

Mise au point d'une méthode de congélation de la semence de pintade.

COMPTE RENDU FINAL

1 - Introduction.

Ce programme a comporté deux parties, une partie technique ayant comme objectif concret de fournir une méthode de congélation du sperme de pintade permettant la sauvegarde de patrimoine génétique, et une partie cognitive visant à acquérir des informations sur le spermatozoïde de pintade et notamment sur ses caractéristiques membranaires.

Les connaissances acquises grâce aux travaux réalisés dans cette seconde partie devant permettre d'optimiser la technique de congélation afin d'obtenir les meilleurs taux de fertilité possibles.

2 - Congélation de la semence chez la pintade.

2-1- Technique de congélation en billes.

La technique «coq» a été essayée telle quelle et avec diverses modifications (taux de dilution, dilueur, apport du cryoprotecteur, temps d'équilibration). Les taux de survie n'ont jamais dépassés 16%. Il semble néanmoins que des forts taux de dilution soient plutôt favorables.

La technique en billes a été abandonnée et la technique en paillettes a été testée avec un taux de dilution de 1/8.

2-2- Technique de congélation en paillettes.

Le premier protocole avec cette technique n'a pas permis d'augmenter les taux de survie des spermatozoïdes. Par contre un nouveau dilueur (BPSE) a permis de mettre en évidence un effet favorable des vitesses de congélation de l'ordre de 15 à 30°C/mn. Ceci a permis une augmentation significative des taux de survie à un niveau de l'ordre de 30%.

Les protocoles suivants ont permis d'améliorer la technique en optimisant de nombreux paramètres : cryoprotecteur, dilueur, temps d'équilibration, vitesse de congélation, mode d'apport du cryoprotecteur.

A ce stade le taux de survie *in vitro* des spermatozoïdes est de 40 à 45% suivant les protocoles.

Il faut néanmoins remarquer la mauvaise répétabilité des résultats au cours des protocoles successifs. Le très faible volume des éjaculats de pintade, la faible qualité initiale du sperme et la variabilité de qualité des mélanges hétérospermiques utilisés comme « matière première » pour les protocoles expliquent ces variations de résultats.

Ainsi le premier test *in vivo*, réalisé avec du sperme de mauvaise qualité et de faible concentration, a conduit à des taux de fertilité variant de 3% à 15%.

La concentration du sperme étant également variable d'un mélange de sperme à l'autre, il a été décidé de ne plus appliquer un taux de dilution systématique, mais de ramener le sperme à une concentration finale qui a été définie comme optimale *in vitro* de 1,5 milliards spz/ml.

Pour chaque cryoprotecteur, un taux d'incorporation optimum est à définir entre son effet protecteur vis à vis de la congélation et une certaine toxicité pour les cellules. Le taux de DMF a été confirmé à 6% et des taux de survie de 45% ont de nouveau été obtenus in vitro.

Des dilueurs de différentes composition ont été testés. Les deux meilleurs dilueurs sont ceux contenant du myo-inositol (BHSV et IGGK).

Un second test in vivo a été réalisé afin de comparer ces deux dilueurs ainsi que la concentration finale du sperme. Il se confirme que la concentration finale du sperme donnant les meilleurs taux de survie in vitro (1,5 milliards spz/ml) n'est pas compatible avec les besoins des femelles. Le sperme ainsi inséminé ne contient pas assez de spermatozoïdes de bonne qualité pour permettre une bonne fertilité.

Les meilleurs taux de fertilité sont obtenus avec un sperme plus concentré (3 milliards spz/ml), ils sont de l'ordre de 20%.

2-3- Discussion et conclusions de la partie technique.

Les nombreux protocoles faisant varier les paramètres de l'ensemble du processus de congélation-décongélation ont permis d'optimiser la technique de congélation en paillettes du sperme de pintade. Les résultats obtenus in vitro ont été considérablement améliorés puisque les taux de survie des spermatozoïdes de l'ordre de 10% obtenus au début de ce programme ont été élevés à 45%.

Ces taux de survie in vitro sont particulièrement bons comparés à ceux obtenus chez le coq (environ 40%) dont le sperme congelé assure de bons taux de fertilité.

Mais les conditions in vitro ne correspondent pas aux besoins in vivo des femelles et les taux de fertilité obtenus chez la pintade avec du sperme congelé sont finalement en moyenne de 20%.

Cela permet néanmoins d'envisager la sauvegarde de patrimoine génétique par cette technique.

3- Caractérisation des spermatozoïdes de pintade.

Comme prévu dans ce programme, des travaux cognitifs ont été initiés en vue de caractériser des paramètres physiques du sperme de pintade. Compte tenu de l'impossibilité d'obtenir des taux de fertilité élevés chez cette espèce, du fait que le sperme est initialement de très mauvaise qualité, plusieurs caractéristiques ont été analysées. Elles ont toutes nécessité des mises au point méthodologiques importantes et un très gros travail de prises de mesures.

Les caractéristiques étudiées sont :

- la résistance aux chocs osmotiques,
- la fluidité membranaire,
- la composition membranaire en phospholipides et en cholestérol.

3-1 Résistance aux chocs osmotiques.

Une étude a été entreprise sur la résistance des spermatozoïdes aux chocs osmotiques. La mesure directe par microscopie optique des variations de volume des spermatozoïdes a été abandonnée faute de pouvoir estimer précisément ces faibles variations par analyse d'images.

La cytométrie de flux a été retenue comme la technique pouvant fournir des informations dans ce domaine.

La cytométrie de flux doit permettre de mesurer des valeurs physiques telles que l'osmolarité critique, la perméabilité à l'eau. Elle est une première étape dans la connaissance de la membrane plasmique du spermatozoïde de pintade.

Deux colorants fluorescents ont été utilisés, le SYBR 14 et l'IP (Iodure de Propidium). Ils permettent d'éliminer les débris cellulaires des comptages et d'identifier les spermatozoïdes dont les membranes sont altérées.

Le cytomètre en flux compte 10000 spermatozoïdes colorés en 10 secondes et enregistre différents paramètres de diffusion de lumière des fluorochromes.

La technique est très précise et permet de mettre en évidence des faibles variations du volume cellulaire par analyse de la diffusion frontale de la lumière chez des spermatozoïdes choqués à 80 mosm ou 40 mosm pendant 5 ou 15 minutes.

Dans une première phase d'approche de la cytométrie en flux, les travaux ont consisté en la mise au point méthodologique de la technique appliquée au sperme de pintade : doses et concentrations des fluorochromes, temps de prise des colorants, niveau et durée du choc osmotique à appliquer.

L'osmolarité critique, sans avoir été mesurée précisément, a été estimée entre 15 et 25 mosm, ce qui est du même ordre que la valeur de 17 mosm trouvée chez le coq (Watson et al. 1992).

Un premier essai, en éjaculats individuels, sur 6 mâles (3 bons et 3 mauvais) a permis de montrer une plus grande sensibilité à un choc osmotique de 25 mosm, des mâles jugés « mauvais » à l'examen microscopique.

Il semblerait donc que les éjaculats de moindre qualité soient plus sensibles à un choc hypo osmotique. Ce qui pourrait être dû à une moins bonne élasticité de la membrane plasmique. Il conviendrait de confirmer ce résultat sur plusieurs répétitions et chez un plus grand nombre d'animaux.

3-2 Fluidité membranaire.

Dans le but de maîtriser le plus d'outils possibles pour caractériser la semence de pintade, la fluidité membranaire du sperme de pintade a été étudiée en comparaison de celles du coq et du dindon.

La fluidité membranaire joue un rôle important dans les échanges trans-membranaires et dans la cohésion cellulaire. Des recherches chez l'homme (Giraud et al., 2000) ont montré que plus la fluidité était élevée avant congélation, plus la motilité était bonne après congélation.

Une bonne fluidité membranaire est synonyme de mouvements moléculaires harmonieux à l'intérieur de la membrane et d'un point de congélation plus bas que si la membrane est rigide.

La mesure de la fluidité membranaire des spermatozoïdes a nécessité l'adaptation d'un test utilisé pour d'autres cellules. Elle se fait par mesure de la valeur d'anisotropie de la lumière après insertion d'un fluorochrome dans la bicouche lipidique.

Plus la valeur d'anisotropie est forte, plus la membrane est rigide.

Sur du sperme frais, quel que soit le délai après collecte auquel la mesure a été effectuée, le sperme de pintade présente des valeurs d'anisotropie (0.20) significativement supérieures à celles du coq (0.15) et du dindon (0.17).

Les membranes plasmiques des spermatozoïdes de pintade sont donc plus rigides que celles des deux autres espèces de gallinacées.

Pour une même espèce, les valeurs d'anisotropie sont plus élevées sur du sperme décongelé que sur du sperme frais. La congélation a donc pour effet (néfaste) de rigidifier les membranes.

Lorsque l'on regarde la qualité du sperme en terme de % de spermatozoïdes vivants dans les éjaculats, on remarque que la pintade a le moins bon taux de spermatozoïdes vivants (60%) dans les éjaculats frais par rapport aux deux autres espèces. Le dindon lui est un peu supérieur (70%), le coq est très supérieur aux deux autres (95%).

En ce qui concerne le sperme décongelé, les valeurs sont beaucoup plus basses dans chacune des espèces, et surtout chez la pintade dont le taux est nettement inférieure à celui obtenu chez le dindon lui même inférieur à celui obtenu chez le coq.

Cette hiérarchie reflète bien celle des taux de fertilité après décongélation: bon chez le coq, moyen chez le dindon et faible chez la pintade.

Les valeurs d'anisotropie sont en accord avec ce classement et il semble bien que la fluidité membranaire soit un critère important dans le succès de la congélation du sperme.

La mauvaise fluidité, ou la trop grande "rigidité" des membranes de spermatozoïdes de pintades ne les prédisposent pas à une bonne congélabilité.

3-3 Dosages du cholestérol et des phospholipides.

Nous avons vu que la fluidité des membranes de spermatozoïdes de pintade est plus basse que celle de spermatozoïdes de dindon, elle-même inférieure à celle de coq. Ces résultats reflètent les différences d'aptitude à la congélation des spermatozoïdes de ces différentes espèces. Or on sait que l'on peut moduler cette fluidité en modifiant par l'alimentation ou les milieux in vitro de congélation les compositions membranaires des cellules. Mais d'ou peuvent bien provenir ces différences de fluidité membranaires chez les spermatozoïdes d'oiseaux domestiques?

Celles ci dépendent en particulier de la composition en lipides des membranes des gamètes. Chez les pintades, on ne connaît que la composition globale en acides gras des spermatozoïdes (Suraï et al, 1998), mais pas les différentes classes de lipides et de phospholipides. Or, on sait chez le coq que le rapport cholestérol/phospholipides des spermatozoïdes peut être relié à l'aptitude à la congélation des spermatozoïdes (Ansah et Buckland, 1982). Pour cette raison, nous avons décidé d'évaluer la composition en classes de lipides et de phospholipides des spermatozoïdes des pintades, et ceci sur des sperme frais ou congelés-décongelés.

3-3-1 Classes de lipides :

Les résultats des différents dosages montrent que les grandes classes de lipides des spermatozoïdes de pintade sont identiques et en proportions équivalentes à celles trouvées chez le dindon et le coq (malgré une tendance non significative à ce que le cholestérol soit en plus forte proportion chez la pintade que chez le coq, le dindon étant intermédiaire). Elles ne peuvent donc pas, seules, expliquer les différences de fluidité membranaires entre ces espèces. Les phospholipides représentent 70 % des lipides totaux et le cholestérol libre près de 24 %. Les deux autres classes représentées par les esters de cholestérol et les triglycérides sont très minoritaires (respectivement environ 5 et 2 % des lipides totaux). La répartition de ces classes de lipides montre bien l'origine membranaire de ceux-ci.

La congélation affecte la répartition des classes de lipides puisqu'on assiste chez la pintade, comme chez le dindon à un effondrement des proportions de cholestérol et donc une surreprésentation des phospholipides. En conséquences, les rapports cholestérol/phospholipides diminuent dans ces deux espèces. Il y a quelques années (Blesbois et al, 1997), nous avons aussi trouvé une telle évolution chez de la semence congelée de coq, mais avec une autre lignée que celle examinée ici pour laquelle aucune évolution significative n'est constatée.

Cet écrasement du cholestérol suite à la congélation chez les spermatozoïdes de pintade, de dindon et certaines lignées de coq a déjà été décrit chez les mammifères comme pouvant représenter une capacitation précoce provoquée par la technique (revu par Travis et Kopf, 2002) et limitant d'autant les chances de fécondation ultérieures. La capacitation est l'ensemble des remaniements membranaires subits par les gamètes pour pouvoir initier la réaction acrosomique qui signale (normalement sur le site de fécondation, mais parfois aussi prématurément in vitro) le début de la fécondation. Chez les oiseaux, la capacitation n'a pas encore été décrite. Elle ne peut à l'heure actuelle pas être évaluée car nous ne disposons pas de test in vitro permettant de la mesurer ou d'évaluer la réaction acrosomique. Ce thème devra d'ailleurs entrer dans nos priorités de programme compte tenu des applications sur la congélation de la semence et la mise au point de critères de qualité des reproducteurs.

3-3-2 Classes de phospholipides :

Les profils des phospholipides des spermatozoïdes de pintade diffèrent quelque peu de ceux du coq et du dindon. Comme dans les autres espèces aviaires préalablement étudiées (Blesbois et al, 1997; Douard et al, 2000) la phosphatidylcholine (PC) est le phospholipide majoritaire chez les spermatozoïdes « frais » de pintade, mais ses proportions sont quand même inférieures à celles retrouvées chez la dinde et surtout chez le coq. La phosphatidylethanolamine (PE) n'est par contre pas le deuxième pic majoritaire, il est remplacé par la sphingomyéline (SM) qui n'était qu'en troisième ou quatrième position chez le dindon et le coq. Enfin, chez la pintade, un pic intermédiaire encore inconnu représente quand même 13% des phospholipides. Après congélation, le profil de phospholipides évolue notablement, mais différemment de ce qui avait été préalablement observé chez le coq. Dans le cas présent, il y a disparition du pic correspondant à l'acide phosphatidique et aux cardiolipides qui n'étaient pas affectés par la congélation chez le coq. La baisse de PC est faible chez la pintade alors qu'elle était drastique chez le coq. On assiste aussi à une perte significative de SM chez la pintade.

La répartition des phospholipides des spermatozoïdes de dindon est donc originale par rapport à celles observées chez le coq et le dindon, sans que l'on puisse encore expliquer si cette originalité a un impact sur la congélabilité des gamètes. La congélation affecte très fortement cette répartition, ce qui ne peut qu'avoir des conséquences drastiques sur le fonctionnement des gamètes et leur aptitude à restaurer la fertilité après cryopréservation.

Une analyse plus fine des lipides dont la proportion ou l'évolution avec la congélation est importante chez les spermatozoïdes de pintade pourra s'avérer dans l'avenir très intéressante pour évaluer les dommages occasionnés par la congélation. Elle devrait permettre d'évaluer la répartition de ces altérations puis leur prévention. On pourra pour cela mettre en place sur les spermatozoïdes de pintade l'utilisation d'un marqueur de déstabilisation des phospholipides membranaires comme la mérocyanine et d'un marqueur spécifique du cholestérol, le filipin pour mieux observer les mouvements de ces composants.

Notons que le cholestérol et les sphingolipides (représentés ici par la SM) qui sont beaucoup affectés par la congélation dans notre expérience, sont des composants majoritaires des « rafts membranaires ». Ces zones spécialisées des membranes plasmiques auraient un rôle fondamental dans les mécanismes de fusion cellulaire comme la fécondation (revue de Travis et Kopf, 2002). Leur altération au cours de la congélation, si nous la confirmons, devra être maîtrisée.

D'une façon générale, la composition en lipides des spermatozoïdes de pintades est bien cohérente avec une origine membranaire et une absence de réserves cytoplasmiques lipidiques. Elle diffère fortement de ce qui est connu chez les autres espèces aviaires par la répartition des phospholipides. Parmi les phospholipides, la SM y a en particulier une place originale.

Les différences globales de composition en lipides ne peuvent cependant pas, seules, expliquer la faible fluidité membranaire des spermatozoïdes de pintade.

Par contre, la congélation de la semence modifie considérablement les lipides des gamètes de pintade. La chute de cholestérol pourrait en particulier être liée à une déstabilisation drastique de la membrane plasmique entraînant réaction acrosomique partielle ou totale puis lyse.

4 - CONCLUSION :

Ce programme a permis de mettre au point une technique de congélation du sperme de pintade.

Les taux de fertilité obtenus ne sont pas très élevés mais suffisants pour permettre la conservation du patrimoine génétique, qui était l'objectif de ce programme.

Les études de différentes caractéristiques de la membrane plasmique des spermatozoïdes de pintade comparée à celle des autres espèces, coq et dindon, font apparaître une faible fluidité membranaire, raison probable de la mauvaise congélabilité.

La composition en lipides est assez différente de celle des deux autres espèces en particulier par la répartition des phospholipides. Elle ne peut, cependant, à elle seule, expliquer la faible fluidité membranaire des spermatozoïdes de pintade.

La congélation de la semence modifie considérablement les lipides membranaires.

La chute significative de cholestérol, cohérente avec la rigidification observée des membranes, explique, très probablement, une grande partie des faibles taux de fertilité obtenus après congélation.