



41^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 12 mars 2015

L'estradiol : facteur protecteur du spermatozoïde ? De nouvelles connaissances physiologiques pour développer des outils zootechniques.

Par

C. Gautier¹, I. Barrier-Battut², I. Guénon¹, C. Delalande¹, H. Bouraïma-Lelong¹.

¹ Université de Caen Basse-Normandie, EA2608-USC INRA2006 OeReCa, Campus 1, esplanade de la Paix CS14032, 14032 Caen

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

Résumé

L'estradiol est une hormone stéroïdienne retrouvée dans le testicule, l'épididyme puis le tractus génital femelle. Le spermatozoïde sera donc exposé à cette hormone tout au long de son transit. L'estradiol pourrait donc réguler les différentes maturations subies par le spermatozoïde pour acquérir son pouvoir fécondant : survie, mobilité, capacitation, réaction acrosomique. Nous avons testé sur les spermatozoïdes éjaculés de 4 étalons, l'effet de l'estradiol sur la mobilité et la capacitation. Nous avons mis en évidence un effet inhibiteur sur la mobilité des spermatozoïdes fraîchement éjaculés passant par l'activation du récepteur GPER. Nous avons testé l'effet de l'ajout d'estradiol dans le milieu de conservation INRA96. Après 24 heures de conservation à 4°C, la mesure des paramètres de mobilité fait apparaître une augmentation du taux de spermatozoïdes rapides en présence d'estradiol. Cet effet passe par l'activation des récepteurs ER α et/ou ER β . En conclusion, l'étude du rôle d'un acteur physiologique, l'estradiol, permettra peut-être, en élucidant son rôle dans le contrôle des fonctions du spermatozoïde, d'améliorer les outils zootechniques de conservation du sperme.

Mots clés : spermatozoïde, mobilité, estradiol, récepteurs, conservation

Summary

Estradiol is a steroid hormone present in the testis, the epididymis, and in the female genital tract. Spermatozoa are thus exposed to this hormone all along their transit. Estradiol could regulate the different steps of spermatozoa maturations undertaken to acquire the fertilizing ability: survival, motility, capacitation and acrosome reaction. We have tested the effects of estradiol on motility and capacitation of ejaculated spermatozoa from 4 stallions. Estradiol inhibited the motility of freshly ejaculated spermatozoa through the activation of G protein-coupled estrogen receptor. Addition of estradiol in the INRA96 conservation medium resulted in an increase of rapid spermatozoa rate after 24h conservation at 4°C. This effect occurred via estrogen receptors alpha and beta. In conclusion, the study of the effects of estradiol on spermatozoa functions could improve the zootechnic methods applied to conserve semen.

Key-words: spermatozoa, motility, estradiol, receptors, conservation.



Introduction

L'espèce équine présente des individus inégaux en terme de capacité reproductrice, essentiellement parce que la sélection est basée sur la généalogie, l'apparence ou les performances sportives, avec peu de considération pour la fertilité ou la fécondité potentielle (Neild *et al.*, 2005). Chez les mâles, il existe des individus fertiles, sub-fertiles et infertiles, de plus certains étalons fertiles en monte naturelle et en insémination en frais présentent des altérations des paramètres de fertilité ou de mobilité si la semence est réfrigérée ou congelée. Ceci peut être un frein à l'utilisation de l'insémination artificielle et la fertilité de certains étalons pourrait être améliorée par la mise en place de nouveaux outils dérivés des dernières connaissances en endocrinologie moléculaire.

En effet, le spermatozoïde produit au sein du testicule doit encore subir des maturations au cours de son trajet dans les voies génitales mâles puis femelles pour acquérir sa capacité de fécondance. Lors de son transit épидидymaire, le spermatozoïde acquiert sa mobilité, subit des modifications protéiques et les spermatozoïdes morts sont éliminés. Les spermatozoïdes y sont également stockés en attente de l'éjaculation. Dans le tractus génital femelle, les spermatozoïdes subissent la capacitation, l'hyperactivation puis la réaction acrosomique afin de pouvoir féconder l'ovocyte. Des facteurs produits par le testicule, l'épididyme puis par le tractus génital femelle régulent ces diverses étapes. L'ensemble de ces facteurs n'est pas connu. L'estradiol est un candidat potentiel puisqu'il est synthétisé dans le testicule, l'épididyme puis le tractus génital femelle. Nos travaux ont montré que le spermatozoïde équin possédait les trois récepteurs aux œstrogènes connus (ER α , ER β et GPER) (Arkoun *et al.*, 2014), l'estradiol est donc capable de réguler une ou plusieurs fonctions du spermatozoïde.

Nous avons donc étudié l'effet de l'incubation en présence d'estradiol sur la mobilité et l'induction de la capacitation. Afin de mieux comprendre l'implication de chaque récepteur dans la transduction du signal lié à l'estradiol, nous avons utilisé le fulvestrant, un antagoniste qui bloque l'activation liée aux récepteurs ER α et ER β et des agonistes qui activent spécifiquement chaque récepteur : PPT pour ER α , DPN pour ER β et G1 pour GPER.

1. Matériels et méthodes

1.1. Prélèvements des échantillons

Les spermatozoïdes de quatre étalons âgés de 12 à 25 ans ont été récoltés à l'aide d'un vagin artificiel à la Jumenterie du Pin en avril et mai. Le sperme a été filtré pour éliminer le gel et les débris, les spermatozoïdes quantifiés par spectrophotométrie puis dilués au quart avec du Tyrode avant centrifugation. L'échantillon a ensuite été centrifugé 5 min., 600g, 37°C afin d'éliminer le plasma séminal. L'échantillon est ensuite ajusté à la concentration de $20 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/ml dans du milieu Tyrode capacitant (Tyrode supplémenté en NaHCO₃ 25 mM et BSA 7 mg/ml) pour les incubations de courte durée ou dans le milieu INRA 96 pour les incubations de 24h à 4°C.

1.2. Incubation des échantillons

Les incubations ont lieu en présence de 17 β œstradiol(E2) à 10^{-7} M pendant 0, 10, 20, 30 min. à 37°C afin d'évaluer le temps d'action de celui-ci. Le plasma séminal étant concentré en œstrogènes à cette période de l'année (Lemazurier *et al.*, 2003), nous avons également incubé les spermatozoïdes en présence de fulvestrant 10^{-7} M, un antagoniste des récepteurs ER α et ER β , afin de bloquer l'effet potentiel des œstrogènes associés aux spermatozoïdes. Enfin, afin de déterminer si le 17 β œstradiol pouvait réguler la mobilité des spermatozoïdes réfrigérés nous avons conservé ceux-ci pendant 24h dans du milieu de conservation INRA96 selon quatre conditions : contrôle, E2 10^{-7} M, fulvestrant 10^{-7} M, E2+fulvestrant 10^{-7} M, les échantillons sont ensuite incubés 10 min. à 37°C puis la mobilité est évaluée.

1.3. Evaluation de la mobilité

A l'issue de ces différentes incubations, la mobilité est évaluée par vidéomicrographie assistée par ordinateur (IVOS, Hamilton-Thorne), deux mesures sont réalisées sur 3 μ l d'échantillon dans une cellule de Makler et l'ensemble des paramètres est mesuré sur 3 champs différents pour chaque mesure. Les paramètres mesurés sont les suivants : taux de spermatozoïdes ayant une vitesse rapide ($v \geq 40 \mu$ m/s), pourcentage de spermatozoïdes ayant une vitesse progressive (spermatozoïde rapide avec rectitude $\geq 80\%$), amplitude de déplacement de la tête (ALH, μ m), vitesse curviligne (VCL, μ m/s), vitesse linéaire (VSL, μ m/s), vitesse moyenne de trajet (VAP, μ m/s), fréquence de battement (BCF, Hertz), la linéarité $LIN = (VSL/VCL) \cdot 100$, la rectitude $STR = (VSL/VAP) \cdot 100$ et le taux d'oscillation $WOB = (VAP/VCL) \cdot 100$. Les résultats sont ensuite



analysés à l'aide du logiciel InStat (Graphpad Software) en réalisant le test de Tukey ou test de Dunett après ANOVA.

1.4. Evaluation de la capacitation

La capacitation a été induite en appliquant le protocole suivant : incubation en milieu Tyrode (Rathi *et al.*, 2001) supplémenté en BSA (7mg/ml) et bicarbonate (25 mM), pendant 3 heures, à 37°C (Pommer *et al.*, 2003). La capacitation est ensuite détectée par mesure de la phosphorylation de tyrosines par immunocytochimie à l'aide de l'anticorps monoclonal 4G10 (Cell Signaling Technology) (Pommer *et al.* 2003 ; McPartlin *et al.*, 2008) en cytométrie en flux, et visualisée en microscopie confocale.

2. Résultats

Nous avons tout d'abord évalué l'effet du 17 β œstradiol à la dose de 10⁻⁷ M sur la mobilité des spermatozoïdes fraîchement éjaculés pendant différents temps d'incubation : T0, T10, T20, T30 min.

On observe un effet significatif de la présence d'œstradiol sur le taux de spermatozoïdes progressifs, qui est significativement diminué à 20 minutes d'incubation (témoin 22,416% \pm 3,951 versus œstradiol 10⁻⁷ M 17,791% + 3,008). Pour les autres paramètres analysés (pourcentage de spermatozoïdes rapides, vitesses curviligne, linéaire, moyenne), on n'observe aucune variation significative aux trois temps (10, 20, 30 minutes) considérés.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu, nous avons ensuite incubé les spermatozoïdes en présence des agonistes de chaque récepteur à l'œstradiol pour déterminer le ou les récepteurs mis en jeu (tableau 1).

Tableau 1 : Effet des agonistes des récepteurs aux estrogènes sur la mobilité des spermatozoïdes après 20 minutes d'incubation.

Table 1: Effect of estrogen receptors agonists on spermatozoa motility after 20 minutes incubation.

	Progressifs	Rapides	VSL	VCL	VAP
Témoin	10,656 + 4,449	27,938 + 14,904	62,513 + 7,431	177,97 + 23,26	89,772 + 13,384
œstradiol 10 ⁻⁷ M	10 + 3,924	25,656 + 13,933	62,309 + 9,572	179,32 + 23,653	89,291 + 13,974
G1 10 ⁻⁶ M	8 + 5,070 a	21 + 13,177 a	56,713 + 11,080 a	169,53 + 29,315	81,659 + 15,713 a
PPT 10 ⁻⁷ M	9,344 + 4,007	23,344 + 13,196	60,378 + 8,876	172,11 + 25,229	86,025 + 12,057
DPN 10 ⁻⁷ M	9,375 + 4,326	24,063 + 14,491	58,384 + 10,192	177,65 + 29,537	86,666 + 15,375

Les données sont exprimées en moyenne + écart type pour 4 manipulations différentes sur 4 animaux, **a** : valeur significativement différente du témoin.

Nous observons un effet significatif sur tous les paramètres, exceptée la vitesse curviligne (VCL), de l'ajout de G1, agoniste spécifique du récepteur GPER. L'activation de GPER entraîne une diminution significative du taux de spermatozoïdes progressifs, rapides, de la vitesse linéaire (VSL) et de la vitesse moyenne (VAP).

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de l'ajout d'œstradiol dans le milieu de conservation INRA96 pendant 24h de réfrigération à 4°C.

Tableau 2 : Effet de l'œstradiol sur la mobilité de spermatozoïdes conservés 24h à 4°C.

Table 2: Effect of estradiol on motility of cooled spermatozoa.

	Progressifs	Rapides	VSL	VCL	VAP
INRA96	17,7 + 4,425	35,60 + 3,908	69,371 + 3,185	226,93 + 9,174	106,18 + 6,155
INRA96+œstradiol 10 ⁻⁷ M	17,55 + 3,148	41,475 + 4,059 a	70,567 + 3,030	221,70 + 10,452	105,05 + 5,643
INRA96+ fulvestrant 10 ⁻⁷ M	15,875 + 3,479	39,775 + 3,924	68,854 + 3,443	228,86 + 9,951	105,58 + 6,152
INRA96 + œstradiol 10 ⁻⁷ M + fulvestrant 10 ⁻⁷ M	18,225 + 4,884	39,475 + 18,307	68,288 + 3,884	223,10 + 11,510	103,26 + 6,54

Les données sont exprimées en moyenne + écart type pour trois manipulations différentes sur quatre animaux, **a** : valeur significativement différente par rapport au témoin.



Nous observons un effet significatif de l'ajout d'estradiol sur le taux de spermatozoïdes rapides qui est augmenté après 24 heures de conservation à 4°C. Cet effet est aboli en présence de fulvestrant, un antagoniste spécifique des récepteurs ER α et ER β .

Nous avons également évalué l'effet de l'ajout d'estradiol sur la capacitation. Après trois heures d'incubation, nous n'observons aucun effet de l'estradiol sur le taux de spermatozoïdes capacités ou non capacités.

3. Discussion

Nous avons donc mis en évidence un effet du 17 β estradiol sur la mobilité du spermatozoïde fraîchement éjaculé. Nous observons d'abord que le taux des spermatozoïdes progressifs est diminué après 20 minutes d'incubation en présence d'estradiol. Afin de déterminer quel récepteur est activé pour exercer cet effet, nous avons incubé les spermatozoïdes en présence des agonistes de chacun des trois récepteurs à l'estradiol connu (ER α , ER β et GPER). Nous observons un effet significatif uniquement après activation du récepteur transmembranaire GPER. L'activation de GPER entraîne une inhibition significative des taux de spermatozoïdes rapides, progressifs et des vitesses moyenne et curviligne. L'estradiol va donc, par un effet rapide et médié par un récepteur localisé à la membrane, inhiber la mobilité des spermatozoïdes. Il ne semble pas, sur la population de spermatozoïdes fraîchement éjaculés, que les récepteurs ER α et ER β soient mobilisés. En revanche, lorsque l'on mesure la mobilité des spermatozoïdes après réfrigération à 4°C pendant 24 heures, on observe en présence d'estradiol, une augmentation significative des taux de spermatozoïdes rapides, et cet effet est aboli en présence de l'antagoniste spécifique des récepteurs ER α et ER β , le fulvestrant. On observe donc des effets qui semblent antagonistes de l'estradiol sur des temps courts (20 minutes) et des temps longs (24h) d'incubation, effets qui ne semblent pas mobiliser les mêmes récepteurs, GPER après éjaculation et ER α et/ou ER β après conservation. On peut émettre l'hypothèse que l'estradiol agirait en tant qu'agent protecteur lorsque les spermatozoïdes sont stockés dans les trompes en attente de l'ovocyte. Il agirait en réprimant la mobilité dans un premier temps car les spermatozoïdes stockés doivent rester dans un état quiescent, de plus l'absence d'effet visible sur la capacitation va dans le même sens. Chez l'homme, il a été montré que l'estradiol active les voies anti-apoptotiques, de protection contre la mort cellulaire programmée, (Guido *et al.*, 2011). Il serait donc intéressant maintenant, de déterminer si la présence d'estradiol dans le milieu de conservation peut protéger les spermatozoïdes de l'entrée en apoptose et moduler leur mobilité.

Remerciements

Nous remercions tout le personnel de la Jumenterie du Pin pour les prélèvements de sperme d'étalon.

Références

- Arkoun B, Gautier C, Delalande C, Barrier-Battut I, Guénon I, Goux D, Bouraïma-Lelong H. 2014. Stallion spermatozoa: putative target of estrogens; presence of the estrogen receptors ESR1, ESR2 and identification of the estrogen-membrane receptor GPER. *Gen Comp Endocrinol.* 200:35-43.
- Guido C, Perrotta I, Panza S, Middea E, Avena P, Santoro M, Marsico S, Imbrogno P, Andò S, Aquila S. 2011. Human sperm physiology: estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *J Cell Physiol.* 226(12):3403-12.
- Lemazurier E, Moslemi S, Sourdain P, Desjardins I, Plainfosse B, Seralini GE. 2002. Free and conjugated estrogens and androgens in stallion semen. *Gen Comp Endocrinol.* 125(2):272-82.
- McPartlin LA, Littell J, Mark E, Nelson JL, Travis AJ, Bedford-Guaus SJ. 2008. A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis. *Theriogenology.* 69(5):639-50.
- Neild DM, Brouwers JF, Colenbrander B, Agüero A, Gadella BM. 2005. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 72(2):230-8.
- Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA. 2003. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod.* 68(4):1208-14.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod.* 65(2):462-70.