpherson ML, Varner DD. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. *Animal Reproduction Science* 2007;99:67-71.
- [89] Brouwers JF, Gadella BM. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2003;35:1382-91.
- [88] Brouwers JF, Silva PFN, Gadella BM. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology* 2005;63:458-69.
- [77] Brum A, Sabeur K, Ball BA. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa after separation by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 2006;94:138-9.
- [43] Brum AM, Thomas AD, Sabeur K, Ball BA. Evaluation of coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 2006;67:358-62.
- [74] Buffone MG, Calamera JC, Verstraeten SV, Doncel GF. Capacitation-associated with tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. *Reproduction* 2005;129:697-705.
- [75] Burnaugh L, Sabeur K, Ball BA. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 2007;67:580-9.
- [37] Casey PJ, Hillman RB, Robertson KR, Yudin AL, Liu IKM, Drobnis EZ. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *Journal of Andrology* 1993;14:289-297.
- [122] Chan W-Y, Wu SM, Rusczyk L, Law E, Lee TL, Baxendale V, et al. The complexity of antisense transcription revealed by the study of developing male germ cells. *Genomics* 2006;87:681-92.
- [35] Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF, Fazeli A, Bevers A, Colenbrander B. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biology of Reproduction* 1998;59:733-42.
- [32] Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology* 2006;27:53-9.
- [55] Cossarizza A, Ceccarelli D, Masini A. Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level. *Experimental Cell Research* 1996;222:84-94.
- [69] Cross NL. A modified and improved assay for sperm amidase activity. *Journal of Andrology* 1990;11:409-13.
- [64] Cross NL, Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction* 1989;41:635-41.

- [103] Cuasnicu PS, Ellerman DA, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Da Ros VG. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Archives Medicine Research* 2001;32:614-8.
- [76] Desvougues AL, Dow DA, Hayna JT, Miller L, Jousan D, Hansen PJ, et al. Heat shock induces apoptosis in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2006;94:125-6.
- [135] Dobrinski I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Animal Reproduction Science* 2005;89:137-45.
- [102] Ellerman DA, Cohen DJ, Da Ros VG, Morgenfeld MM, Busso D, Cuasnicu PS. Sperm protein "DE" mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. *Developmental Biology* 2006;297:228-37.
- [16] Evenson DP, Darzynkiewica Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980;210:1131-3.
- [19] Evenson DP, Jost LK, Varner DD. Relationship between sperm nuclear protamine free-SH status and susceptibility to DNA denaturation. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 2000;56:401-6.
- [26] Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of Andrology* 2006;27:176-88.
- [42] Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanely, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*.1957;226,497I.
- [95] Foresta C, Flohe L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biology of Reproduction* 2002;67:967-71.
- [24] Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1991;88:11003-6
- [80] Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A. Normal sperm morphology and chromatin packaging : comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* 1999;31:361-6.
- [132] Fukushima T, Yamamoto T, Kikkawa R, Hamada Y, Komiyama M, Mori C, et al. Effects of male reproductive toxicants on gene expression in rat testes. *Journal of Toxicological Sciences* 2005;30:195-206.
- [49] Gadella BM, Harrison RAP. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction* 2002;67:340-50.
- [46] Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* 2001;68:249-65.
- [70] Gamboa S, Ramalho-Santos J. SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. *Theriogenology* 2005;64:275-91.

- [116] Gao A, Barbers DL. Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule-like domains. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:3415-21.
- [59] Garner DL, Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction* 1995;53:276-84.
- [60] Garner DL, Dobrinsky JR, Welch GR, Johnson LA. Porcine sperm viability, oocyte fertilization and embryo development after staining spermatozoa with SYBR-14. *Theriogenology* 1996;45:1103-13.
- [61] Garner DL, Thomas CA, Allen CH. Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *Journal of Andrology* 1997;18:324-31.
- [54] Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1997;57:1401-6.
- [83] Gradil C, Yoon S-Y, Brown J, He C, Visconti P, Fissore RA. PLC-Zeta: A marker of fertility for stallions. *Animal Reproduction Science* 2006;94:23-5.
- [50] Graham JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* 2001;68:239-47.
- [65] Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction* 1990;43:55-64.
- [66] Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball BA. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology* 2000;53:1691-703.
- [57] Gravance CG, Garner DL, Miller MG, Berger T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reproductive Toxicology* 2001;15:5-10.
- [99] Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science* 2006;84:2089-100.
- [87] Guthrie HD, Welch GR. Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. *Journal of Animal Science* 2007;85:1402-11.
- [136] Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL. Self-renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proceedings National Academy Science USA* 2005;102:17430-5.
- [115] Hardy DM, Garbers DL. A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:26025-8.
- [47] Harrison RA, Gadella BM. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 2005;63:342-51.

- [124] He Z, Chan WYC, Dym M. Microarray technology offers a novel tool for diagnosis and identification of therapeutic targets for male infertility. *Reproduction* 2006;132:11-9.
- [5] Heymon Y., Vignon X. *Reproduction des animaux d'élevage*. Educagri 2005
- [11] Holt C, Holt WV, Moore HDM, Reed HCB, Curnock RM. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology* 1997;18:312-23.
- [137] Honaramooz A, Li MW, Penedo MC, Meyers S, Dobrinski I. Accelerated maturation of primate testis by xenografting into mice. *Biology of Reproduction* 2004;70:1500-3.
- [101] Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kDa heat shock protein HspA2. *Biology of Reproduction* 2000;69:925-32.
- [125] Ing NH, Laughlin AM, Varner DD, Welsh Jr TW, Forrest DW, Blanchard TL, et al. Gene expression in the spermatogenically inactive "dark" and maturing "light" testicular tissues of the prepubertal colt. *Journal of Andrology* 2004;25:535-44.
- [12] Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. A comparison of two computer-automated semen analysis instruments for the evaluation of sperm motion characteristics in the stallion. *Journal of Andrology* 1990;11:453-9.
- [14] Jasko DJ, Sawyer HR, Squires EL. Identification of degenerative germ cells in semen from a QuarterHorse stallion. *Journal of Equine Veterinary Science* 1991;11:283-286.
- [110] Jonakova V, Kraus M, Veselsky L, Cechova D, Bezouska K, Ticha M. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility* 1998;114:25-34.
- [105] Jude R, Giese A, Piumi F, Guerin G, Sieme H, Topfer-Petersen E, et al. Molecular characterization of the CRISP 1 gene-a candidate gene for stallion fertility. *Theriogenology* 2002;58:417-20.
- [63] Kavak A, Johannisson A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Aidnik M, Einarsson S. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science* 2003;76:205-16.
- [67] Kennedy WP, Kaminski JM, Van der Ven HH, Jeyendran RS, Reid DS, Blackwell J, et al. A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *Journal of Andrology* 1989;10:221-31.
- [8] Kenney RM. *Manual for clinical fertility evaluation of the stallion*. Hastings, NE: Society of Theriogenology; 1983.
- [118] Klinefelter GR, Welch JE, Perreault SD, Moore HD, Zucker RM, Suarez JD, et al. Localization of the sperm protein SP22 and inhibition of fertility in vivo and in vitro. *Journal of Andrology* 2002;23:48-63.
- [6] Knobil E, Neill JD. Spermatozoa. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Volume 4 (Pro-Z). 1999;586-596.
- [93] Kumar TR, Muralidhara. Induction of oxidative stress by organic hydroperoxides in testis and epididymal sperm of rats in vivo. *Journal of Andrology* 2007;28:77-85.

- [131] Lahousse SA, Wallace DG, Liu D, Gaido KW, Johnson KJ. Testicular gene expression profiling following prepubertal rat mono-(2-ethylhexyl) phthalate exposure suggests a common initial genetic response at fetal and prepubertal ages. *Toxicological Sciences* 2006;93:369-81.
- [126] Laughlin AM, Forrest DW, Varner DD, Blanchard TL, Love CC, Welsh Jr TW, et al. DNA microarray analysis of gene expression in testicular tissue of stallions. *Theriogenology* 2002;58:413-5.
- [17] Love CC. The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. *Animal Reproduction Science* 2005;89:39-45.
- [18] Love CC, Kenney RM. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 1998;57:995-72
- [20] Love CC, Kenney RM. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biology of Reproduction* 1999;60:615-20.
- [15] Love CC, Varner DD, Thompson JA. Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 2000;56:93-100.
- [62] Love CC, et al. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology* 2003;60:1127-38.
- [27] Makhlof AA, Niederberger C. DNA integrity tests in clinical practice; it is not a simple matter of black and white (or red and green). *Journal of Andrology* 2006;27:316-23.
- [92] Martinez P, Proverbio F, Camejo MI. Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines. *Asian Journal of Andrology* 2007;9:102-7.
- [123] Martins RP, Krawetz SA. RNA in human sperm. *Asian Journal of Andrology* 2005;7:115-20
- [106] Meyers SA. Equine sperm-oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Animal Reproduction Science* 2001;68:291-303.
- [107] Meyers SA, Rosenberger AE. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoa function. *Biology of Reproduction* 1999;61:444-51.
- [34] Meyers SA, Overstreet JW, Liu IKM, Drobnis EZ. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *Journal of Andrology* 1995;16:47-54.
- [108] Meyers SA, Rosenberger A, Orpneck K. Localization and cellular distribution of a unique hyaluronidase in stallion spermatozoa during epididymal transit. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 2000;56:79-86.
- [51] Miki K, et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;101:16506.
- [30] Miller D, Ostermeier GC. Spermatozoal RNA : why is it there and what does it do? *Gynecology Obstetric and Fertility* 2006;34:840-6.

- [31] Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Human Reproduction Update* 2006;12:757-67.
- [119] Miller LMJ, Greene ES, Roberts KP, Troedsson MHT. Expression of equine sperm protein 22 kDa (SP22) in testicular and epididymal tissue. *Animal Reproduction Science* 2006;94:54-5;
- [82] Mollova M, Atanassov B, Nedkova R, Kyrukchiev S. Biochemical and immunochemical characterization of boar sperm flagellar protein with role in hyperactivation/capacitation process. *Biology of Reproduction* 2006;6:79-94.
- [52] Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction* 2004;71:540-7
- [58] Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999;51:721-7.
- [85] Neild DM, Gadella BM, Colenbrander B, Agüero A, Browers JFHM. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2002;58:295-8.
- [23] Oliva R. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update* 2006;12:417-35.
- [130] Paulozzi L. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environmental Health Perspectives* 1999;107:267-302.
- [81] Pesch S, Bergmann M, Bostedt H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* 2006;66:307-13.
- [33] Raisonnier A. Cours de biologie génique. Université P. et M. Curie, année 2006-2007
- [36] Rathi R, Nielen M, Cheng FP, Van Buiten A, Colenbrander B. Exposure of progesterone receptors on the plasma membranes of stallion spermatozoa as a parameter for prediction of fertility. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 2000;56:87-91.
- [45] Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation on in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction* 2001;65:462-70.
- [138] Rathi R, Honaramooz A, Zeng W, Turner R, Dobreinski I. Germ cell development in equine testis tissue xenografted into mice. *Reproduction* 2006;131:1091-8.
- [134] Robl JM, Wang Z, Kasinathan P, Kuroiwa Y. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology* 2007;67:127-33.
- [104] Roberts KP, Ensrud KM, Wooters JL, Nolan MA, Johnston DS, Hamilton DW. Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006;250:122-7.
- [90] Roca J, Gill MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology* 2004;25:397-405.
- [109] Rodriguez-Martinez H, Iborra A, Martinez P, Calvete JJ. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reproduction, Fertility and Development* 1998;10:491-7.

- [78] Said TM, Paasch U, Glander H-J, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction Update* 2004;10:39-51.
- [25] Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Journal of Andrology* 1997;18:294-301.
- [120] Shiue YL, Bickel LA, Caetano AR, Million LV, Clark RS, Eggleston ML, et al. A synteny map of horse genome comprised of 240 microsatellite and RAPD markers. *Animal Genetics* 1999;30:1-9.
- [53] Smiley ST, Reers M, CMottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1991;88:3671-5.
- [71] Sousa APM, Gomes-Santos CSS, Ramalho-Santos J. Localization of snares, NSF and Caveolin 1 in human spermatozoa: relationship with seminal parameters. *Archives of Andrology* 2006;52:347-53.
- [91] Stradaioli G, Magistrini M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for determination of malondialdehyde in equine spermatozoa. *Theriogenology* 2002;58:347-50.
- [94] Stradaioli G, Rubei M, Zamparini M, Tubaro F, Valentini S, Degl'Innocenti S, et al. Enzymatic evaluation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2006;94:29-31.
- [112] Sullivan R. Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science* 2004;82-83:341-7.
- [129] Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm densities declined. A reanalysis of global trend data. *Environmental Health Perspectives* 1997;105:1228-32.
- [128] Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environmental Health Perspectives* 2000;108:961-6.
- [84] Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. PLCzeta: a sperm protein that triggers calcium ion oscillations and egg activation in mammals. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2006;17:264-73.
- [2] Thibault C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses 2001
- [56] Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 1998;58:786-93.
- [3] Tibary A, Bakkowy M. Reproduction equine. Tome II: l'étalon. Actes 2005
- [72] Topfer-Petersen E, Ekhasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Animal Reproduction Science* 2005;89:159-70.
- [127] Turner RM, Casas-Dolz R. Differential gene expression in stallions with idiopathic testicular degeneration. *Theriogenology* 2002;58:421-4.
- [139] Turner RM, Rathia R, Zeng W, Honaramooz A, Dobreinski I. Xenografting to study testis function in stallions. *Animal Reproduction Science* 2006;94:161-4.

- [9] Varner DD. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 2008;70:448-62.
- [40] Varner DD, Ward CR, Storey BA, Kenney RM. Induction and characterization of the acrosome reaction in equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 1987;48:1383-9.
- [7] Varner DD, Vaughan SD, Johnson L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoa motility. *American Journal of Veterinary Research* 1991;52:224-30.
- [38] Varner DD, Brinsko SP, Blanchard TL, Love CC, Macpherson ML, Heck RS, et al. Subfertility in stallions associated with acrosome dysfunction. *Proceedings American Association of Equine Practitioners* 2001;47:227-8.
- [41] Varner DD, Thompson JA, Blanchard TL, Heck R, Love CC, Brinsko SP, et al. Induction of the acrosome reaction in stallion spermatozoa: effects of incubation temperature, incubation time, and ionophore concentration. *Theriogenology* 2002;58:303-6.
- [48] de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biology of Reproduction* 2003;68:2122-34.
- [44] Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Developmental Biology* 1984;104:287-96.
- [96] Weir CP. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown Norway rat. *Journal of Andrology* 2007;28:229-40.
- [13] Wessel MT, Althouse GC. Validation of an objective approach for simultaneous assessment of viability and motility of fresh and cooled equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2006;94:21-2.
- [100] Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, McLaughlin EA, Hull MGR, et al. Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *International Journal of Andrology* 1999;22:236-42.
- [117] Wrench N, Pinto CRF, Klinefelter GR, Farin CE. Seasonal expression and pattern of SP22 immunolocalization in stallion semen. *Animal Reproduction Science* 2006;94:32-5.
- [121] Wrobel G, Priming M. Mammalian male germ cells are fertile ground for expression profiling of sexual reproduction. *Reproduction* 2005;129:1-7.
- [140] Zeng W, Avelar GF, Rathi R, Franca LR, Dobrinski I. The length of the spermatogenic cycle is conserved in porcine and ovine testis xenografts. *Journal of Andrology* 2006;27:527-33.

