

Les techniques d'évaluation de la qualité de la semence : Quelles perspectives ?

Michèle Magistrini

Inra (UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements - Nouzilly)

Depuis le début des études sur la semence des mammifères domestiques et de l'espèce équine en particulier qui ont débutées en Russie et au Japon dans les années 20 puis se sont développées aux Etats-Unis et en Europe dans les années 70 et 80, les scientifiques se sont intéressés en parallèle à la conservation de la semence et à l'évaluation de sa qualité. Les premiers critères quantitatifs (tels que la concentration, le volume de l'éjaculat) et qualitatifs (tels que la mobilité, la viabilité, les formes anormales des spermatozoïdes) décrits par ces auteurs sont toujours d'actualité et sont utilisés en routine dans les laboratoires qu'ils soient de recherche ou de terrain.

Depuis les années 90, l'utilisation de nouvelles molécules ou association de molécules fluorescentes spécifiques de certains compartiments ou de certaines fonctions cellulaires a permis de diversifier les techniques d'évaluation de la qualité des spermatozoïdes. Cependant, l'utilisation en routine de telles techniques nécessitait le développement d'outils de mesure fiable de la fluorescence autre que la microscopie optique. En effet, jusque récemment, les outils de mesure (cytomètre en flux) existaient mais leur complexité, leur disponibilité et leur coût les rendaient pratiquement inaccessibles. L'évolution des techniques depuis quelques années et en particulier leur simplification rend désormais ces cytomètres en flux accessibles à des laboratoires en dehors des instituts de recherche. Aussi, notre laboratoire et celui de la Jumenterie du Pin se sont équipés du même cytomètre de paillasse (Guava EasyCyte, Millipore, IMV-Technologie). De plus nous disposons dans nos deux laboratoires d'analyseurs de mobilité automatisés (IVOS, Hamilton Thorne, USA). Enfin, la proximité des outils de mesure et des animaux est aussi un atout important pour la réalisation de nos travaux.

Les sondes fluorescentes spécifiques de différentes fonctions cellulaires ont ainsi été adaptées au modèle « spermatozoïdes » et leur utilisation est résumée ci-dessous.

L'intégrité de la membrane plasmique des cellules peut être évaluée de différentes façons 1) avec le « kit de viabilité » associant 2 sondes fluorescentes SYBR-14 / Iodure de Propidium ; les spermatozoïdes « vivants » émettent une fluorescence verte et les spermatozoïdes morts une fluorescence rouge, ou bien 2) l'association de la 6-carboxyfluorescéine (ou CFDA) et de l'Iodure de Propidium, évaluent l'intégrité et la fonctionnalité de la membrane (respectivement fluorescence verte et rouge), ou bien encore 3) le test hypo-osmotique mis au point dans les années 80 adapté et associé à l'Iodure de Propidium dans notre laboratoire et dans celui de la Jumenterie du Pin (fluorescence rouge).

Il nous est possible également d'analyser **l'intégrité et la réactivité de l'acrosome** qui est un des éléments clé dans le mécanisme de la fécondation. Pour cela, nous utilisons des lectines (PSA, Pisum Sativum Agglutinine ; PNA, Peanut Agglutinine) couplées à un marqueur fluorescent l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, fluorescence verte).

De même, **les mitochondries**, organites cellulaires présents dans la pièce intermédiaire des spermatozoïdes et produisant l'énergie nécessaire à leur mobilité doivent être fonctionnelles. Leur intégrité et leur fonctionnalité peuvent être évaluées par la rhodamine 123 (associée à l'Iodure de Propidium) ou la JC-1.

Il nous est aussi possible de mesurer **la composition en lipides de la membrane plasmique des spermatozoïdes** via les sondes fluorescentes spécifiques des phospholipides (la Mérocyanine 540) ainsi que **leur taux d'oxydation** (C11 Bodipy).

Enfin, **l'intégrité de l'ADN** du noyau des spermatozoïdes peut être estimée à l'aide de la sonde fluorescente (Acridine Orange) ; différents travaux montrent la relation entre la condensation de la chromatine du noyau et la fertilité.

Outre ces techniques de mesures des fonctions cellulaires faisant appel à la fluorescence, l'analyse des caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes à l'aide d'analyseurs automatisés de la mobilité doit également être réalisée.

En conclusion, de nombreuses publications montrent que des corrélations existent entre la plupart de ces paramètres et la fertilité des étalons ; cependant, un seul de ces critères ne peut à lui seul « prédire » la fertilité. Il est donc indispensable 1) d'analyser ces critères de qualité simultanément sur un même échantillon de semence puis 2) de les associer afin d'identifier ceux qui sont les plus pertinents et 3) de déterminer des seuils pour chacun d'entre eux.

En effet, seule la définition de seuils pour les critères de qualité des spermatozoïdes retenus et l'analyse de ces critères sur la semence d'un nombre important d'animaux ayant des données de fertilité parfaitement connues, nous permettra d'évaluer avec une fiabilité élevée la fertilité d'un étalon. De tels travaux très prometteurs sont actuellement menés à la Jumenterie du Pin par Isabelle Barrier et ses collaborateurs ainsi que dans notre laboratoire à l'INRA de Nouzilly.

Notes
