

EFFETS DE LA METFORMINE SUR LA MOBILITE ET LA REACTION ACROSOMIQUE DES SPERMATOZOÏDES DE COQ FRAIS ET CONGELES

**Thi Mong Diep Nguyen¹, François Seigneurin³, Christophe Praud², , Pascal Froment¹,
Elisabeth Blesbois¹**

¹ INRA, Unité Mixte de Recherche de Physiologie de la Reproduction et des Comportements,
F-37380 Nouzilly, France.

² INRA, Unité de Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France.

³SYSAAF, F-37380 Nouzilly, France.

Elisabeth.Blesbois@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

La cryoconservation du sperme est un outil clé pour gérer le potentiel génétique des mâles et la diversité génétique aviaire. Cependant, le processus de congélation/décongélation provoque des altérations biochimiques et physiques, notamment des altérations du métabolisme énergétique, qui rendent difficile la restauration des fonctions des spermatozoïdes sont nécessaires à la fécondation, telles que la mobilité et la capacité à accomplir la réaction acrosomique.

L'AMPK (5'-AMP activated protein kinase) est un senseur du métabolisme énergétique et ses nombreux rôles comprennent la régulation du métabolisme du glucose, des lipides, et des protéines. Lorsque l'AMPK est activée, elle stimule les voies cataboliques qui produisent l'ATP et inhibe simultanément les voies anaboliques qui en consomment pour rétablir l'équilibre de l'énergie cellulaire. Le but de cette expérience était de : **(a)** localiser l'AMPK dans les spermatozoïdes frais de coq par immunofluorescence et examiner les effets de l'activateur de l'AMPK Metformine sur leur mobilité et leur capacité à réaliser la réaction acrosomique ; **(b)** évaluer l'effet de la Metformine sur la réussite de la cryoconservation du sperme. Nos résultats montrent que la protéine AMPK est exprimée dans l'acrosome, la pièce intermédiaire et le flagelle des spermatozoïdes frais et que le phospho-Thr172-AMPK est particulièrement présente dans l'acrosome et le flagelle, ainsi qu'à une intensité beaucoup plus faible dans la pièce intermédiaire. La Metformine stimule la mobilité et la capacité à réaliser la réaction acrosomique des spermatozoïdes frais et congelés/décongelés. En conclusion, l'utilisation de la Metformine sur le sperme améliore certaines fonctions essentielles des spermatozoïdes de coq et la qualité du sperme cryoconservé.

ABSTRACT

Effects of Metformin on chicken frozen-thawed and fresh spermatozoa motility and acrosome reaction.

Spermatozoa are highly specialized cells, whose main properties include motility and acrosome reaction. The freezing and thawing of semen cause physical and chemical stress on spermatozoa which decreases success rate of fertilization. We investigated whether the AMP-activated protein kinase (AMPK) could play a role in the regulation of chicken sperm functions and metabolism that occurs during freezing.

AMPK (5'-AMP activated protein kinase) is a sensor of energy metabolism in the cells and its numerous roles include regulation of glucose, lipid, and protein metabolisms. When AMPK is activated, it stimulates catabolic pathways that produce ATP and simultaneously inhibits ATP-consuming anabolic pathways that adjust the cellular energy balance. The aim of this experiment was to: **(a)** to localize AMPK in chicken fresh spermatozoa using immunofluorescence and to examine the effects of AMPK activator metformin on motility and ability to achieve the acrosome reaction of fresh spermatozoa; **(b)** to assess effects of metformin in the functions of chicken frozen-thawed spermatozoa when used in cryopreservation. Our results show that AMPK protein is expressed in the acrosome, midpiece and flagellum of fresh spermatozoa, but phospho-Thr172-AMPK is specifically observed in the acrosome and in the flagellum and metformin stimulated the motility and the ability to achieve the acrosome reaction of fresh and frozen-thawed spermatozoa. In conclusion, the presence metformin on sperm improves some essential functions of chicken fresh spermatozoa and could improve the quality of frozen semen.

INTRODUCTION

La metformine est un dérivé de la guanidine, utilisée pour traiter le diabète [1]. Elle favorise l'absorption du glucose dans les muscles lorsqu'elle est stimulée par l'insuline et diminue la production de glucose hépatique [2]. Elle influe également sur le métabolisme des lipides, en abaissant les triglycérides plasmatiques [3] et les acides gras libres [4]. Son mécanisme d'action exact est inconnu. Elle pourrait agir par l'intermédiaire d'une voie de signalisation, dépendante ou non de l'insuline, par exemple en activant l'AMPK.

L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est un régulateur-clé du métabolisme énergétique, principalement des métabolismes glucidique et lipidique. L'AMPK stimule les voies cataboliques générant de l'ATP et inhibe les voies anaboliques consommant de l'ATP. C'est une enzyme hétérotrimérique composée d'une sous-unité catalytique α , possédant l'activité kinase, et de deux sous-unités régulatrices β et γ . Ces sous-unités sont présentes sous plusieurs isoformes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$) codées par sept gènes différents. Ces différentes isoformes permettent ainsi la formation de 12 complexes possibles ($\alpha\beta\gamma$) [5]. L'AMPK est activée par la phosphorylation de la sous-unité α sur l'acide aminé Thr172 par des kinases, comme LKB1 ou la calcium / calmoduline dépendante protéine kinase kinase β (CaMKK β). Récemment, nous avons caractérisé l'AMPK dans les spermatozoïdes et montré que son activation est impliquée dans des fonctions fondamentales : la mobilité [6-7] et la capacité à accomplir la réaction acrosomique [7]. Cependant, la présence et le rôle de l'AMPK dans des spermatozoïdes congelés et décongelés sont encore inconnus. Les spermatozoïdes sont des cellules hautement spécialisées qui nécessitent beaucoup d'énergie pour assurer leur mobilité et leur capacité de fécondation. Les objectifs de cette étude étaient d'étudier les effets et le mécanisme moléculaire de la metformine sur des spermatozoïdes congelés et décongelés.

MATERIELS ET METHODES

1.1. Collecte de la semence

La semence a été collectée par massage abdominal [8]. La concentration en spermatozoïdes a été déterminée par absorption de la lumière avec un photomètre (IMV, L'Aigle, France) à une longueur d'onde de 530 nm. La semence a été diluée dans du milieu BPSE (Beltsville Poultry Semen Extender) [9] pour obtenir une concentration finale de 1×10^9 cellules / ml. Chaque expérience a été répétée six fois.

1.2. Cryopréservation du sperme

La semence est diluée à 1:1 avec du dilueur Lake [10] en présence ou en l'absence de metformine. La semence diluée est refroidie à 4°C, puis le cryoprotecteur (glycérol, 11% du volume final) est incorporé dans une seconde fraction de dilueur (dilution finale 1 :2). La semence et le cryoprotecteur dilués ainsi ont ensuite été équilibrés pendant 10 min à 4°C [11]. Après quoi la semence a été transférée dans des paillettes de congélation (de petits tubes très fins) de 0.5mL (IMV, L'Aigle, France) qui ont été scellées puis congelées de 4 à -35°C à -7°C / min et de -35°C à -140°C à -20°C/min en utilisant un congélateur programmable Minidigitcool 1400 (IMV, L'Aigle, France). Les paillettes ont ensuite été plongées dans de l'azote liquide (-196°C).

1.3. Procédure de décongélation

La semence a été décongelée pendant 4 minutes dans un bain d'eau à 4 °C. Après décongélation, les paillettes ont été rapidement ouvertes et le sperme a été transféré dans un récipient en verre. Le sperme a été dilué progressivement (6 fois toutes les 2 min) avec un tampon de Lake [12] à 4°C pour une dilution finale de 1:19. Le glycérol a été éliminé par centrifugation (12 min à 700 g, 4°C) [11]. Après élimination des surnageants, les culots résultants ont été remis en suspension dans 100 ml de Lake 7.1 [13]. La concentration du sperme a été estimée en utilisant un photomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les concentrations étaient proches de 10^9 cellules/ml. Le sperme a ensuite été immédiatement inséminé. Une partie de la semence a été utilisée pour des tests de qualité in vitro.

1.4. Evaluation de la qualité des spermatozoïdes

L'intégrité de la membrane des spermatozoïdes a été mesurée par Sybr 14 et PI (propidium iodide). Les paramètres de mobilité des spermatozoïdes ont été évalués par le système d'analyse de sperme assistée par ordinateur (CASA) avec un HTM-IVOS (Hamilton-Thorn Motility Analyzer, IVOS) [14] et l'accomplissement de la réaction acrosomique a été détecté par de l'agglutinine d'arachide conjugué au FITC (FITC-PNA) en présence de Ca^{2+} et de la couche intérieure périvitelline (IPVL) [15-16].

1.5. Immunocytochimie

Les spermatozoïdes ont été fixés dans du formol, et saturés avec du sérum de chèvre dans du PBS (Sigma). Ils ont ensuite été incubés pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-phospho AMPK α (dilué au 1/100 dans du PBS-sérum de chèvre), suivi de l'anticorps secondaire anti-lapin IgG H+L (de Southern Biotech) (dilué au 1/200 dans du PBS-sérum de chèvre) pendant 2 heures. Après quoi ils ont été à nouveau incubés, avec de la streptavidine-Cy2 (Southern Biotech) et incubés avec du DAPI (Sigma).

Une autre expérience a été effectuée en même temps dans laquelle les cellules de sperme ont été incubées sans anti-lapin IgG et utilisées comme témoins négatifs.

1.6. Analyse statistique

Les données sont exprimées par leur moyenne \pm S.E.M. L'analyse statistique a été faite avec SPSS v16.0. Le niveau de différence significative entre les traitements a été calculé par le test-Student ou l'analyse de variance (ANOVA). Le seuil de différence significative a été fixé à $p < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Localisation de l'AMPK dans les spermatozoïdes de coq.

L'expression de la protéine AMPK dans les spermatozoïdes de coq a été évaluée par immunofluorescence indirecte en utilisant des anti-AMPK α comme anticorps primaires. La figure 1B montre que la protéine AMPK est observée dans la région de l'acrosome, dans la pièce intermédiaire et dans l'ensemble du flagelle. De l'IgG de lapin a été utilisé comme contrôle négatif et n'a montré aucun signal positif dans la figure 1A. Nos résultats sont différents à ceux déjà obtenus pour les spermatozoïdes de porc [6].

2.2. Activation de l'AMPK par la metformine.

Pour évaluer l'activation de l'AMPK, des analyses western blot utilisant des anticorps anti-phospho-Thr172-AMPK α et anti-AMPK α totale (comme témoin) ont été réalisées sur les spermatozoïdes de coq congelés-décongelés en présence ou en absence de metformine.

La phosphorylation de l'AMPK a été augmentée significativement dans les spermatozoïdes traités avec de la metformine par rapport à l'échantillon témoin. (Fig. 2).

2.3. Effets de la metformine sur la viabilité, la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes.

Nos résultats indiquent un effet néfaste du processus de cryoconservation sur la motilité des spermatozoïdes, l'intégrité de la membrane et l'accomplissement de la réaction acrosomique, trois paramètres essentiels pour la réussite de la fécondation. Le processus de congélation / décongélation induit des altérations graves qui ont conduit à une diminution de 37% de la mobilité des spermatozoïdes. Le pourcentage de réaction acrosomique réussie était également beaucoup plus faible après cryoconservation (10%). Quant au taux de

membrane plasmique intacte (MPI), il était de $86,2 \pm 3,8\%$ avant congélation et de seulement $53,8 \pm 0,9\%$ après décongélation. Les études précédentes ont montré que la cryoconservation du sperme conduit à la mort d'une proportion significative de cellules (en moyenne de 40 à 60% chez les oiseaux) et parmi les cellules viables, à l'altération de nombreuses fonctions. Il a été rapporté que différents aspects du métabolisme énergétique sont affectés par la cryoconservation du sperme, avec des conséquences sur la régulation de la mobilité, l'intégrité de la membrane et la concentration en ATP chez les mammifères [19-20] comme chez les oiseaux [21].

Les spermatozoïdes endurant le processus de congélation / décongélation sont sensibles à la metformine qui améliore leur mobilité et leur intégrité morphologique. Le taux de réaction acrosomique demeure faible mais augmente cependant de manière significative avec la metformine. Nous pensons donc que la stimulation de l'AMPK améliore la mobilité et la réussite de la réaction acrosomique du sperme décongelé après cryoconservation. D'après nos résultats, les capacités de réaction acrosomique de la semence décongelée restent cependant le point le plus critique. Cela montre que le processus de cryoconservation pourrait gravement endommager la structure de l'acrosome. Ces dommages pourraient être causés par la peroxydation et / ou l'activation de phospholipases [20] ou par le contact initial entre les spermatozoïdes et le cryoprotecteur [21].

2.4. La metformine stimule la production de lactate.

Le niveau de lactate dans le sperme congelé-décongelé augmente significativement comparé à celui du sperme frais (augmentation moyenne de 71%). En outre, le sperme congelé-décongelé avec la metformine enregistre une augmentation significative du niveau de lactate de 38,6% par rapport au témoin. (Figure 4).

Le lactate est un métabolite énergétique nécessaire aux spermatozoïdes. C'est un produit de la glycolyse et l'activation de l'AMPK pourrait améliorer l'état de métabolisme par glycolyse, induisant une augmentation de la production de lactate [23].

CONCLUSION

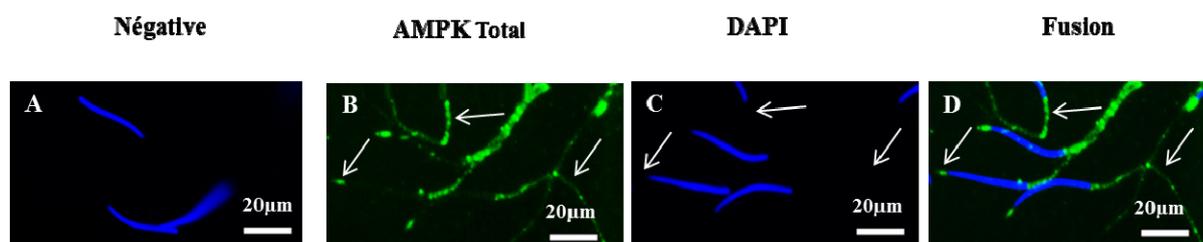
Nos résultats ont montré que le sperme de coq cryoconservé en présence d'activateur de l'AMPK améliore l'intégrité membranaire, la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes. Il s'agit de la première évaluation des effets de la metformine sur le sperme de coq congelé / décongelé à travers leur influence sur l'activité de l'AMPK pour réduire les causes de dommages de cryoconservation du sperme aviaire. Ces données seront utiles pour développer et améliorer les techniques de manutention et de

stockage du sperme aviaire. Dans cette optique, une étude «in vivo » par administration de metformine à doses «physiologiques » sera prochainement effectuée afin d'évaluer la fertilité ultérieure des reproducteurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

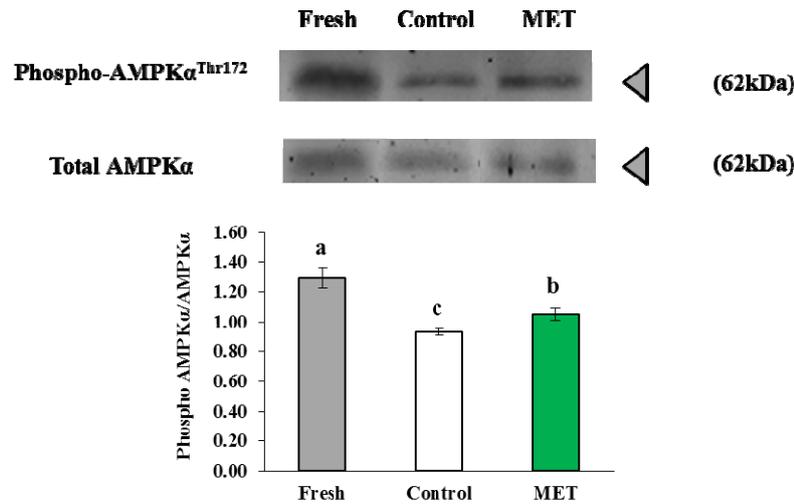
1. Witters LA., 2001. J Clin Invest., (108), 1105-1107.
2. Galuska D., Zierath J., Thorne A., Sonnenfeld T., Wallberg-Henriksson H., 1991. Diabete Metab (17), 159-163.
3. Cusi K., Consoli A., DeFronzo RA., 1996. J Clin Endocrinol Metab (81), 4059-4067.
4. Abbasi F., Kamath V., Rizvi AA., Carantoni M., Chen YD., Reaven GM., 1997. Diabetes Care (20), 1863-1869.
5. Foretz M., Taleux N., Guigas B., Horman S., Beauloye C., Andrelli F., Bertrand L., Viollet B., 2006. Médecine/sciences (22), 381-388.
6. Nguyen Thi Mong Diep, Alves S., Grasseau I., Métayer-Coustard S., Praud C., Froment P., Blesbois E., 2014. Biol Reprod. (91), 121.
7. Hurtado LA., Martin-HD., Gil MC., Garcia-Marin LJ., Bragado MJ., 2012. FEBS Journal (279) 552-576.
8. Burrows HJ., 1937. Proc R Soc Med., (30) 565-572.
9. Sexton TJ., 1977. Poult Sci., (56) 1443-1446.
10. Lake PE., 1968. VI Cong. Int Reprod Anim Insem Artif., (2), 1633-1635.
11. Seigneurin F., Blesbois E., 1995. Theriogenology., (43), 1351-1358
12. Lake PE., Stewart JM., 1978. Br Poult Sci (19), 187-194
13. Lake PE., Ravié O., Adam J MC., 1981. Br Poult Sci., (22), 71-77
14. Blesbois E et al., 2008. Theriogenology., 69 : 252-261.
15. Horrocks AJ, Stewart S, Jackson L, Wishart GJ., 2000. Biochem Biophys Res commun., (278), 84-89.
16. Lemoine M, Grasseau I, Brillard J.P, Blesbois E., 2008. Reproduction., (136), 391-399.
17. Miki K., 2007. Soc Reprod Fertl Suppl., (65), 309-325.
18. Tchir J., Acker JP., 2010. Cryobiology., (61), 100-107.
19. Long JA., 2006. Poult Sci., (85), 232-236.
20. Lemoine M., Mignon-Grasteau S., Grasseau I., Magistrini M., Blesbois E., 2010. Theriogenology., (75), 122-130.
21. Mocé E., Grasseau I., Blesbois E., 2010. Anim Reprod Sci., (122), 359-366.
22. Richardson MC., Ingamells S., Simonis CD., Cameron IT., Sreekumar R., Vijendren A., Sellahewa L., Coakley S., Byrne CD., 2009. J Clin Endocrinol Metab., (94), 670-677.

Figure 1. Immunolocalisation de l'AMPK dans le sperme de coq.



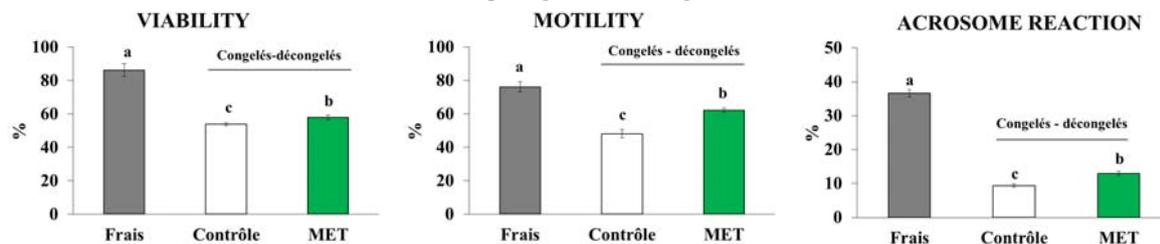
Les images montrent la localisation de l'AMPK total (vert-1B) et des noyaux marqués au DAPI (bleu- 1C). Contrôle négatif avec anti IgG -lapin (1A).

Figure 2. La phosphorylation de l'AMPK dans les spermatozoïdes de coq congelés - décongelés est stimulée par la metformine.



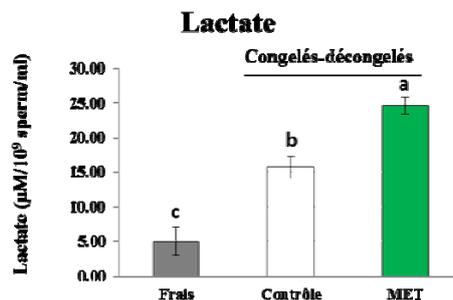
Les spermatozoïdes ont été incubés avec de la metformine à 1mM avant congélation. Ils ont ensuite été décongelés et lysés, puis les lysats protéiques ont été analysés par Western-blot. Les membranes ont été incubées avec les anticorps spécifiques de l'AMPK alpha phosphorylée (62kDa), et l'AMPK alpha (62kDa).

Figure 3. Effets de la metformine sur la viabilité, la mobilité et la réaction acrosomique de spermatozoïdes de coq congelés - décongelés.



Les spermatozoïdes ayant été incubés avec de la metformine apparaissent en vert, les témoins en blanc et les spermatozoïdes frais en gris. L'expérience a été effectuée 6 fois; valeurs (%) est la moyenne \pm SEM. a, b, c: significativement différent ($P < 0,05$).

Figure 4. Effets de la metformine sur la production de lactate dans les spermatozoïdes de coq congelés - décongelés.



Les spermatozoïdes ayant été incubés avec de la metformine apparaissent en vert, les témoins en blanc et les spermatozoïdes frais en gris. L'expérience a été effectuée 6 fois; valeurs (%) est la moyenne \pm SEM. a, b, c: significativement différent ($P < 0,05$).