



institut français  
du **cheval**  
et de l'**équitation**



40<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Équine  
Mardi 18 mars 2014

## Les récepteurs aux œstrogènes du spermatozoïde équin : marqueurs saisonniers, acteurs de la mobilité, marqueurs de qualité ?

Par

C. Gautier<sup>1</sup>, C. Delalande<sup>1</sup>, I. Barrier-Battut<sup>2</sup>, I. Guénon<sup>1</sup>, H. Bouraïma-Lelong<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EA2608 USC INRA 2006, Université de Caen Basse-Normandie, CS 14032, 14032 CAEN cedex 5

<sup>2</sup> Institut Français du Cheval et de l'Équitation - site du Haras du Pin, La Jumenterie du Pin, 61310 EXMES

### Résumé

Les chevaux présentent des individus inégaux en terme de capacités reproductrices males (fertiles, subfertiles, infertiles). Bien qu'importants pour la filière équine, les facteurs paracrines régulant la spermatogenèse et les fonctions du spermatozoïde sont encore peu connus. L'étalon est caractérisé, entre autre, par une saisonnalité de la reproduction associée à une production élevée d'œstrogènes testiculaires, dont le rôle n'est pas élucidé. Nous posons l'hypothèse que ces œstrogènes pourraient être de bons candidats comme facteurs impliqués dans la fonction de reproduction chez l'étalon. Une analyse immuno-cytochimique en cytométrie en flux d'un groupe de 7 étalons a mis en évidence une variation saisonnière des populations de spermatozoïdes positifs au récepteur aux œstrogènes 1 (ESR1) qui est partiellement superposable à la variation saisonnière des capacités de reproduction de l'étalon. Une analyse vidéomicrographique de spermatozoïdes fraîchement éjaculés a montré que le taux de spermatozoïdes rapides a été augmenté après conservation 24h dans du milieu INRA96 en présence d'œstradiol. Ces données montrent que les œstrogènes peuvent moduler les fonctions du spermatozoïde équin, ce qui ouvre de nouvelles perspectives zootechniques, notamment dans la conservation des échantillons de sperme.

**Mots clés: spermatozoïde, œstrogènes, récepteurs aux œstrogènes, mobilité, étalon.**

### Summary

The equine species is composed of unequal individuals in terms of reproductive abilities (fertile, subfertile, and infertile). Paracrine factors that regulate spermatogenesis and spermatozoa functions are still unknown. The stallion is characterized by a high production of testicular estrogens. This is why we have investigated estradiol effects on the stallion spermatozoa. First, an immunocytochemical analysis by flow cytometry of 7 stallions has evidenced seasonal variations in ESR1-positive sperm. The effects on motility were confirmed by a CASA analysis, showing that estradiol modulates motility parameters of freshly ejaculated spermatozoa. As an improvement of current zootechnical protocols, we have demonstrated that estradiol increase the rate of rapid spermatozoa when they were stored in an estradiol-containing INRA96 medium. Overall, these data have showed that estrogen can modulate the functions of equine spermatozoa. Also, these results open new perspectives in animal science, particularly for the conservation of sperm samples.

**Key-words: spermatozoa, estrogen, estrogen receptor, motility, stallion.**



## Introduction

L'amélioration des performances physiques des chevaux de sport se fait souvent au détriment de leur capacité de reproduction (Sairanen *et al.*, 2011). En effet, contrairement à d'autres espèces chez qui la sélection génétique se fait en particulier sur les capacités reproductrices, les chevaux sont souvent sélectionnés en fonction de leurs performances. Bien qu'importants pour la filière équine, les mécanismes fondamentaux qui permettent et contrôlent la fonction de la reproduction chez l'étalon restent mal connus. L'étalon est caractérisé, entre autres, par une saisonnalité de la reproduction et par une forte production d'œstrogènes testiculaires dont le rôle physiologique à ce niveau n'a pas été encore bien défini (Raeside, 1969). Les œstrogènes sont aujourd'hui reconnus comme des acteurs importants dans la régulation de la fonction de reproduction masculine (Carreau et Hess, 2010). Chez l'étalon le spermatozoïde éjaculé est à la fois capable de synthétiser des œstrogènes, via la présence de l'enzyme aromatasase, et également d'y répondre par la présence des différents récepteurs ESR1, ESR2 et GPER (M2R, Brahim Arkoun). Le rôle des œstrogènes dans le contrôle des modifications subies par le spermatozoïde reste néanmoins encore inconnu. Nous émettons l'hypothèse que les œstrogènes, comme cela a été montré chez d'autres espèces (verrat, souris et homme), pourraient intervenir dans l'acquisition de la capacité de fécondance du gamète mâle en agissant sur les différentes maturations subies par celui-ci dans le tractus génital mâle puis femelle. Ainsi la présence des récepteurs aux œstrogènes pourrait constituer un marqueur de qualité du gamète.

### 1 Matériel et méthodes

#### 1.1 Echantillons de spermes

Les échantillons de sperme éjaculé de 10 étalons âgés de 12 à 25 ans de la Jumenterie du Pin dans l'Orne (IFCE) ont été obtenus de mai 2012 à avril 2013. Les prélèvements ont été effectués chaque mois deux jours consécutifs sur 6 étalons (de mai à août 2012) et 5 étalons (de septembre 2012 à avril 2013) pour la partie quantification des récepteurs aux œstrogènes. Pour l'étude de la mobilité, les échantillons de 4 étalons ont été obtenus au cours de 4 récoltes entre avril et mai 2013.

#### 1.2 Immunocytochimie

Après élimination du plasma séminal, les spermatozoïdes ont été lavés deux fois puis fixés et ajustés à 50 millions de spermatozoïdes par tube eppendorf 1,5 ml. Le récepteur aux œstrogènes ESR1 est détecté à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin MC-20 anti ESR1 de souris, dilué au 1/50<sup>ème</sup> et d'un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin Alexa Fluor 488 dilué au 1/150<sup>ème</sup>. Les échantillons sont analysés en cytométrie en flux sur Gallios (Beckman-Coulter). La population est analysée grâce à un protocole prédéfini avec une fenêtre des spermatozoïdes réglée sur 20000 événements. La fluorescence de l'Alexa fluor 488 est détectée sur le canal FL-1 (Abs 488 / Em515).

#### 1.3 Analyse de la mobilité

Après élimination du plasma séminal, les spermatozoïdes ont été lavés une fois et ajustés à une concentration de 20 millions/ml. L'analyse de la mobilité à 24h est réalisée dans du milieu INRA96 selon 4 conditions différentes: contrôle, œstradiol (E2) 10<sup>-7</sup> M, fulvestrant 10<sup>-7</sup> M (antagoniste spécifique des récepteurs aux œstrogènes ESR1 et ESR2), E2 10<sup>-7</sup> M + fulvestrant 10<sup>-7</sup> M. Les échantillons sont incubés dans un volume total de 1 ml et conservés à 4°C pendant 24h puis placés 10 min à 37°C au bain-marie avant l'analyse au CASA. L'analyse de la mobilité des spermatozoïdes est réalisée sur CASA (HTM IVOS, Hamilton Thorn). Deux mesures de 3 µl d'échantillon sont déposées sur des cellules de Makler de 10 µm de profondeur. Les spermatozoïdes considérés comme rapides ont une vitesse supérieure ou égale à 40 µm/s. La moyenne des 2 mesures des 4 étalons est utilisée pour l'analyse statistique.

#### 1.4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel InStat (Graphpad Software) en réalisant le test de Tukey ou le test de Dunnett après ANOVA. L'analyse de la quantification saisonnière est basée sur 2 prélèvements par mois, 2 jours consécutifs sur 5 ou 6 étalons suivant les mois. L'analyse de la mobilité a été réalisée pour 3 manipulations différentes incluant 4 étalons.



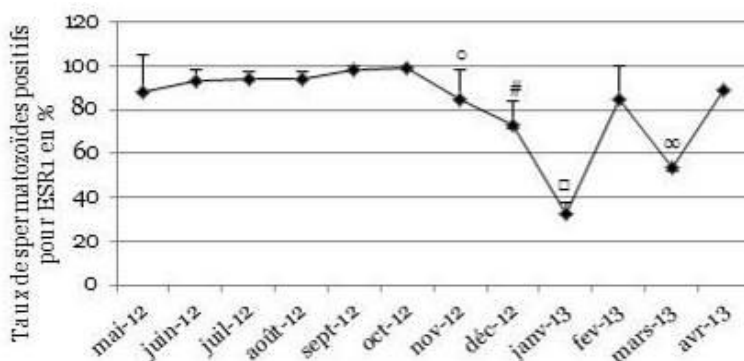
## 2 Résultats

### 2.1 Quantification saisonnière du récepteur aux œstrogènes ESR1 sur le spermatozoïde éjaculé d'étalon par immunocytochimie

Dans un premier temps nous avons mesuré les éventuelles variations du taux de récepteurs entre les 2 jours de prélèvement, aucune variation significative n'est apparue. Sur l'ensemble de la saison, on peut distinguer trois périodes dans les variations du taux de récepteurs ESR1, la première allant de mai à octobre pendant laquelle une très grande majorité des spermatozoïdes est positive pour la détection d'ESR1. Ensuite, la deuxième période d'octobre à janvier pendant laquelle on observe une chute constante et importante du taux de spermatozoïdes positifs pour ESR1. Enfin la troisième période qui débute en février et probablement jusqu'en mai est caractérisée par une réapparition de la population positive pour la détection d'ESR1 (figure I).

Figure I : Variation mensuelle du nombre de spermatozoïdes positifs pour la détection d'ESR1.

Figure I: Monthly variations of ESR1-positive spermatozoa



n=12 (mai, juin, juillet et août 2012) et n=10 (sept, oct, nov, déc 2012 et janv, févr, mars, avr 2013)

- novembre significativement inférieur à octobre (\*,  $p \leq 0,05$ ) significativement supérieur à janvier et mars ( $p \leq 0,001$ ), # décembre significativement inférieur à mai (\*\*,  $p \leq 0,01$ ), juin, juillet, août, septembre, octobre (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ) significativement supérieur à janvier,
- janvier significativement inférieur à tous les mois ( $p \leq 0,001$ ), ∞ mars significativement différent de tous les autres mois (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ).

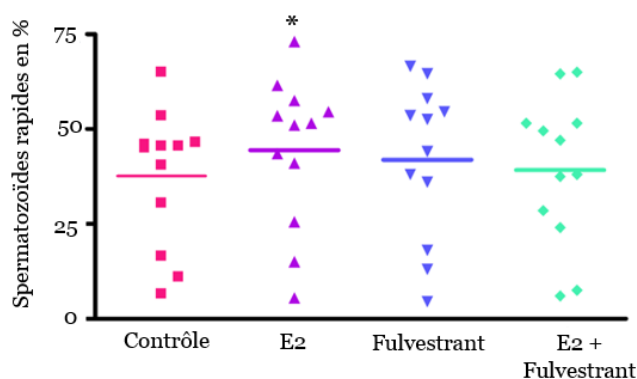
### 2.2 Effets de l'œstradiol sur la mobilité du spermatozoïde d'étalon après réfrigération

Dans un second temps nous avons testé l'effet de l'œstradiol sur la mobilité des spermatozoïdes réfrigérés pendant 24h. En effet la réfrigération est une méthode couramment utilisée pour conserver les semences avant l'insémination.

Après 24 heures d'incubation en milieu de conservation INRA96 à 4°C, les résultats montrent que l'E2 augmente significativement le pourcentage de spermatozoïdes rapides par rapport au contrôle et cet effet disparaît en présence de fulvestrant, l'antagoniste spécifique d'ESR1 (figure II).

Figure II : Effet de l'œstradiol sur le pourcentage de spermatozoïdes rapides après conservation 24h dans du milieu INRA 96 à 4°C

Figure II: Effects of estradiol on the number of rapid spermatozoa after 24h in medium conservation INRA 96-4 °C



\*valeur significativement différente au contrôle pour  $p \leq 0,05$ . n=12



### 3 Discussion – Conclusion

Les résultats montrent que la population de spermatozoïdes positive pour le récepteur aux œstrogènes ESR1 présente des variations saisonnières, avec des taux élevés de récepteurs d'avril à octobre. Il est intéressant de noter que ces taux élevés correspondent à la saison de reproduction de la jument, les œstrogènes sécrétés dans le tractus génital femelle ou libérés dans le liquide folliculaire au moment de l'ovulation pouvant alors se fixer sur les récepteurs du spermatozoïde. L'automne et le début de l'hiver sont caractérisés par des taux plus faibles de spermatozoïdes positifs pour ESR1. Ainsi l'expression d'ESR1 pourrait être régulée par la photopériode avec une augmentation de la présence des récepteurs qui coïnciderait avec le moment de la production des gamètes et la période de reproduction de la jument. La chute brutale et ponctuelle de la population ESR1 positive, observée en mars 2013, peut être corrélée aux faibles températures et aux très faibles taux d'ensoleillement relevés par météo France à cette période.

Filannino *et al.* en 2011 ont montré que des mycotoxines à activité œstrogénique étaient capable de moduler la mobilité de spermatozoïdes d'étalon mais sans déterminer les mécanismes cellulaires impliqués. Nos résultats montrent qu'après 24h de réfrigération en milieu de conservation INRA96, l'E2 augmente la proportion de spermatozoïdes rapides et cet effet est aboli en présence de l'antagoniste. Ainsi l'effet modulateur de l'œstradiol sur la mobilité passe bien par activation des récepteurs ESR1 ou ESR2. Ce résultat pourrait être dû à un effet exercé par l'œstradiol sur les mécanismes anti-apoptotiques ou sur le métabolisme comme cela a été démontré sur le spermatozoïde humain (Guido *et al.*, 2011).

### Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à une subvention de l'IFCE. Nous remercions vivement le personnel de Jumenterie du Pin pour la mise à disposition des échantillons ainsi que pour leur implication dans l'étude.

### Références

- Arkoun B., 2011. Etude de l'utilisation potentielle de l'aromatase et des récepteurs aux œstrogènes comme marqueur de qualité du spermatozoïde équin. Mémoire de M2R.
- Carreau S. and Hess R.A., 2010. Œstrogènes and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 1517-1535.
- Filannino A., Stout T.A., Gadella B.M., Sostaric E., Pizzi F., Colenbrander B., Dell'Aquila M.E., Minervini F., 2011. Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm. *Reprod Biol Endocrinol.*5;9:134.
- Guido C., Perrotta I., Panza S., Middea E., Avena P., Santoro M., Marsicos S., Imbrogno P., Ando S., Aquila S.; 2011. Human sperm physiology: estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *J. Cell. Physiol.* 226: 3403–3412.
- Lemazurier E., Moslemi S., Sourdain P., Desjardins I., Plainfosse B., Seralini G.-E., 2002. Free and conjugated Estrogens and Androgens in Stallion Semen. *General and Comparative Endocrinology* 125:272-282.
- Raeside J.I., 1969. The isolation of estrone sulfate and estradiol-17 beta sulfate from stallion testes. *Can J. Biochem.* 47, 811-815.
- Sairanen J., Katila T., Virtala A.M., Ojala M., 2011. Effects of racing on equine fertility. *Anim Reprod Sci.* Mar; 124(1-2):73-84.