

Facteurs influant sur la fertilité des mammifères domestiques mâles

JL. COURTENS, A. ALENCAR, JL. GATTI, F. DACHEUX, JL. DACHEUX, Y. GUÉRIN
INRA PRMD, 37380 Nouzilly, France et Université François Rabelais, Tours

RÉSUMÉ - Le nombre et la qualité des spermatozoïdes dépendent de facteurs testiculaires, de la maturation épидидymaire, de la composition du plasma séminal et de la capacitation finale dans les voies génitales femelles. Dans des conditions physiologiques normales, la production testiculaire est sensible à la température, aux chocs traumatiques et aux antibiotiques. Elle dépend de facteurs génétiques tel le nombre de cellules de Sertoli par testicule. La saison de naissance et les rendements des divisions et des différenciations des cellules germinales sont d'autres facteurs à considérer. Le spermatozoïde testiculaire est peu mobile et incapable de se lier à l'ovocyte. Il le deviendra dans l'épididyme qui, outre son rôle de réservoir, assure la maturation qui modifie la composition des membranes cellulaires. La compaction des noyaux, amorcée dans le testicule et poursuivie dans l'épididyme, est fixée provisoirement par les sécrétions de la prostate. Le plasma séminal apporte également les substrats nécessaires à la motilité et initie une dégradation programmée de la membrane plasmique (capacitation). La fréquence des collectes influe sur la qualité du plasma séminal et indirectement sur celle des spermatozoïdes. La conservation des gamètes devrait idéalement ralentir la cascade d'événements cellulaires qui conduisent soit à la fécondation soit à la mort cellulaire. Des milieux de conservation à l'état liquide ou solide prenant en compte les paramètres connus de la physiologie cellulaire sont actuellement développés.

Factors affecting male fertility in domestic mammals

JL. COURTENS, A. ALENCAR, JL. GATTI, F. DACHEUX, JL. DACHEUX, Y. GUÉRIN
INRA PRMD, 37380 Nouzilly, France

SUMMARY - The quantity and quality of male gametes are dependent upon testicular factors, the epididymal maturation, the composition of the seminal plasma and the final capacitation of spermatozoa. Under physiological conditions, the testicular cell production is sensitive to temperature, mechanical injuries and antibiotics. The number of Sertoli cells per testis is genetically determined and is also sensitive to the season of birth. Each Sertoli cell can only sustain a limited number of germ cells per semiferous cycle. This is an important factor setting the sperm production. This latter is also modified by the yields in germ cell divisions and differentiations. Testicular spermatozoa are immobile and unable to bind to the oocyte. These qualities appear during epididymal maturation, and the composition of the plasma membranes is also modified. The secretions of the prostate gland will temporarily fix the nuclear compaction, primarily established in the testis. The seminal plasma also carries substrates that are necessary for motility. It initiates a programmed remodelling of the plasma membrane (capacitation). Since the epididymis plays the role of reservoir for spermatozoa and since the quality of the seminal plasma differs with the rhythms of ejaculations, the way the males are used is a factor to consider. The techniques preserving germ cells should ideally slow down the cellular modifications that precede either fertilisation or cell death. Media with such properties, allowing sperm preservation in liquid or in solid form, are developed.

INTRODUCTION

Pendant sa différenciation dans le testicule, sa maturation dans l'épididyme, le choc de l'éjaculation, la remontée dans le tractus femelle et la capacitation finale avant la fécondation, le spermatozoïde est soumis à des conditions et des milieux divers qui peuvent en modifier la fertilité.

On peut arbitrairement séparer les conditions physiologiques naturelles des conditions imposées par les technologies d'élevage incluant celles plus spécifiques à la reproduction. Ces dernières comprennent les facteurs modifiant la production et/ou la qualité des spermatozoïdes dans le testicule, chaleur, traumatismes mécaniques, antibiotiques, et de manière plus nuancée, les facteurs nutritionnels. Les fréquences de prélèvement et les technologies de conservation de la semence apportent également leurs lots de modifications qui peuvent altérer l'intégrité et la fertilité des spermatozoïdes.

LA SPERMATOGENESE

L'élaboration des spermatozoïdes ou spermatogénèse est relativement longue, puisqu'elle dure de 40 à 58 jours, respectivement chez le bœuf, et le taureau. Chez l'homme, elle nécessite 76 jours. Après leur sortie du testicule, les spermatozoïdes séjournent encore entre 10 et 15 jours dans l'épididyme. Il est donc concevable que toute altération de la physiologie de l'animal puisse avoir des conséquences à plus long terme. Après une reprise de la spermatogénèse les spermatozoïdes ne seront présents dans l'éjaculat que deux mois plus tard. La spermatogénèse est caractérisée par trois types d'événements : 1) des multiplications cellulaires qui assurent la production des gamètes en nombre ; 2) une méiose qui redistribue les gènes d'origine paternelle et maternelle ; 3) la spermiogénèse qui différencie les spermatozoïdes en cellules autonomes.

Les multiplications de spermatogonies

La spermatogénèse débute par une division des spermatogonies souches. Contrairement à la femelle, chez qui tous les gamètes sont produits avant la naissance, le mâle élabore de nouvelles cellules germinales tout au long de sa vie. Les divisions spermatogoniales sont classiquement au nombre de six (Hochereau-de Reviers et al., 1987). Au cours des ces divisions, une nouvelle spermatogonie souche est reformée soit par différenciation d'une spermatogonie nouvellement divisée, soit par division de cellules souches non différenciées. Les six divisions permettent théoriquement d'obtenir 64 spermatogonies filles. Toutefois, toutes les cellules produites ne survivent pas (Huckins, 1978). Certaines disparaissent, essentiellement par apoptose (suicide cellulaire) induite, entre autre, par le gène *c-kit*. La protéine codée par le gène *p53* déclenche également l'apoptose des cellules qui présentent un taux élevé d'ADN mal ou pas réparé. Ce gène est sensible à la température (Yin et al., 1998). D'autres facteurs influencent également la production de spermatogonies filles : saison, FSH, nutrition, facteurs de croissance et place occupée par les cellules filles dans les tubes séminifères (Caussanel et al., 1996 ; Chen et al., 1997 ; Yan et al., 1998). Toutes les cellules germinales mâles issues de la première division spermatogoniale restent dans un cytoplasme commun. Ce cytoplasme syncytial est soumis au contrôle des cellules de Sertoli qui organisent l'espace dans les tubes séminifères, régissent les apports nutritionnels, relayent l'action des hormones gonadotropes et sécrètent le milieu spécifique aux tubules séminifères. Les cellules de Sertoli sont également impliquées dans le déclenchement d'apoptoses des cellules germinales et la phagocytose des cellules mortes (Shiratsuchi et al., 1997).

Les spermatocytes et les remaniements génétiques

Une dernière division transforme les spermatogonies B en spermatocytes primaires au stade pré-leptotène. Ces spermatocytes primaires entrent dans une très longue prophase (environ deux semaines chez les ruminants) qui précède les deux divisions méiotiques extrêmement rapides.

Au cours de cette prophase, des matériaux génétiques issus du père et de la mère sont échangés et modifient l'information portée par les chromosomes. La variabilité génétique apparaît

au cours de cette étape. Il est remarquable de calculer que chez l'homme, par exemple, le nombre de sites remaniés par chromosome, multiplié par le nombre de chromosomes, entraîne 9 milliards de combinaisons du contenu génétique des spermatozoïdes, ce qui correspond sensiblement à la population mondiale. La méiose rend ainsi chaque individu non jumeau statistiquement unique.

Il est d'usage de diviser la méiose en stades correspondant à l'aspect des noyaux de spermatocytes primaires. Le stade pré-leptotène est suivi du stade leptotène au cours duquel les cellules passent du compartiment basal des tubes séminifères vers un sas. Après passage dans ce sas, elles seront dans le compartiment adluminal des tubes séminifères et évolueront successivement vers les stades zygotène, pachytène et diplotène. La prophase méiotique est caractérisée par 2 grands types d'événements : la préparation aux deux divisions méiotiques, et les remaniements chromosomiques.

La préparation aux divisions méiotiques implique, comme au cours d'une mitose classique, que les chromosomes soient dupliqués. Dans la méiose, les répliques de chromosomes, établies au stade préleptotène/leptotène, ne se séparent pas des chromosomes parents. Chaque chromosome devient ainsi double par le jeu de l'accolement des chromatides (Gimenez-Abian, 1997). Les cellules restent diploïdes bien que leur quantité d'ADN soit quadruplée. Les appariements de chromatides entraînent la formation d'un complexe synaptonémal bien visible à partir du stade zygotène et chacun des autosomes s'attache à l'enveloppe nucléaire par ses extrémités. Au cours du stade pachytène, les chromosomes s'épaississent par enroulement de l'ADN. Cet enroulement impose de nombreuses cassures et réparations (Wilson and Thompson, 1997). Au cours de la prophase, environ 80 % de l'ADN sera ainsi réparé dans chaque cellule mais toutes ne seront pas aptes à survivre. Plusieurs processus provoqueront l'apoptose des cellules contenant de l'ADN mal réparé (Miething, A., 1997). Les cellules en prophase méiotique sont de ce fait extrêmement fragiles et beaucoup d'entre elles disparaissent naturellement. Chez les mammifères qui possèdent un grand nombre de gènes à remanier, ces étapes sont gourmandes en énergie (ATP). Une économie est réalisée par l'aide fournie par les cellules de Sertoli : elles sécrètent le milieu adluminal dont la tonicité et la composition limitent au maximum les échanges ioniques avec les spermatocytes. Dans une cellule banale, ces échanges homéostatiques consomment jusqu'à 80 % de l'énergie cellulaire. Une partie de la machinerie transcriptionnelle est recyclée (Courtens, 1998). Les cellules de Sertoli fournissent également un cocktail énergétique « prédigéré », composé de lactate et de pyruvate, qui shunte les premières étapes de la glycolyse consommatrices d'ATP. Ce milieu fragile est altéré par les sels de métaux lourds (Scott et al., 1996 ; Bal et al., 1997), et les pesticides alkylants (Turner et al., 1997). Les phtalates présents dans les plastiques, peuvent provoquer des cassures supplémentaires de l'ADN et amplifier les morts cellulaires.

Le stade diplotène est celui où interviennent les échanges de gènes entre chromosomes, par le biais des chiasmas. Ces échanges font également intervenir des processus importants de coupures et réparations.

Les deux divisions méiotiques successives et rapides produisent deux spermatocytes secondaires puis quatre spermatides à partir d'un spermatocyte primaire. Seule la première division est réductionnelle : les spermatocytes secondaires sont haploïdes, tout comme les spermatides. Suivant ces deux divisions, le nombre maximal théorique de spermatides produites par spermatogonie devient égal à 512. Ce nombre n'est jamais atteint, du fait de la mortalité cellulaire (Matsui, 1998) et du manque de place dans les tubes séminifères, chaque cellule de Sertoli n'étant capable de sustenter qu'un nombre limité de cellules germinales.

Les spermatides

Les jeunes spermatides produites à l'issue de la méiose sont des cellules rondes d'aspect relativement banal. Elles subissent une différenciation morphologique importante en environ

2 semaines, qui les transforme en spermatozoïdes testiculaires. Cette différenciation est caractérisée par 3 types d'événements (Courtens, 1984) :

a) Événements nucléaires : Le génome est progressivement inhibé. L'ARN est perdu des noyaux. La chromatine est compactée en une masse dense. Au cours de cette compaction, 60 % de l'ADN est remanié, coupé et réparé. Cette étape entraîne une mortalité cellulaire importante.

b) Événements cytoplasmiques : Synthèse de l'acrosome, poche limitée par une membrane et contenant une vingtaine d'enzymes. Synthèse du flagelle, du cou, de la lame postacrosomique. Synthèse de structures transitoires telle la manchette.

c) Événements membranaires : Régionalisation de domaines à la surface du spermatozoïde.

Les spermatozoïdes sont émis dans la lumière des tubes séminifères au cours de la spermiation contrôlée par l'AMPC des cellules de Sertoli. Au cours de celle-ci, les cellules s'individualisent en se séparant du syncytium germinale et leur cytoplasme « résiduel », non intégré aux spermatozoïdes, est réabsorbé par les cellules de Sertoli.

Le nombre de spermatozoïdes produits par testicule ne dépend pas seulement du rendement des divisions cellulaires, mais également de la périodicité des divisions des spermatogonies souches. Celle-ci est fixe spécifiquement et varie de 10,4 jours chez le bélier à 13,5 jours chez le taureau. Ainsi, plusieurs générations de cellules germinales cohabitent dans les tubes séminifères. Pratiquement, la différence entre durée totale d'une spermatogenèse et espacement entre divisions de spermatogonies souches permet aux tubes ne n'être physiologiquement jamais vides de cellules germinales. La production est donc continue et importante. En contrepartie, cette production conduit à davantage de cellules que ne peut en supporter chaque tube séminifère et nombre d'entre elles meurent en chemin. Le bilan reste impressionnant : chez le bélier, 20 millions de spermatozoïdes sont produits par gramme de testicule et par jour. Cette production est corrélée génétiquement au nombre de cellules de Sertoli par testicule (Hochereau-de Reviers et al., 1987).

PEUT-ON AMÉLIORER LA PRODUCTION SPERMATIQUE TESTICULAIRE ?

Si on excepte le désaisonnement, il semble que tous les efforts tendant à augmenter les rendements cellulaires par voie hormonale se soient heurtés à la production de cellules de moindre qualité. La sélection génétique d'animaux ayant davantage de cellules de Sertoli par tube séminifères reste un espoir (Hochereau-de Reviers et al., 1987). Ces cellules « majordomes » ne peuvent en effet supporter qu'un nombre fini maximum de cellules germinales. Par le jeu des apoptoses, le testicule parvient théoriquement à sa production maximale de cellules de qualité en permanence.

On peut toutefois limiter les morts cellulaires en évitant de surajouter des facteurs externes défavorables. Parmi ceux-ci, la température, les antibiotiques, les chocs traumatiques les agressions chimiques (Nutley et al, 1996 ; Wine et al, 1997) et la nutrition sont à considérer.

La température

Le testicule des mammifères ruminants domestiques est maintenu à 3-5°C en dessous de la température corporelle. Ceci est régulé par des radiateurs externes tels les plis du scrotum. La longueur de ce dernier est ajustée par la contraction ou le relâchement du muscle crémaster. Un radiateur interne, le complexe pampiniforme échange la chaleur du sang artériel testiculaire entrant avec celle du sang veineux sortant. L'ensemble est régulé finement par le système nerveux autonome, mais n'est efficace que dans des conditions précises et limitées de température externe/interne. En période de forte température ou de fièvre, la physiologie est dépassée et davantage de morts cellulaires apparaissent (Yizhong et al, 1997). La proportion de spermatozoïdes anormaux augmente également. Les animaux sans « vrai » scrotum (verrat, lapin) subissent des baisses de fertilité en saison chaude.

Les antibiotiques

La plupart des antibiotiques réduisent ou inhibent la spermatogenèse (Timmermans, 1974 ; Crotty et al, 1995). Il est habituel que la fertilité ne se rétablisse que 2 mois après l'arrêt des traitements. L'utilisation d'antibiotiques est donc une décision à prendre en connaissance de cause chez le mâle reproducteur.

Les chocs traumatiques sont généralement plus définitifs et incluent :

Les ruptures de tubes séminifères : les cellules germinales sont normalement exclues du « Soi » immunologique par la lame basale des tubes séminifères et des jonctions serrées entre cellules de Sertoli. Lorsque cette lame est rompue, la lignée lymphocytaire produit des anticorps anti-cellules germinales. Le résultat le plus grave est l'orchite auto-immune stérilisante. La barrière hémato-testiculaire est également atteinte chez l'adulte après certaines maladies virales (oreillons chez l'homme).

Les accidents vasculaires : Il existe peu de variations du diamètre des artéioles testiculaires. Après rupture traumatique, les saignements locaux sont souvent importants et lèsent de manière irréversible une partie du testicule. Cet effet se retrouve couramment après biopsies à l'aiguille.

La nutrition

Chez le bélier, 13 % de la ration de maintien est utilisée par les testicules qui occupent 0,4 % du poids corporel. La source d'énergie principale utilisée par le testicule est le glucose. La glycémie étant normalement régulée par l'organisme, il faut que l'apport nutritionnel soit très déficient pour que des effets notoires sur la spermatogenèse apparaissent chez l'adulte. De la naissance à la puberté, la sous-nutrition entraîne un retard de croissance testiculaire et une diminution (qui peut être) transitoire du nombre de cellules de Sertoli (Hochereau-de Reviers et al., 1987). Curieusement, le glucose n'est pas utilisé normalement par les cellules germinales du compartiment adluminal, bien qu'elles disposent de l'équipement enzymatique nécessaire à la glycolyse. Il est même toxique pour les spermatoocytes et les spermatides. Ce sont les cellules de Sertoli qui le convertissent en lactate et en pyruvate utilisés préférentiellement par les cellules germinales. On comprend ainsi beaucoup mieux pourquoi le nombre de cellules de Sertoli influe directement sur la production spermatique. La conversion du glucose en lactate est régulée par voie hormonale (FSH et insuline) et est sensible à la température. Plusieurs effets précoces de la cryptorchidie sont des effets nutritionnels (Courtens et Plöen, sous presse).

Qualitativement, plusieurs vitamines (C, A, E, Q) sont indispensables (Akmal et al, 1997 ; Zhuang et al, 1997), en quantités contrôlées (Ten et al, 1997). La ration doit également fournir du sélénium (Jones et al, 1997 ; Lei et al, 1997) et du zinc (Merker et Günther, 1997) pour garantir la fertilité. La différenciation des spermatides en spermatozoïdes demande beaucoup d'acides aminés essentiels (lysine) qui ne peuvent provenir que de l'alimentation ou de la dégradation d'autres protéines.

L'EPIDIDYME

La formation des spermatozoïdes est pratiquement achevée dans le testicule, mais leur pouvoir fécondant n'apparaît qu'après leur transit dans l'épididyme (Bedford 1979). Chez le bélier, la fertilité est quasiment nulle dans le corps proximal. Elle apparaît dans le corps distal (54 % de femelles fécondées) et devient maximale dans la queue proximale (78 %) (Fournier-Delpech et al, 1982).

Dans l'épididyme, les spermatozoïdes continuent à se transformer. Leur « maturation épididymaire » s'effectue dans un environnement spécifique créé par l'épithélium du tubule. Le rôle de l'épididyme est donc primordial dans la qualité des spermatozoïdes éjaculés.

Fonctions épididymaires

L'épididyme est très souvent subdivisé en trois grandes régions : antérieure ou tête, médiane ou corps et postérieure ou queue. Du point de vue physiologique, la zonation de cet

organe est plus complexe: le tube épидидymaire est constitué de multiples portions spécialisées qui ne présentent pas de repère anatomique distinct.

Les principales fonctions du tube épидидymaire sont :

- a) de transporter les spermatozoïdes du testicule vers le système éjaculateur (environ deux semaines).
- b) de réabsorber des ions, des protéines et l'eau (99 % du liquide testiculaire collecté dans l'épididyme est réabsorbé).
- c) de sécréter dans la lumière du tube plusieurs composés organiques tels que la glycérilphosphorylcholine (GPC) et de nombreuses protéines spécifiques.
- d) de concentrer des substances sanguines dans la lumière du tube (carnitine et acétylcarnitine) (Cooper, 1986).

La composition du fluide épидидymaire se modifie graduellement selon les régions. La composition de ce milieu intraluminal est donc entièrement contrôlée par l'activité des cellules épithéliales. La présence de « jonctions serrées » entre ces cellules constitue une barrière pour les échanges entre la lumière du tube épидидymaire et le milieu sanguin, barrière analogue à celle du testicule (Hoffer et Hinton 1984). Cette barrière permet au milieu intraluminal d'avoir une composition très différente de celle du sang. La plupart des protéines du liquide épидидymaire sont différentes de celles du plasma sanguin ou du fluide testiculaire (Dacheux et Voglmayr, 1983 ; Syntin et al, 1996). Les protéines d'origine testiculaire entrant dans l'épididyme, sont soit dégradées par les enzymes protéolytiques présentes dans le fluide, soit spécifiquement réabsorbées, de sorte que la plupart disparaissent de la lumière dès les premières régions. Les protéines présentes dans l'épididyme sont donc sécrétées par cet organe et la majorité d'entre elles sont sialylées ou glycosylées. Le nombre et les caractéristiques de ces composés sont fonction de la région épидидymaire et de l'espèce.

Modifications des spermatozoïdes lors du transit épидидymaire

La maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme se caractérise par une succession de modifications morphologiques (migration de la gouttelette cytoplasmique), métaboliques (augmentation du métabolisme oxydatif et glycolytique), et physiologiques (développement de la motilité et de la capacité de reconnaissance de la membrane de l'ovocyte).

Motilité : Les spermatozoïdes testiculaires de mammifères, sont soit immobiles, soit animés de mouvements vibratoires réduits. Les spermatozoïdes pris dans la tête de l'épididyme présentent tous des mouvements circulaires variés. Dans la queue de l'épididyme, beaucoup ont une motilité progressive avec des trajectoires rectilignes. La maturation du mouvement flagellaire se traduit par une élévation de la fréquence du battement lors du transit des gamètes dans l'épididyme (Chevrier et Dacheux, 1992).

Membrane cytoplasmique : La plupart des modifications physiologiques des spermatozoïdes s'accompagnent de changements des caractéristiques de la membrane plasmique. L'analyse biochimique globale des protéines de la surface des membranes de spermatozoïdes de bœuf révèle trois phases importantes dans la maturation des gamètes (Dacheux et Voglmayr, 1983).

La première phase qui se produit dans les premières zones épидидymaires, est caractérisée par la perte ou le masquage des composés protéiques présents à la surface des spermatozoïdes testiculaires.

La seconde est une phase de transition durant laquelle plusieurs éléments apparaissent et disparaissent de la surface du gamète (région médiane).

Dans la dernière phase du transit, des protéines nouvelles, de poids moléculaire plus faibles, caractéristiques des spermatozoïdes féconds se mettent progressivement en place sur la membrane des gamètes.

La composition protéique de la membrane des spermatozoïdes est très hétérogène (Eddy et al, 1985). Cependant des îlots homogènes en protéines délimitent plus ou moins les cinq régions du gamète classiquement appelées : segment principal,

segment équatorial, région postacrosomique de la tête et pièces intermédiaire et principale du flagelle. La composition de ces régions ou domaines du gamète évolue au cours du transit épидидymaire. Ces modifications concernent tous les gamètes. Elles s'effectuent séquentiellement et correspondent chacune à des niveaux épидидymaires très précis (Dacheux et Voglmayr, 1983 ; Dacheux et al, 1989). Les modifications membranaires des gamètes sont en relation avec les changements des propriétés de surface du gamète notamment en ce qui concerne les interactions avec la zone pellucide et la membrane plasmique de l'ovocyte (Moore and Hartman, 1986).

LE PLASMA SEMINAL

Le plasma séminal est sécrété au moment de l'éjaculation. Les spermatozoïdes chassés par les contractions musculaires de la queue d'épididyme rencontrent successivement les sécrétions de la prostate, des vésicules séminales et des glandes bulbo-urethrales. Elles modifient sensiblement la survie et la fécondance du sperme.

Osmolarité

Dans la queue d'épididyme, le spermatozoïde est soumis à un milieu hypertonique, riche en potassium et de pH bas. Celui-ci est dilué rapidement lors de l'éjaculation. L'osmolarité, brutalement réduite à 290-300 mOsm/Kg H₂O, entraîne une désolidarisation de la membrane plasmique, d'avec les structures cellulaires avec lesquelles elle était liée par l'actine (Escalier et al, 1997 ; de las Heras et al, 1997 ; Von Bülow et al, 1997). Ce détachement irréversible favorise les déplacements latéraux des molécules dans la membrane plasmique, importants pour préparer la fécondation (Langlais et Roberts, 1985 ; Buhr et al, 1989 ; Parks et Graham, 1992 ; Cowan et al, 1997). La baisse brutale de concentration en potassium pourrait également augmenter les potentiels électriques de membrane. La motilité, immédiatement plus importante dans l'éjaculat, serait induite par l'augmentation du pH (Babcock et al, 1983) ou par le bicarbonate.

La prostate

Les sécrétions prostatiques complètent et uniformisent la compaction de la chromatine des spermatozoïdes par le biais du zinc qui se lie aux radicaux sulfhydryles des nucléoprotéines (protamine). Cette réaction rapide (3 sec) ne fait pas intervenir directement l'ion Zn⁺⁺ qui est toujours lié à des protéines. Celles-ci migrent rapidement au niveau du cou des spermatozoïdes. Le zinc pourrait limiter les peroxydations cellulaires (Oteiza et al, 1996).

La prostate apporte également du cholestérol qui s'intègre rapidement à la membrane plasmique, la renforce et limite provisoirement les diffusions moléculaires latérales (Cross et Razy-Faulkner, 1997).

Les vésicules séminales

Les sécrétions vésicales apportent essentiellement du fructose, source d'énergie. Chez le bouc, une sécrétion protège les membranes plasmiques des lipases présentes dans le plasma séminal.

Les glandes bulbo-urethrales

Elles contiennent une lipase chez le bouc, capable, après activation d'attaquer les membranes plasmiques (Pellicer-Rubio and Combarnous, 1998). En contre-saison, quand les vésicules séminales sont peu sécrétoires, l'activation de l'enzyme peut induire la réaction acrosomique de 95 % des spermatozoïdes en une heure et inhiber totalement la fertilité (Courstens et al, 1984).

Le plasma séminal est donc un milieu complexe et variable en fonction de la saison, des rythmes de collecte, de l'état physiologique de l'animal. Il exerce des effets à la fois protecteurs et délétères sur les spermatozoïdes et leur apporte les nutriments nécessaires aux premières étapes de leur vie hors du mâle, tout en initiant les premiers phénomènes de « capacitation » (Austin, 1951, Farroqui, 1983). Il est courant d'observer

ver une baisse de fertilité et de qualité cellulaire dans les éjaculats les plus dilués ou après des collectes intensives. Celles-ci épuisent la réserve épидидymaire, augmentent la vitesse du transit vers la queue d'épididyme et limitent la maturation cellulaire. En contre saison sexuelle, quand les sécrétions des glandes annexes sont mal stimulées par un environnement endocrinien plus pauvre, la qualité du plasma séminal devient un facteur limitant.

Chez les ruminants, lors de la monte naturelle, les gamètes mâles ne restent normalement pas très longtemps en contact avec le plasma séminal. Dans le vagin, beaucoup de spermatozoïdes sont emprisonnés dans les plis de la muqueuse et sont véhiculés de cette manière vers le col de l'utérus. Pour le traverser, les spermatozoïdes doivent être mobiles et pénétrer le mucus cervical (Windsor, 1997). Celui-ci constitue une barrière naturelle au passage du plasma séminal et aux cellules mortes.

Ces observations conduisent à une question de technologie: faut-il ou non éliminer le plasma séminal des spermatozoïdes lors de leur conservation ? Chez les ruminants, le sperme est généralement très concentré et le plasma séminal difficile à séparer par simple centrifugation. Il est donc plus simple de le conserver. Il semble d'ailleurs qu'il puisse avoir un effet bénéfique sur la congélation des spermatozoïdes de bœuf (Ollero et al., 1997). Chez le bouc, Corteel (1975) a montré tout l'intérêt du lavage des spermatozoïdes qui leur garantit une durée de vie accrue à la fois en conservation liquide et en congélation (suppression des effets délétères des glandes bulbo-urétrales). Il convient de garder à l'esprit que cette suppression doit être contrebalancée par un milieu apportant les nutriments sucrés et les sels nécessaires à l'équilibre osmotique.

LES MILIEUX DE CONSERVATION

En plus des nutriments et propriétés osmotiques, les milieux de conservation devraient limiter le vieillissement des cellules (Ijaz et Hunter, 1989 ; Cormier et al., 1997). Celui-ci, amorcé lors de l'éjaculation, est irréversible et fait intervenir pour une large part, des modifications des membranes plasmiques, diffusions latérales des composants, érosion du cell-coat et éventuellement remodelage des couches lipidiques.

Les lipides de la membrane sont échangeables avec ceux du milieu (Pace et Graham, 1974). Les deux plus importants en quantité sont la phosphatidyl-sérine (ester de glycérol avec un acide gras à chaîne courte) et la phosphatidyl-choline (chaîne plus longue). Le rapport de ces lipides est voisin dans la membrane plasmique des spermatozoïdes et dans le jaune d'œuf de poule. Il est en faveur de la phosphatidyl-sérine dans le jaune d'œuf de caille et modifie différemment les membranes (Trimèche et al., 1997). L'apport de phosphatidyl-choline permet probablement de protéger les spermatozoïdes du choc thermique lors de la descente en température. Ce choc entraîne un remaniement des couches lipidiques en îlots gélifiés très labiles (Watson, 1981).

Les milieux de conservation doivent également lutter contre les agressions de type chimique. Parmi celles-ci, les oxydations et peroxydations (Godeas et al., 1996 ; Fisher et Aitken, 1997) modifient les membranes et les noyaux de manière délétère. Plusieurs antioxydants sont actuellement testés pour augmenter les durées de conservation du sperme à l'état liquide.

Un des moyens de ralentir les modifications chimiques est réalisé par la **congélation**. A -196.5°C, les réactions chimiques sont quatre millions de fois moins rapides qu'à 37°C, et toutes celles faisant intervenir l'eau comme solvant sont absentes. Les quelques altérations possibles sont celles faisant intervenir les protons H⁺ et les radiations ionisantes (Hoyes et Morris, 1996). Toutefois, les technologies de congélation se heurtent encore à beaucoup de difficultés inhérentes aux modifications physiques des milieux à basse température, aux phénomènes de concentrations et de dilutions, à l'augmentation de viscosité, à la conduction hydrique limitée des membranes plasmiques et aussi à l'accélération de la capacitation après dégel (Courtens et al., 1989a, Gillan et al., 1997). La conduction hydrique des spermatozoïdes bovins, respectivement huit et dix fois plus élevée que celles mesurées chez l'homme ou le

lapin (Gilmore et al., 1996), génère peu de « pression » osmotique. Les spermatozoïdes sont donc plus tolérants et un essor rapide de la congélation dans des conditions sous optimales, voire artisanales, a pu être réalisé. Tel n'est pas encore le cas des autres ruminants. Chez le bœuf et le bouc, davantage de lésions sont générées par les flux hydriques trans-membranaires rapides lors des descentes et remontées en température (Courtens et al., 1989b). L'énergie d'activation associée au passage des cryoprotecteurs ralentit l'élimination rapide des cryoprotecteurs lors de la décongélation. Il devient de ce fait important de contrôler très finement toutes les phases dynamiques de descente et de remontée en température. La composition des milieux de congélation (Courtens et Paquignon, 1985), la technique utilisée pour ajouter les cryoprotecteurs (Gilmore et al., 1998) et la géométrie des containers (Ekwall et al., 1997) sont d'autres facteurs influant directement sur la proportion de cellules viables à la décongélation.

CONCLUSIONS ET IMPLICATIONS

Qu'il s'agisse de physiologie ou de technologie, il est difficile de hiérarchiser les phénomènes et facteurs influant sur la fertilité du mâle. Tous sont importants et la modification d'un seul peut entraîner des effets considérables sur le résultat final. Chez le mâle, il semble difficile de vouloir surpasser la nature. Le nombre très important de spermatozoïdes produits doit être mis en relation avec les possibilités de dissémination de caractères génétiques remaniés pendant la méiose, mais aussi à une perte énorme de cellules dans les voies génitales femelles par le truchement du système immunitaire. La fécondation interne des mammifères utilise des gamètes particulièrement complexes et performants. Ramenée à l'échelle humaine, la vitesse natale de 30 cm/h du spermatozoïde de taureau correspondrait à quelques 80 km/h. Ceci fait intervenir des fonctions très spécialisées de stockage, utilisation et réapprovisionnement en énergie. Il faut un temps relativement long pour produire des cellules ayant un tel degré de sophistication tout en assurant la survie de l'espèce et sa variabilité génétique. Les remaniements nucléaires de la spermatogenèse sont ceux qui entraînent le maximum de pertes cellulaires. Les fonctions d'élimination de cellules inaptes à leurs fonctions garantissent une production le plus souvent de qualité. Celle-ci n'est hélas pas définitive, et la fragilité des cellules face à des milieux naturels ou imposés par des technologies complexes pose encore des problèmes fondamentaux dans la prédiction de la fertilité. De nombreux domaines restent « terra incognita » chez le mâle. Par le passé, beaucoup des connaissances fondamentales ont débouché sur des applications agronomiques, d'autres passées longtemps inaperçues permettent aujourd'hui de proposer des solutions ou techniques nouvelles.

- Akmal, K.M., Dufour, J.M., Kim, K.H. 1997. Biol. Reprod., 56, 549-556.
- Austin, C.R. 1951. Aust. J. Sci. Res., B4, 697-698.
- Babcock, D.F., Rufo, G.A., Lardy, H.A. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 1327-1331.
- Bal, W., Lukasz, J., Kasprzak, K.S. 1997. Chem. Res. Toxicol., 10, 915-921.
- Bedford, J.N. 1979. In Fawcett D.W. and Bedford J.M. (Editors). The Spermatozoon. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 7-22.
- Buhr, M.M., Canvin, A.T., Bailey, J.L. 1989. Gamete Res., 23, 441-449.
- Caussanel, V., Tabone, E., Mauduit, C., Dacheux, F., Benahmed, M. 1996. Mol. Cell. Endocrinol., 123, 61-69.
- Chen, Y., Dicou, E., Djakiew, D. 1997. Mol. Cell. Endocrinol., 127, 129-136.
- Chevrier, C., Dacheux, J.L. 1992. Cell Motility Cytoskeleton, 23, 8-18.
- Cooper, T.G. 1986. In Cooper T.G. (Editor). The epididymis, sperm maturation and fertilization. Springer-Verlag, Berlin.
- Cormier, M., Sirard, M.A., Bailey, J.L. 1997. J. Androl., 18, 461-448.
- Courtens, J.L. 1984. Différenciation des spermatides. Coll. Inserm "développements récents de l'endocrinologie du testicule", 123, 57-85.
- Courtens, J.L., Nunes, J.F., Corteel, J.M. 1984. Gamete Res., 9, 287-320.

- Courtens, J.L., Paquignon, M. 1985. Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar. 1st Int. Conf. Deep Freezing of Boar Spermatozoa. LA Johnson and K Larsson EDS SLU Uppsala, pp.61-87.
- Courtens, J.L., Paquignon, M., Blaise, F., Ekwall, H., Plöen, L. 1989a. Mol. Reprod. Develop 1, 264-277.
- Courtens, J.L., Ekwall, H., Paquignon, M., Plöen, L. 1989b. J. Reprod. Fert. 87, 613-626.
- Courtens, J.L. 1998. Cell Tiss Res 293, 349-355.
- Cowan, A.E., Nakhimovski, L., Myles, D.G., Koppel, D.E. 1997. Biophys. J., 73, 507-516.
- Cross, N.L., Razy-Faulkner, P. 1997. Biol. Reprod., 56, 1169-1174.
- Crotty, K.L., May, R., Kulvicki, A., Kumar, D., Neal, D.E. 1995. J. Urol., 153, 835-838.
- Dacheux, J.L., Voglmayr, J.K., 1983. Biol. Reprod., 29, 1033-1046.
- Dacheux, J.L., Dacheux, F., Paquignon, M., 1989. Biol. Reprod., 40, 635-651.
- De las Heras, M.A., Valcarcel, A., Pérez, L.J., Moses, D.F. 1997. Tiss. & Cell, 29, 47-53.
- Eddy, E.M., Vernon, R.B., Muller, C.H., Hahnel, A.C., Ekwall, H., Eriksson, B., Courtens, J.L., Rodriguez-Martinez, H. 1997. Congress Theoretical aspects and clinical applications of cryopreservation Hamburg.
- Fenderson, B.A. 1985. Am. J. Anat., 174, 225-237.
- Fournier-Delpech, S., Courtens, J.L., Pisselet, C., Delaleu, B., Courrot, M. 1982. Gamete Res., 5 403-408.
- Escalier, D., Gallo, J.M., Schrével, J. 1997. J. Histochem. Cytochem., 45, 909-922.
- Farooqui, A.A. 1983. J Biochem., 15, 463-468.
- Fisher, H.M., Aitken, R.J. 1997. J. Exp. Zool., 277, 390-400.
- Gillan, L., Evans, G., Maxwell, M.C. 1997. Reprod. Fertil. Dev., 9, 481-487.
- Gilmore, J.A., Du, J., Tao, J., Peter, A.T., Critser, J.K. 1996.
- Gilmore, J.A., Liu, J., Peter, A.T., Critser, J.K. 1998. Biol. Reprod. 58, 28-36.
- Gimenez-Abian, J.F., Clarke, D.J., Garcia de la Vega, C., Gimenez-Martin, C. 1997. Chromosoma, 106, 422-434.
- Godeas, C., Tramer, F., Micali, F., Roveri, A., Maiorini, M., Nich, C., Dandri, G., Panfili, E. 1996. Biochem. Mol. Med., 59, 118-124.
- Hochereau-de Reviers, MT, Monet-Kuntz, C, Courrot, M. 1987. J. Reprod. Fert. Suppl., 34, 101-114.
- Hoffer, A.P., Hinton, B.T. 1984. Biol. Reprod., 30, 991-1004.
- Hoyes, K.P., Morris, I.D. 1996. Int. J. Androl., 19, 199-204.
- Huckins, C. 1978. Anat. Rec., 190, 905-926.
- Ijaz, A., Hunter, G. 1989. J. Dairy Sci., 72, 2683-2690.
- Jones, M.M., Xu, C., Ladd, P.A., 1997. Toxicology, 116, 169-175.
- Langlais, J., Roberts, K.D. 1985 Gamete Res., 12, 183-224
- Lei, X.G., Ross, D.A., Parks, J.E., Comb, G.F. 1997. Biological Trace element Res., 59, 195-206.
- Matsui, Y. 1998. APMIS, 106, 142-148.
- Merkner, H.J., Günther, T. 1997. T. Trace elements Med. Biol., 11, 19-22.
- Miething, A. 1997. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 29, 29-35.
- Moore, H.D.M., Hartman, T.D. 1986. J. Reprod. Fertil., 78, 347-352.
- Nutley, E.V., Tcheong, A.C., Allen, J.W., Collins, B.W., Ma, M., Lowe, X.R., Bishop, J.B., Moore, D.H., Wyrobek, A.J. 1996. Environmt. Mol. Mutagenesis, 28, 80-89.
- Ollero, M., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T. 1997. J. Androl. 18, 732-739.
- Oteiza, P.L., Olin, K.L., Fraga, C.G., Keen, C.L. 1996. PSEBM, 213, 85-91.
- Pace, M.M., Graham, J.K. 1974. J. Anim. Sci., 39, 1144-1149.
- Parks, J.E., Graham, J.K. 1992. Theriogenology, 38, 209-222.
- Pellicer-Rubio, M.T., Combarrous, Y. 1998. J. Reprod. Fertil., 112, 95-105.
- Scott, C.A., Designan, L., Maffezzini, M., Simonato, A., Avellini, C., Stefani, S.D., Rizzi, V., Carmignani, G., Beltrami, C.A. 1996. Analytical Quant. Cytol. Histol., 18, 361-373.
- Shiratsuchi, A., Uméda, M., Ohba, Y., Nakanishi, Y. 1997. J. Biol. Chem., 272, 2354-2358.
- Syntin, P., Dacheux, F., Druart, X., Gatti, J.L., Okamura, N., Dacheux, J.L. 1996. Biol. Reprod., 55, 956-974.
- Ten, J., Vendrell, F.J., Cano, A., Tarin, J.J., 1997. Reprod. Nutr. Dev., 37, 481-492.
- Timmermans, L. 1974. J. Urol., 112, 348-349.
- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G., Tainturier, D. 1997. Cryobiology 34, 385-393.
- Turner, K.O., Syvanen, M., Meizel, S. 1997. J. Androl., 18, 571-575.
- Von Bülow, M., Rackwitz, H.R., Zimbelman, R., Franke, W. 1997. Expl. Cell Res., 233, 216-224.
- Watson, P.F. 1981. J. Reprod. Fertil., 62, 483-492.
- Wilson, D.M., Thompson, L.H. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 12754-12757.
- Windsor, D.P. 1997. Reprod. Fertil. Dev., 9, 279-284.
- Wine, R.N., Ku, R.N., Li, L.H., Chapin, R.E. 1997. Biol. Reprod., 56, 439-446.
- Yan, Y.C., Sun, Y.P., Zhang, M.L. 1998. Arch. Androl., 40, 133-146.
- Yin, Y., DeWolf, W.C., Morgentaler, M. 1998. Biol. Reprod., 58, 492-496.
- Yizhong, Y., Hawkins, K.L., Dewolf, W.C., Morgentaler, A. 1997. J. Androl., 18, 159-165.
- Zhuang, Y.H., Bläuer, M., Ylikomi, T., Tuohimaa, P. 1997. J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 60, 67-76.