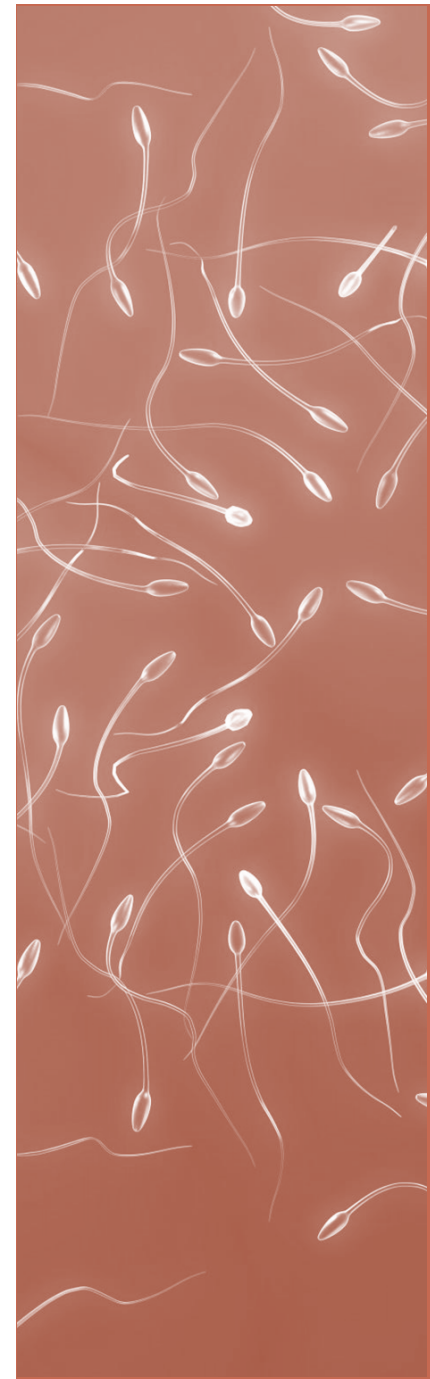


17684

# ÉVALUATION DE L'INTEGRITÉ DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DU SPERMATOZOÏDE DU EQUIN

*Miguel Bliedernicht, DVM*

FORMATION DE CHEF DE CENTRE  
HARAS DU PIN, JANVIER 2015



# LA MEMBRANE PLASMIQUE DU SPERMATOZOÏDE ÉQUIN

- Structure en bicouche qui entoure toute la superficie du spermatozoïde.
- Composition:
  - Lipides
  - Protéines
  - Hydrates de Charbon
    - Glycolipides
    - Glycoprotéines

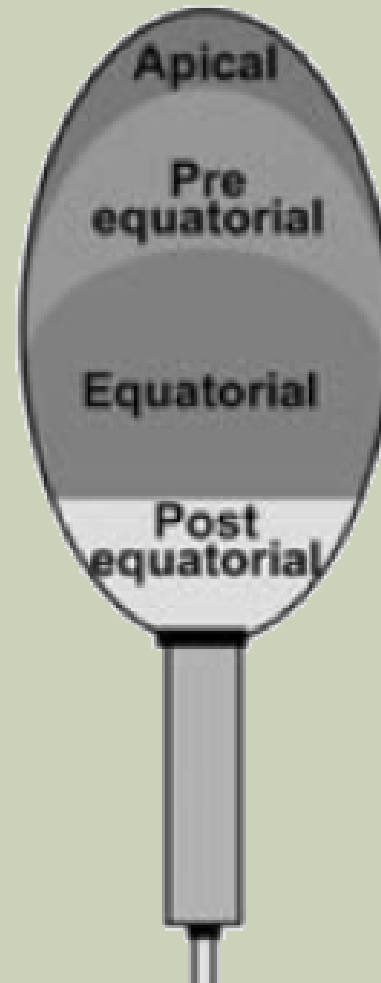
# LA MEMBRANE PLASMIQUE DU SPERMATOZOÏDE ÉQUIN

- **Fonction:**
  - Survie cellulaire
  - Création des gradients ioniques
  - Facilitation d'entrer des molécules de grande dimension
  - Régulation de la signalisation cellulaire
- Indispensable pour la fertilisation de l'ovocyte
- Son intégrité n'est pas liée avec la mobilité

# LA MEMBRANE PLASMIQUE DU SPERMATOZOÏDE ÉQUINE

## ■ 4 domaines spécifiques:

- Apical
- Pré-apical
- Equatorial
- Post-équatorial



# EFFETS DE LA CONGÉLATION DANS LA INTÉGRITÉ DE LA MEMBRANE DU SPERMATOZOÏDE

- Risque de potentiel blessure de la membrane:
  - Changements de température
  - Stress osmotique et toxique
    - Exposition aux cryoprotecteurs
    - Formation et dissolution des cristaux de glace dans la cellule

# EFFETS DE LA CONGÉLATION DANS L'INTÉGRITÉ DE LA MEMBRANE DU SPERMATOZOÏDE

- Blessures liées à la cryoconservation:
  - Perte de mobilité progressive
  - Changements morphologiques de la chromatine
  - Perméabilisation de la membrane
  - Déstabilisation de la membrane par réorganisation lipidique latérale
  - Formation de ROS (Reactive Oxygen Species)
- Réduit substantiellement la viabilité de la semence équine → Impact majeur sur la fertilité

# TESTS D'INTÉGRITÉ DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DU SPERMATOZOÏDE

- Test Hypo-osmotique (HOST – Hypoosmotic Swelling Test)
- Coloration avec Éosine-Nigrosine
- Sondes Fluorescentes

# TEST HYPO-OSMOTIQUE (HOST)

- Sperme exposé à une solution hypo-osmotique
- L'eau rentre par l'intérieur de la cellule spermatique pour installer un équilibre

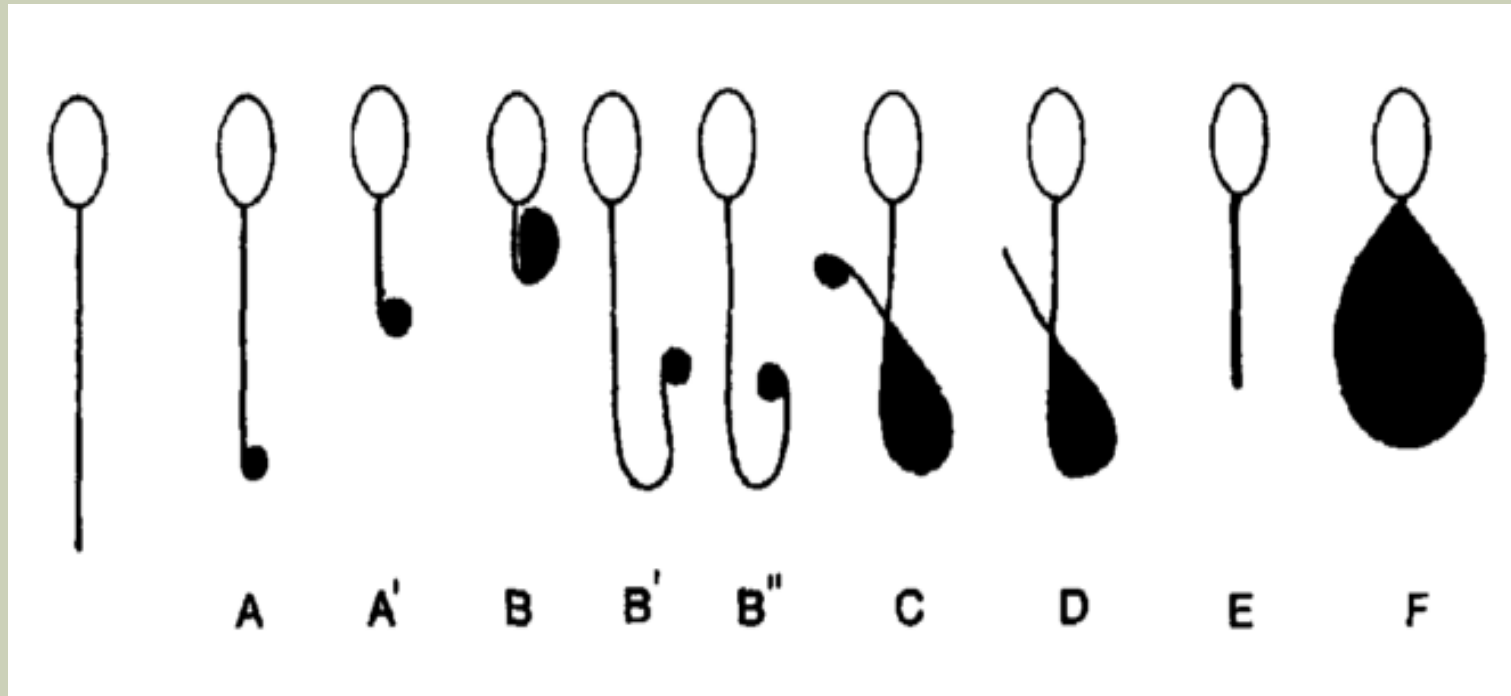


## Gonflement du flagelle

- Analyse structurelle et fonctionnelle de l'intégrité de la membrane couvrant du flagelle



# TEST HYPO-OSMOTIQUE (HOST)

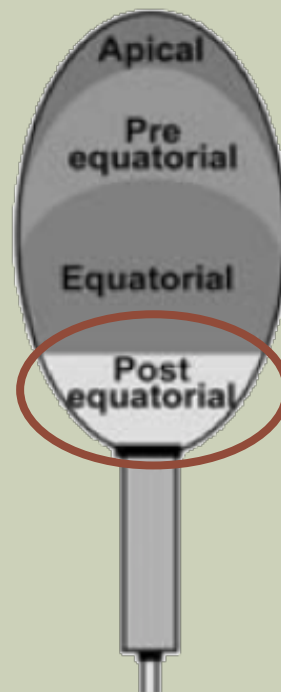


# TEST HYPO-OSMOTIQUE (HOST)

- Solutions Hypo-osmotiques:
  - Fructose + saccharose + lactose + citrate de sodium
    - Temps d'incubation: 30 minutes, 37°C
    - 100, 50 ou 25 mOsm
  - Saccharose + citrate de sodium
    - 100 mOsm
  - Surnageant après centrifugation + eau distillée
    - 100 mOsm
  - NaCl + eau distillée
    - 150 mOsm

# COLORATION AVEC ÉOSINE-NIGROSINE

- Analyse de l'intégrité structurelle du domaine pós-équatorial de la membrane plasmique de la tête de la cellule spermatique



# COLORATION AVEC ÉOSINE-NIGROSINE

- Éosine: Rentre la cellule par la membrane plasmique blessé – tache le DNA de rose
- Nigrosin: Coloration du fond – augmentation du contraste

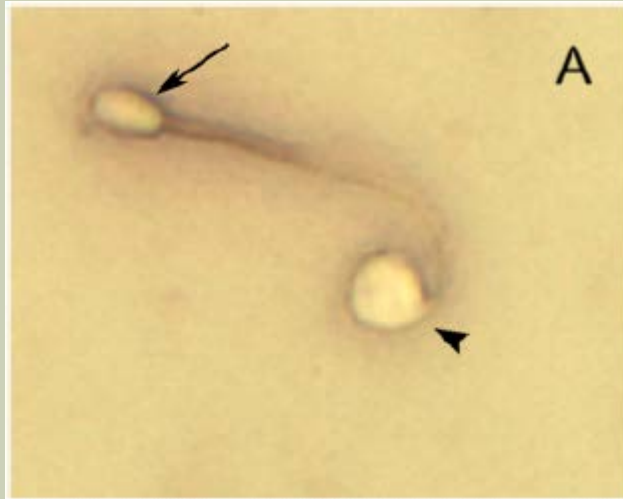


# COLORATION AVEC ÉOSINE-NIGROSINE

- **Technique en une étape:**
  - Solution pré-préparée avec les deux colorants
  
- **Technique en deux étapes:**
  - Colorants sont ajoutés séparément de l'échantillon
  - L'éosine est le premier colorant à être ajouté à l'échantillon

# ASSOCIATION DE LA COLORATION AVEC ÉOSINE-NIGROSINE AVEC L'HOST

- Analyse simultanée de deux parties distinctes de la membrane plasmique du spermatozoïde



# COLORATION AVEC DES SONDÉS FLUORESCENTES

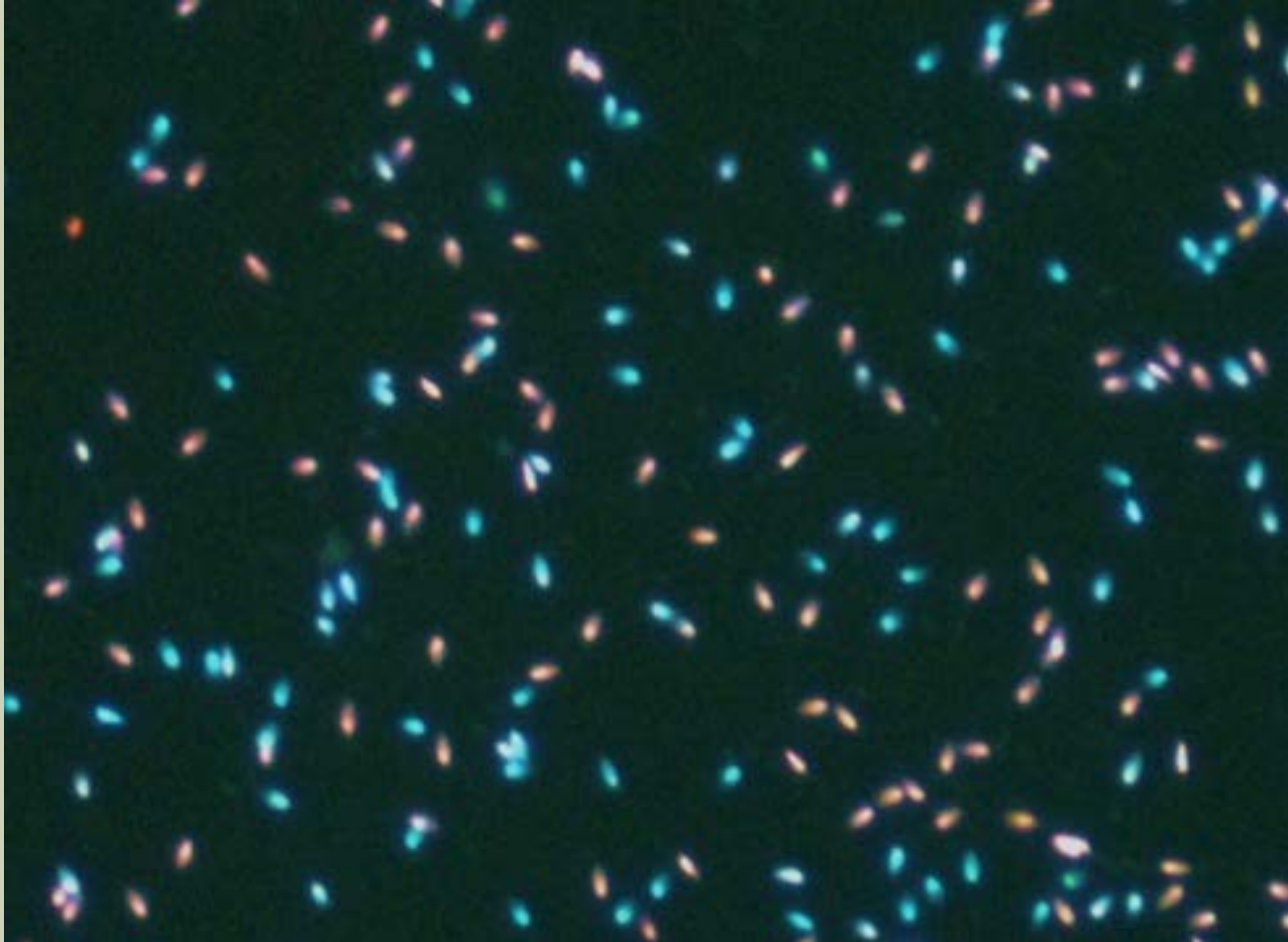
- Principe similaire à la coloration avec éosine-nigrosine
- Sondes fluorescentes capables de rentrer dans la membrane plasmique blessée (région pré-équatorial):
  - Hoescht 33258
  - YoPro-1
  - PI (Propidium Iodide)
  - EH (Ethidium Homodimer-1)
  - EB (Ethidium Bromide)
  - ToPro-3 (Benzotiazolium-4-quinolinium iodide monomer)
  - TOTO (cyanine dimer)

# COLORATION AVEC DES SONDÉS FLUORESCENTES

- Sondes amphipatiques capables de rentrer dans la membrane plasmique intacte:
  - Hoechst 33324
  - CFDA (Carboxifluoresceine Diacetate)
  - CAM (Acetometilcalceine ester)
  - SYTO-1
  - SYBR-14
- Évaluation peut être réalisée sur microscope de fluorescence ou cytométrie de flux



# COLORATION AVEC DES SONDAS FLUORESCENTES



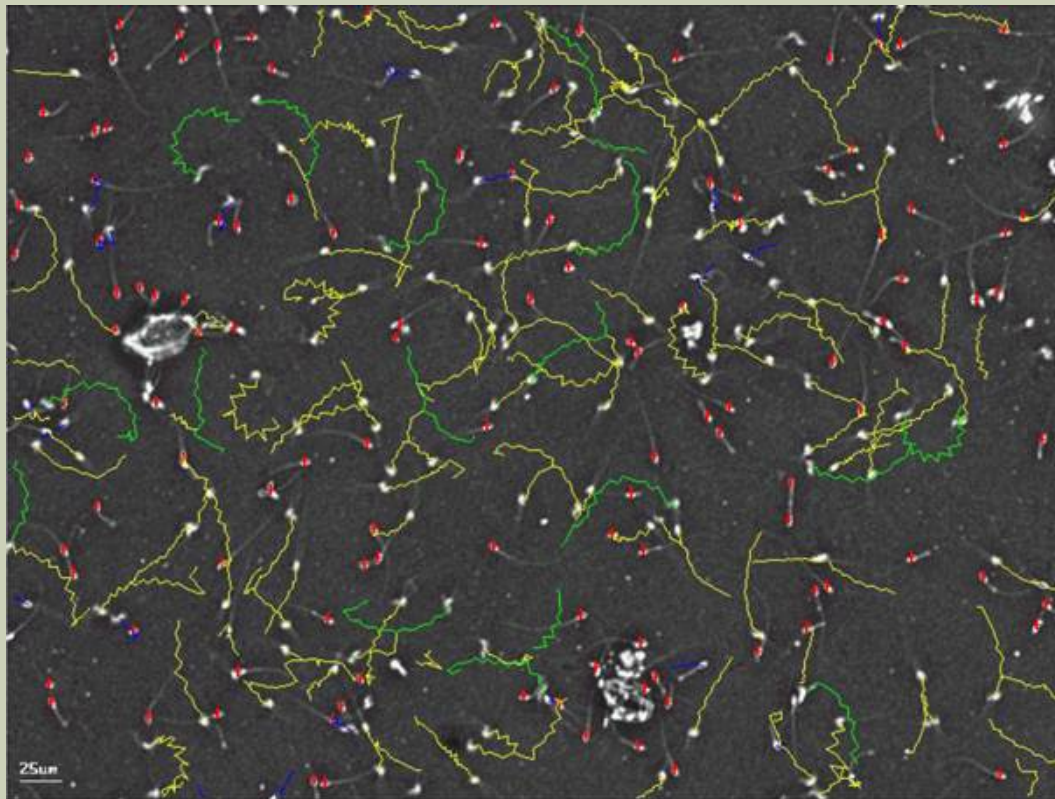
# PARTIE EXPERIMENTALE

- 30 échantillons de semence congelée de 50 chevaux Pur Sang Lusitanien



# MOBILITÉ

- Évaluée avec le système CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*)



# TESTS DE VIABILITÉ

## ■ HOST

- Fructose + citrate de sodium + eau distillée
- 106 mOsm

## ■ Coloration avec éosine-nigrosine (E-N) de l'échantillon précédemment sujet au HOST (EN\_HOST)

## ■ Coloration avec des sondes fluorescentes Évaluation par microscopie de fluorescence

# RESULTATS

	<b>Moyenne</b>	<b>EPM</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>CV</b>
<b>Mobilité Total</b>	<b>51,75</b>	<b>4</b>	<b>8,2</b>	<b>90,3</b>	<b>0,42</b>
<b>HOST (+)</b>	<b>27,55</b>	<b>2,14</b>	<b>8,5</b>	<b>51,5</b>	<b>0,43</b>
<b>E-N (vivants)</b>	<b>20,12</b>	<b>1,96</b>	<b>4,5</b>	<b>41</b>	<b>0,53</b>
<b>EN_HOST (vivants +)</b>	<b>17,78</b>	<b>1,8</b>	<b>4</b>	<b>39</b>	<b>0,56</b>
<b>Fluorescence (vivants)</b>	<b>25,62</b>	<b>2,3</b>	<b>6,9</b>	<b>54,2</b>	<b>0,49</b>

# ANALYSE STATISTIQUE

- **Corrélation de Spearman (r)**
- **Concordance de Kendall (W)**

<b>Corrélation/Concordance</b>	0,9-1	Très fort
	0,7-0,9	fort
	0,4-0,7	modéré
	0,2 - 0,4	faible
	<0,2	Très faible
<b>Signifiant (p)</b>	<0,05	significative

- **Analyse des proportions d'association du HOST+E-N**

# HOST VS E-N

- **HOST fortement corrélé avec E-N ( $r=0,871$ ;  $p=0,000$ )**
- **Fort degré de concordance ( $W=0,871$ ;  $p=0,000$ )**
  
- **Proportion de “concordants” = 88%**  
(“vivants(+) + morts(-)”)
- **Proportion de “non-concordants” = 12%**  
(“vivants(-) + morts(+))

# FLUORESCENCE VS HOST, E-N ET EN\_HOST

Concordance de Kendall (Correlation de Spearman)	Fluorescence
HOST	W=0,018; p=0,465 (r=0,779; p=0,000)
E-N	W=0,284; p=0,003 (r=0,781; p=0,000)
EN_HOST	W=0,608; p=0,000 (r=0,803; p=0,000)



# MOBILITÉ VS TESTS DE VIABILITÉ

Correlation de Spearman	Mobilité Total
HOST	$r=0,310$ ; $p=0,096$
E-N	$r=0,479$ ; $p=0,007$
EN_HOST	$r=0,455$ ; $p=0,011$
Fluorescence	$r=0,484$ ; $p=0,007$

# CONCLUSIONS

- L'HOST a montré une sensibilité plus marquée dans la détection de l'intégrité de la membrane
- L'HOST était plus distincte de la mobilité totale
- L'HOST et E-N, même corrélés, ne sont pas concordants – Tests différents
- La fluorescence a montré plus de sensibilité que la coloration E-N
- La fluorescence a une forte corrélation et une concordance modérée avec l'HOST – Possible remplacement?

# CONCLUSIONS

- **Corrélations faibles des tests de vitalité avec la mobilité totale**



**Importance de son inclusion dans les analyses de routine**



**Grand avantage pour prédire  
le potentiel de fécondité d'un étalon**

**Merci pour votre attention**

EmbriO Vet