



Camille Gautier

Sous la direction d'Hélène Bouraïma-Lelong
EA2608-USC INRA2006, OeReCa, Université de Caen

La qualité du gamète mâle dépend du succès de plusieurs étapes. En premier lieu, la spermatogenèse qui s'effectue dans le testicule et plus particulièrement dans les tubes séminifères. Celle-ci est sous le contrôle de facteurs endocrines (LH et FSH) qui régulent les fonctions des cellules de Leydig et cellules de Sertoli. Ces cellules sécrètent elles-mêmes des facteurs paracrines comme la testostérone qui contrôlent la spermatogenèse. Puis les spermatozoïdes doivent subir des maturations successives qui se déroulent dans le tractus génital mâle puis femelle ce qui lui permet *in fine* d'acquies sa capacité de fécondance. Chez l'étalon, les facteurs paracrines impliqués dans le contrôle de ces événements sont très peu connus. Les œstrogènes sont de très bons candidats, étant synthétisés en quantité très importante dans le testicule notamment par les cellules de Leydig (Almadhidi *et al.*, 1995) et pouvant agir en se fixant sur leurs récepteurs (ESR1 ou ER α , ESR2 ou ER β), localisés dans les cellules somatiques ainsi que germinales (Parlevliet *et al.*, 2006). De plus, dans une étude récente réalisée au laboratoire, nous avons mis en évidence que les spermatozoïdes eux-mêmes pouvaient être cibles des œstrogènes car ils possèdent les trois récepteurs décrits ESR1, ESR2 et GPER (Arkoun *et al.*, soumis).

Nous proposons donc d'étudier le rôle des œstrogènes dans le contrôle de la prolifération, de l'apoptose et de la stéroïdogénèse du testicule équin. Nous étudierons ces effets sur des cellules somatiques, les cellules de Leydig qui sont la source principale des œstrogènes mais qui peuvent y répondre, étant positives pour la détection des récepteurs ESR1 et ESR2, nous réaliserons les mêmes études (prolifération, apoptose) sur les cellules de Sertoli et les cellules germinales, ces cellules étant également positives pour la détection des récepteurs aux œstrogènes (Pearl *et al.*, 2011).

Ces études seront réalisées par analyse moléculaire et cellulaire *in vitro* à partir de cellules testiculaires récupérées après castration. Les testicules d'animaux prépubères ou pubères seront dissociés mécaniquement et enzymatiquement afin d'isoler d'une part les cellules de Leydig et d'autre part les tubes séminifères contenant cellules de Sertoli et cellules germinales qui garderont leurs associations spécifiques. Les différents types cellulaires seront alors cultivés selon un protocole décrit dans la littérature (Roser *et al.*, ...). La prolifération sera évaluée par incorporation de BrDU et l'apoptose par activation des caspases 3 et 7. L'implication des récepteurs sera étudié par utilisation d'agonistes et antagonistes spécifiques de chaque forme (ICI antagoniste ESR1 et 2, PPT agoniste ESR1, DPN agoniste ESR2). Les mécanismes de signalisation associés aux récepteurs (génomiques ou no-génomiques) seront également étudiés et notamment les interactions des récepteurs aux œstrogènes avec la signalisation calcique qui seront étudiées en collaboration avec le Pr Fatima Silva, UFSC, Florianopolis, Brésil. Nous nous intéresserons également à la localisation et la contribution potentielle du récepteur à 7 domaines transmembranaires GPER, qui est capable de lier les œstrogènes. Il n'a jamais été étudié chez l'étalon et nous n'avons aucune donnée sur sa possible localisation dans le testicule. Nous étudierons donc sa localisation par immunohistochimie.

Dans la seconde partie l'objectif sera de déterminer les implications des œstrogènes dans les maturations post-éjaculation du spermatozoïde et l'utilisation potentielle des récepteurs aux œstrogènes en tant que marqueurs moléculaires de la qualité du gamète. Les maturations subies par le spermatozoïde dans le tractus génital femelle pour acquies sa capacité de fécondance (capacitation, hyperactivation, réaction acrosomique) seront analysées en présence d'œstrogènes. Une étude mécanistique sera effectuée en utilisant les agonistes et antagonistes spécifiques de chaque récepteur afin d'évaluer la part respective de chaque récepteur. L'implication des œstrogènes dans le contrôle de la mobilité et la protection contre l'apoptose seront également étudiées. Ces études seront réalisées *in vitro*. Pour l'étude du lien potentiel entre taux des récepteurs et qualité du gamète, les récepteurs aux œstrogènes seront quantifiés par cytométrie en flux sur des échantillons de mobilité variable, de résistance à la congélation variable et de races différentes.

Pour l'ensemble de ces études les échantillons de spermatozoïdes seront obtenus grâce à une collaboration avec la jumenterie du Pin (IFCE) initiée depuis juin 2010, et avec la société Equitechnic. Les testicules seront récupérés auprès de vétérinaires.

L'ensemble de ces études permettra donc de mieux comprendre l'implication des œstrogènes dans l'obtention d'un spermatozoïde de qualité.