

EFFETS DES INHIBITEURS DE L'AMPK (COMPOUND C ET ARA-A) SUR LA SEMENCE DE COQ

**Thi Mong Diep Nguyen ; Sabine Alves ; Isabelle Grasseau ; Pascal Froment ;
Elisabeth Blesbois**

INRA-UMR-PRC, 37380 Nouzilly, France

Diep.Nguyen@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

Les spermatozoïdes mobilisent beaucoup d'énergie pour leurs fonctions spécifiques, notamment pour leur mobilité dans le but d'atteindre et de féconder l'ovocyte. L'objet de cette étude est de mettre en évidence le rôle d'un régulateur de la balance énergétique cellulaire ATP-dépendante, l'AMPK, sur les fonctions des spermatozoïdes en utilisant deux inhibiteurs spécifiques: le Compound C et l'ARA-A.

L'AMPK est une sérine-thréonine kinase hétérotrimérique comprenant une sous-unité catalytique α et deux sous-unités régulatrices β et γ . La phosphorylation de l'AMPK stimule certaines voies cataboliques et inhibe des voies anaboliques consommatrices d'ATP, régulant ainsi la balance énergétique cellulaire. La mobilité, la viabilité et l'accomplissement de la réaction acrosomique des spermatozoïdes sont mesurés en présence d'ARA-A (0.1mM et 0.6mM) ou de Compound C (1 μ M, 5 μ M et 10 μ M) et des témoins correspondants (DMF pour ARA-A et DMSO pour Compound C). Les spermatozoïdes de coq à 500.10⁶ spz/ml sont incubés à 35°C en présence ou non des inhibiteurs à différentes concentrations. L'ARA-A et le Compound C n'affectent pas la viabilité des spermatozoïdes à l'exception de la plus forte dose de Compound C mais diminuent significativement leur mobilité et leur capacité à accomplir la réaction acrosomique à 30 min d'incubation pour les deux doses d'ARA-A ; à 60 min pour les 3 doses de Compound C ($P < 0.05$). L'inhibition de l'AMPK par des doses non toxiques d'ARA-A et de Compound C perturbe donc la capacité de fécondation des spermatozoïdes, suggérant un rôle central de ce senseur énergétique dans le processus.

ABSTRACT

Effect of AMPK's inhibitors (Compound C and ARA-A) in chicken's spermatozoa

The sperm requires energy for specific functions which are mainly to reach and fertilize the ovum. The objective of the present study is to clarify the role of an energy sensor, AMPK, by studying the effects of specific AMPK inhibitors (1 μ M, 5 μ M and 10 μ M Compound C and 0.1mM and 0.6mM ARA-A) on sperm motility, viability and acrosome reaction compared to control media (DMF for ARA-A and DMSO for Compound C). AMPK is a heterotrimeric serine/threonine protein kinase, including a catalytic α subunit and regulatory β and γ subunits. AMPK's phosphorylation stimulates catabolic pathways and inhibits anabolic ATP-consuming pathways, that adjust the cellular energy balance. Chicken sperm at 500.10⁶ spermatozoa/ml were incubated with Compound C or with ARA-A at 35°C and ARA-A and Compound C did not significantly affect the viability of the sperm (except for the highest concentration of Compound C) but reduced both motility and acrosome reaction at 30 min of incubation for both inhibitors; at 60 min for all three concentrations of Compound C ($P < 0.05$). Therefore, at non-toxic dose, AMPK inhibitors negatively affect sperm motility and acrosome reaction suggesting a central role of this energy sensor in sperm fertilizing ability.

INTRODUCTION

Chez les oiseaux, lorsque les spermatozoïdes sortent des testicules, ils possèdent déjà l'essentiel de leur capacité de mobilité (Ashizawa et Sano, 1990) et un pouvoir fécondant non négligeable (Howarth, 1983). Leur pouvoir fécondant optimal est acquis principalement au cours de la maturation épидидymaire et complété lors de la remontée des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles avant d'accéder au site de fécondation.

Nous pouvons également congeler les gamètes mâles afin de procéder à une fécondation ultérieurement. Dans ce cas, une étape "in vitro" s'intercale entre les passages des gamètes mâles dans les voies génitales mâles et les voies génitales femelles et il faut veiller à ne pas empêcher l'évolution normale de la maturation spermatique. Or le processus aboutissant à un spermatozoïde fécondant est très complexe et nécessite la mobilisation de beaucoup d'énergie. Cette énergie est corrélée au rapport entre l'AMP (Adénosine monophosphate) et l'ATP (Adénosine-5'-triphosphate) [8] et implique des mécanismes biochimiques tels que la phosphorylation de protéines de signalisation comme l'AMPK (Protéine kinase dépendante de l'AMP). L'AMPK joue un rôle central dans la régulation de la balance énergétique cellulaire [6]. L'AMPK existe sous la forme d'un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique (α) et de deux sous-unités régulatrices (β et γ), chacune représentée par différentes isoformes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$) codées par des gènes distincts [5], [10]. L'AMPK est activée allostériquement par l'augmentation du rapport AMP/ATP ainsi que par la phosphorylation de la thréonine 172 de la sous-unité catalytique α [16].

Actuellement, trois kinases phosphorylant et activant l'AMPK ont été identifiées. Ce sont LKB1 (liver kinase B1), aussi appelée STK11 (serine/threonine kinase 11), CaMKK (calmodulin-dependent protein kinase kinase) et TAK1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1) [7], [13], [14].

Nous nous intéressons dans cette étude à l'effet d'inhibiteurs de la voie AMPK sur la mobilité, la viabilité et la réalisation de la réaction acrosomique de spermatozoïdes de coq éjaculés incubés in vitro.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les animaux utilisés sont des coqs adultes (âgés de 28 à 50 semaines) du croisement Isabrown *Gallus Gallus*. La semence est collectée par massage dorso-

abdominal [3], puis diluée au demi dans du BPSE (Beltsville Poultry Semen Extender, Sexton 1977) [15] où le fructose est remplacé par le glucose (plus fortement métabolisé). La semence ainsi diluée est ensuite centrifugée 8 minutes à 400g, puis le plasma séminal est remplacé par le même volume de BPSE. La concentration en spermatozoïdes est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre et la semence est diluée dans du BPSE à 500.10^6 spermatozoïdes/ml pour les analyses des effets de l'inhibiteur Compound C (à 1 μ M, 5 μ M et 10 μ M) et de l'inhibiteur ARA-A (Adénine-9- β -D-arabinofuranoside) (à 0.1mM et 0.6mM) sur la mobilité, la viabilité et la réussite de la réaction acrosomique. Ces mesures ont été réalisées sans incubation (T0), ou après quinze minutes d'incubation à 35°C (T15), après trente minutes d'incubation à 35°C (T30), après soixante minutes d'incubation à 35°C (T60), ou quatre-vingt-dix minutes d'incubation à 35°C (T90).

La mobilité des spermatozoïdes est évaluée par l'Analyse automatisée de mobilité assistée par ordinateur (CASA, IVOS Hamilton Thorne) [2]. La mobilité est ici définie comme le pourcentage de spermatozoïdes mobiles observés à l'IVOS après comptage de trois champs par échantillon.

La viabilité est estimée par l'association de 2 fluorochromes : l'iodure de propidium (IP) et le Sybr14 (Chalah et Brillard, 1998). Les cellules dont la membrane est altérée apparaissent en rouge (IP) et les cellules intègres apparaissent en vert (Sybr14) [4].

L'aptitude à la réaction acrosomique est évaluée après marquage des acrosomes des spermatozoïdes à la PNA-FITC (Fluorescein Isothiocyanate – PeaNut Agglutinin) en vert selon la méthode de Horrocks et al. 2000 [9] après incubation des spermatozoïdes 5 min à 41°C dans du NaCl-TES (Standard medium) contenant 5 mM de Ca^{2+} et 50 μ l de membrane périvitelline interne (MPVI) soniquée. [11] [12].

Analyse statistique

Les paramètres concernant l'effet du traitement (avec ou sans inhibiteur). Les taux de spermatozoïdes mobiles, de spermatozoïdes vivants et d'accomplissement de la réaction acrosomique ont été évalués grâce à une ANOVA et le test de student a été utilisé pour comparer les différences. Chaque valeur correspond à la moyenne $\pm$ SEM de 12 essais répétés. Le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$.

RÉSULTATS

1. Effets de l'ARA-A sur la viabilité des

spermatozoïdes de coq.

La comparaison entre les échantillons contenant de l'ARA-A et leurs témoins DMF (diméthylformamide) (respectivement DMF 0.3% pour 0.1mM ARA-A et DMF 1.5 % pour 0.6mM ARA-A) montre que l'ARA-A n'affecte pas la viabilité des spermatozoïdes (cf. Figures 1a et 1b).

2. Effets de l'ARA-A sur la mobilité des spermatozoïdes de coq.

La figure 2 montre que la mobilité des spermatozoïdes est significativement diminuée ($P < 0.05$) de 50% à 30 minutes d'incubation, puis augmente rapidement jusqu'à 60 minutes d'incubation et lentement de la soixantième à la quatre-vingt-dixième minute. Les deux doses d'ARA-A testées altèrent significativement la mobilité par rapport à leurs témoins respectifs dès le temps 30 pour les deux doses et à 90 minutes pour la dose la plus forte.

3. Effets de l'ARA-A sur le taux de réaction acrosomique des spermatozoïdes.

La figure 3 montre que les deux doses d'ARA-A diminuent significativement le taux de réaction acrosomique par rapport à leurs témoins respectifs dès le temps 0 pour la dose la plus forte de 0.6 mM, à 30 minutes pour les deux doses et à 60 minutes pour la dose la plus faible. A 90 minutes les taux mesurés dans tous les échantillons (y compris les témoins) sont tous très faibles et les différences peu marquées.

4. Effets du Compound C sur la viabilité, la mobilité et le taux de réaction acrosomique des spermatozoïdes.

Afin de mieux comprendre le rôle de l'AMPK nous avons poursuivi notre étude avec un second inhibiteur de l'AMPK : le Compound C, mais seulement en utilisant un temps d'incubation de 60 minutes qui paraît être un bon compromis pour l'observation des 3 critères de viabilité, de mobilité et d'aptitude à la réaction acrosomique. En effet, les taux de viabilité des spermatozoïdes et d'accomplissement de la réaction acrosomique ne sont que légèrement inférieurs aux précédents à T60 et la mobilité y est bien meilleure qu'à T30.

La plus forte dose de Compound C (10 μ M) affecte la viabilité des spermatozoïdes (tableau 1) mais pas les deux doses plus faibles (1 μ M et 5 μ M).

Sur le tableau 1, la mobilité et le taux de réaction acrosomique des spermatozoïdes diminuent de façon significative en présence du Compound C par rapport aux échantillons témoins correspondants (respectivement DMSO (diméthylsulfoxyde) 0.01%

pour 1 μ M Compound C, DMSO 0.05% pour 5 μ M Compound C et DMSO 0.1% pour 10 μ M Compound C). L'échantillon contenant la dose maximale de Compound C (10 μ M) présente des résultats relativement bas (17% pour la mobilité et 13% pour le taux de réaction acrosomique des spermatozoïdes).

DISCUSSION

L'AMPK a un rôle important dans le contrôle du métabolisme des sucres et des lipides [5] [10] et est un senseur de nombreuses activités cellulaires. Son rôle sur des cellules très différenciées comme les spermatozoïdes qui développent des capacités originales, en particulier la mobilité et la réaction acrosomique, reste cependant très peu exploré. Il peut être approché par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques mais l'observation de l'effet d'inhibiteurs de l'AMPK sur la mobilité, la viabilité et l'accomplissement de la réaction acrosomique des spermatozoïdes est rare.

A notre connaissance, Ana Hurtgo et al ont été les seuls à montrer un effet inhibiteur du Compound C (30 μ M) sur la mobilité et la rapidité des spermatozoïdes de verrat [1]. Ils n'ont cependant pas montré d'effet probant de l'inhibiteur sur la réaction acrosomique.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets de deux inhibiteurs de l'AMPK, l'ARA-A et le Compound C, sur la mobilité et la réalisation de la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq *in vitro*. La viabilité a également été mesurée comme témoin de toxicité éventuelle des inhibiteurs. Quand les spermatozoïdes sont incubés à 35°C, les taux de mobilité et d'accomplissement de la réaction acrosomique diminuent significativement, alors que la viabilité n'est pas altérée sauf pour la plus forte dose de Compound C. On peut donc conclure de ces expériences que les deux inhibiteurs de l'AMPK influencent le taux de mobilité et de réaction acrosomique ; ce qui suggère un effet activateur de l'AMPK sur ces deux fonctions spécifiques des gamètes.

L'AMPK peut donc jouer un rôle clé dans la régulation des fonctions des spermatozoïdes liées à leur remontée dans les voies génitales femelles et à la fécondation de l'ovocyte.

Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués pourrait permettre à terme d'augmenter le taux de fécondation des spermatozoïdes et donc la qualité de la fécondation.

RÉFÉRENCES

1. Ana Hurtado de Llera et al., 2012. Published June 14, 2012.
2. Blesbois E et al., 2008. Theriogenology., 69 : 252-261.
3. Burrows WH, Quinn JP., 1937. Poult Sci., 14 : 251-252.
4. Chalah T, Brillard JB., 1998. Theriogenology., 50 : 487-493.
5. Carling, D., 2004. Trends Biochem. Sci., 29 : 18-24.
6. Hardie, D.G., 2004. J Cell Sci., 117 : 5479-5487.
7. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, et al., 2005. Cell Metab., 2 : 9-19.
8. Hurley RL, Anderson KA et al., 2005. J Biol Chem., 280 : 29060-29066
9. Horrocks AJ, Stewart S, Jackson L, Wishart GJ. Biochem Biophys Res commun., 2000. 278 : 84-89.
10. Kemp, B.E., et al., 2003. Biochem. Soc. Trans., 31 : 162-168.
11. Lemoine M, Grasseau I, Brillard J.P, Blesbois E., 2008. Reproduction., 136 : 391-399.
12. Lemoine M, Dupont J, Guillory V, Tesseraud S, Blesbois E., 2009. Biology of Reproduction., 81 : 657-665.
13. Momcilovic M, Hong SP, Carlson M., 2006. J Biol Chem., 281 : 25336-25343.
14. Miki K., 2007. Soc Reprod Fertil Suppl., 65 : 309-325.
15. Sexton T., 1977. Poultry Science., 56 : 1443-6.
16. Woods, A., et al., 2005. Cell Metab., 2 : 21-33.

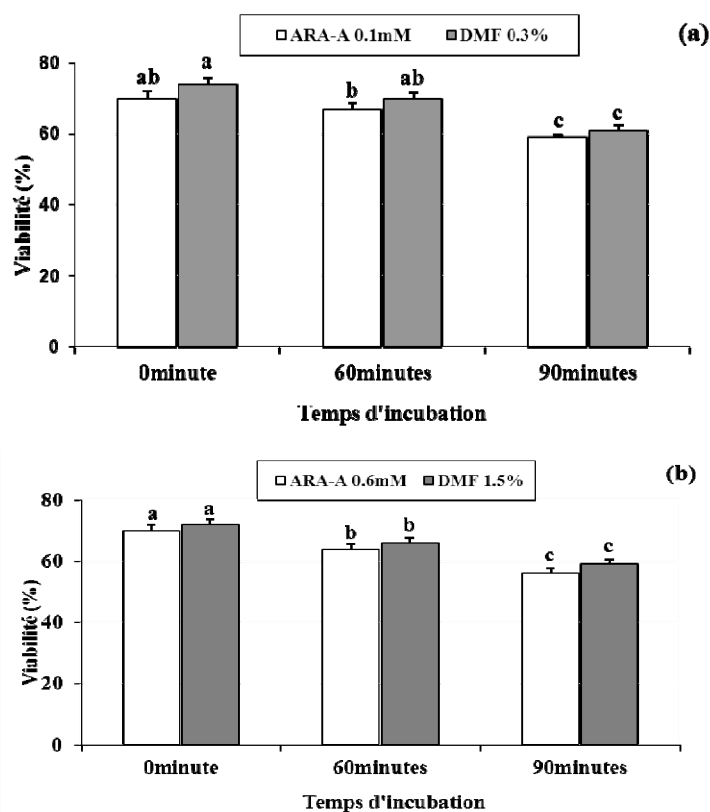


Figure 1 : Pourcentages de viabilité des spermatozoïdes incubés à 35°C en présence d'ARA-A 0,1mM (a) et d'ARA-A 0,6mM (b) ainsi que de leurs témoins DMF correspondants. (^a, ^b, ^c) indiquent les différences significatives par rapport au témoin correspondant (P<0,05, test T, moyenne ± SEM, n=12).

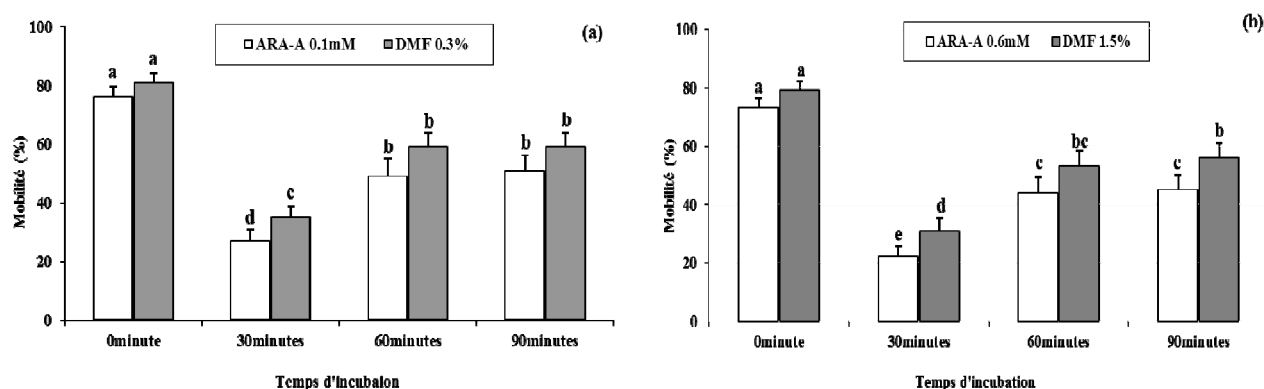


Figure 2 : Pourcentages de mobilité des spermatozoïdes incubés à 35°C en présence d'ARA-A 0,1mM (a) et d'ARA-A 0,6mM (b) ainsi que de leurs témoins DMF correspondants. (^a, ^b, ^c, ^d, ^e) indiquent les différences significatives par rapport au témoin correspondant (P<0,05, test T, moyenne ± SEM, n=12).

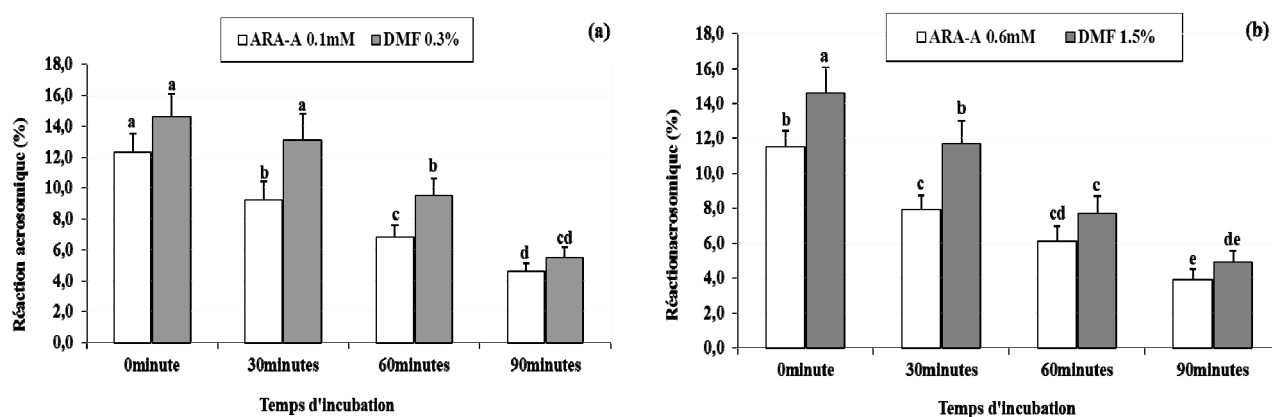


Figure 3 : Pourcentages de réaction acrosomique des spermatozoïdes incubés à 35°C en présence d'ARA-A 0,1mM (a) et d'ARA-A 0,6mM (b) ainsi que de leurs témoins DMF correspondants. (^a, ^b, ^c, ^d, ^e) indiquent les différences significatives par rapport au témoin correspondant (P<0,05, test T, moyenne ± SEM, n=12).

Tableau 1 : Effet de l'inhibiteur de l'AMPK (Compound C) sur la mobilité, la viabilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq après 1h d'incubation à 35°C.

échantillon	% viabilité des spz	% mobilité des spz	% réaction acrosomique des spz
Compound.C 1μM	65,19 ± 2,01 ^a	27,17 ± 2,65 ^{bc}	19,68, ± 2,00 ^{bc}
Compound.C 5μM	65,03 ± 1,34 ^a	22,00 ± 2,78 ^{cd}	16,60 ± 1,75 ^c
Compound.C 10μM	59,79 ± 1,32 ^b	17,25 ± 2,44 ^d	12,75 ± 1,48 ^d
DMSO 0,01%	67,74 ± 1,94 ^a	34,92 ± 3,43 ^a	28,19 ± 2,90 ^a
DMSO 0,05%	66,84 ± 1,35 ^a	31,58 ± 3,53 ^{ab}	23,86 ± 2,70 ^{ab}
DMSO 0,1%	67,35 ± 1,62 ^a	26,08 ± 3,66 ^{bc}	21,15 ± 2,47 ^b

Les annotations différentes (^{a,b,c,d}) indiquent les différences significatives par rapport au témoin correspondant au sein d'une même colonne au seuil 5% (Anova, n=12).