



**HAL**  
open science

# Rôle des protéines clés de signalisation dans la qualité de cellules de reproduction destinées à être cryopréservées

Thi-Mong-Diep Nguyen

## ► To cite this version:

Thi-Mong-Diep Nguyen. Rôle des protéines clés de signalisation dans la qualité de cellules de reproduction destinées à être cryopréservées. Other [q-bio.OT]. Université François Rabelais (Tours), 2015. English. NNT: . tel-02799437

**HAL Id: tel-02799437**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02799437v1>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

# UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

*ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant*  
PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET DES COMPORTEMENTS "PRC"

UMR CNRS 7247 - UMR INRA 0085

## THÈSE présentée par : NGUYEN Thi Mong Diep

soutenue le : 29 Septembre 2015

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

### Rôle de protéines clés de signalisation dans la qualité de cellules de reproduction destinées à être cryopréservées

THÈSE dirigée par :

Dr. BLESBOIS Elisabeth

Ingénieur de Recherche, HDR, INRA, Nouzilly

RAPPORTEURS :

Dr. DREVET Joël

Dr. MOREAU Marc

Professeur, Université Blaise Pascal 2- Clermont - Ferrand

Directeur de Recherche émérite, Université Paul Sabatier, Toulouse

JURY :

Dr. BLESBOIS Elisabeth

Dr. DREVET Joël

Dr. MOREAU Marc

Dr. DUITTOZ Anne

Dr. LAREYRE Jean-Jacques

Ingénieur de Recherche, HDR, INRA, Nouzilly

Professeur, Université Blaise Pascal 2- Clermont - Ferrand

Directeur de Recherche émérite, Université Paul Sabatier, Toulouse

Professeur, Université François-Rabelais de Tours

Directeur de Recherche, INRA, Rennes

# Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier chaleureusement le Professeur Elisabeth BLESBOIS de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir dirigé ce travail de thèse. Je pense que nous avons su forger une relation de confiance. Ensemble, nous avons eu l'occasion de partager de très bons moments et nous avons fait face à certaines difficultés de la recherche scientifique. Ce sera toujours un très grand plaisir pour moi de travailler avec Elisabeth B.

Je remercie le Gouvernement Vietnamien pour avoir financé mes quatre années de thèse. Merci à l'INRA et l'Agence nationale de la recherche (ANR Cryobirds) de m'avoir aidé à financer ma participation aux congrès, mes voyages et mon projet de recherche en France.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur Joël DREVET et au Professeur Marc MOREAU qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier le Professeur Anne DUITTOZ et le Professeur Jean-Jacques LAREYRE pour avoir accepté d'être membres du jury de ma thèse.

Je souhaite remercier Monsieur Florian GUILLOU, directeur de l'unité de recherche de la Physiologie de la Reproduction et des Comportements pour m'avoir ouvert les portes de cette structure.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Michel DUCLOS pour son accueil chaleureux au sein de l'Unité de Recherches Avicoles.

Le temps de ma thèse est bientôt terminé, ces quatre années sont passées à la vitesse de l'éclair. Que de bons souvenirs sont rattachés à ces années, dans le laboratoire et à l'extérieur... J'ai rencontré des personnes inoubliables. Quelle aventure... Bien entendu, je remercie particulièrement l'ensemble de l'équipe « Gonade-Conservation-régénération », « Fonction et Régulation des Protéines de l'Oeuf », « Gonadotropines », et « Unité expérimentale de Recherches Avicoles ».

Je remercie le Professeur Yves COMBARNOUS pour son aide concernant la rédaction des publications liées à ma thèse. Je le remercie également pour ses précieux conseils et le travail de relecture très soigné qu'il a effectué pour mes travaux.

J'adresse des remerciements particuliers à Sabine ALVES, Isabelle GRASSEAU et Patricia SOLNAIS qui m'ont permis de débiter dans les laboratoires, ainsi qu'à Christophe

PRAUD, qui a pris la suite, pour toute l'aide et l'attention qu'il m'a apporté le manip d'immunofluorescence.

Je voudrais remercier François SEIGNEURIN pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses conseils et son aide pour toutes les manipulations liées à la congélation/décongélation.

Je remercie Marina GOVOROUN, Pascal FROMENT et Aurore THELIE pour leur aide et leur grand professionnalisme. Travailler et discuter avec vous a été un grand plaisir. Je tiens à remercier Yves NYS, Nicolas GUYOT et Maries MILLS pour avoir toujours été disponible pour m'aider quand j'en avais besoin. Merci aussi à Michelle MAGISTRINI, Sophie REHAULT, Joël GAUTRON, Aurélien BRIONNE et Magali CHESSE pour leurs conseils et leur disponibilité.

Je voudrais remercier Anne DUITTOZ et Sonia METAYER-COUSTARD qui m'ont donné beaucoup de leur temps et conseillé sur la rédaction d'une publication liée à ma thèse. Merci à Estelle-Cailleau AUDOUIN pour m'avoir donné des échantillons. Merci à Danièle KLETT pour m'avoir aidé techniquement.

Un grand merci à toute l'unité expérimentale de Recherches Avicoles : Philippe DIDIER, Harold RIGOREAU, Frédéric MERCERAND et Joël DELAVEAU pour m'avoir aidé pour la collecte et le travail au couvoir.

Je voudrais exprimer mes plus chaleureux remerciements à toutes les équipes de l'URA pour leur accueil et leur gentillesse. Je remercie particulièrement toute l'équipe GCR, FRPO pour leurs conseils, les discussions animées et les cafés partagés.

Je remercie Marie-Françoise PINAULT, Beatrice DESMET, Sophie MARY et Ghislaine PLOUX pour m'avoir toujours accueillie dans leur bureau avec le sourire et pour avoir été là pour m'aider dans les tâches administratives.

J'ai également une pensée pour tous mes compagnons de route : Vanessa, Melanie, Michael, Edith, Pauline, Mélanie, Laura et ceux que j'oublie! Merci à tous!

Un grand merci à Nicolas MARCOUX pour m'avoir fait découvrir la culture française, pour sa gentillesse et sa générosité. Merci pour m'avoir fait voyager en France et pour s'être promené à Tours à pied ou à vélo avec moi. Merci de m'avoir aidé à corriger en français et en anglais mes travaux.

Je remercie affectueusement ma famille pour leur investissement, leur soutien, leur encouragement et leur patience tout au long de mes études. Merci d'avoir toujours cru en moi.

## Résumé

Le métabolisme énergétique des spermatozoïdes est un élément clé de leurs capacités de fécondation. Le gamète mâle a des besoins en ATP importants, en raison de l'énergie qu'il doit utiliser pour se mouvoir et féconder l'ovocyte. Pour ces raisons, l'étude de la kinase AMPK, acteur majeur de la gestion énergétique, est au centre de ce travail. Les objectifs de cette thèse de doctorat ont été de caractériser et de décrire des éléments clés de la voie de signalisation de l'AMPK, de comprendre leur implication dans les spermatozoïdes de coq et d'explorer comment leurs modulateurs peuvent impacter les fonctions des gamètes conservés *in vitro*.

L'étude de l'impact d'activateurs et d'inhibiteurs de l'AMPK sur la phosphorylation de l'AMPK et la qualité des spermatozoïdes a conforté l'hypothèse que l'AMPK joue un rôle dans plusieurs fonctions en lien avec leur métabolisme énergétique, essentiellement la mobilité et l'aptitude à la réaction acrosomique, et que ce rôle pourrait être différent de celui qu'elle a dans d'autres classes animales. Les activateurs AICAR et Metformine ont stimulé la mobilité et l'aptitude à la réaction acrosomique. Au contraire, l'inhibiteur Compound C a diminué la mobilité et la capacité à la réaction acrosomique mais n'a pas eu d'effet sur la viabilité. L'AICAR et la Metformine ont également stimulé la production de lactate, mais seul l'AICAR a stimulé la concentration d'ATP tandis que le Compound C a diminué les deux. Ces travaux montrent le rôle central de l'AMPK dans la régulation des fonctions des spermatozoïdes.

Nous avons par la suite étudié le rôle de l'AMPK dans des spermatozoïdes de coq congelés/décongelés. La phosphorylation de l'AMPK, les activités des enzymes anti-oxydantes, le potentiel mitochondrial, l'ATP, le citrate, la viabilité, la capacité à accomplir la réaction de l'acrosome (AR) et les différents paramètres de la mobilité ont été affectés négativement par le processus de congélation-décongélation tandis que les espèces réactives de l'oxygène (ROS): la peroxydation des lipides (LPO) et la concentration de lactate ont été considérablement augmentées. Cependant, l'AICAR a partiellement restauré la superoxyde dismutase (SOD): la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR): stimulé la production d'ATP, de citrate, et de lactate et par la suite diminué les ROS et la LPO (malondialdéhyde) dans les spermatozoïdes décongelés. Par conséquent, les paramètres de la mobilité et de la réaction acrosomique ont été améliorés. La Metformine a eu des effets similaires à ceux de l'AICAR, mais a également stimulé l'activité de la catalase et diminué l'ATP et le potentiel mitochondrial. L'inhibiteur Compound C a montré des effets opposés à

l'AICAR sur SOD, ROS, LPO et AR et les paramètres de la mobilité. Nos résultats montrent que l'AMPK joue un rôle important dans la régulation des fonctions antioxydantes des spermatozoïdes congelés-décongelés. Sa stimulation limite les effets négatifs de la cryopréservation.

Nous avons par la suite étudié la régulation de la voie de signalisation de l'AMPK par des kinases (CaMKK et CaMKI) liées aux canaux calciques et observé leurs effets sur les fonctions biologiques des spermatozoïdes de coq. Nous avons montré pour la première fois la présence des CaMKKs ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et de CaMKI dans différents compartiments subcellulaires des spermatozoïdes. Nous avons aussi mis en évidence les changements dans la voie de régulation de l'AMPK, dans la mobilité des spermatozoïdes et dans la RA liés au calcium extracellulaire via les voies  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKKs/CaMKI. L'AMPK n'est phosphorylée par CaMKKs que lorsque du calcium extracellulaire pénètre dans les cellules. La voie de CaMKI est phosphorylée par CaMKKs plus rapidement en présence de calcium extracellulaire qu'en absence de calcium extracellulaire. Nous avons aussi montré que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux SOCs est la voie la plus stimulante pour la phosphorylation de l'AMPK via l'activation de CaMKK. Notre étude suggère également que l'activation de l'AMPK et de CaMKI par CaMKKs régule la mobilité et la RA des spermatozoïdes.

Cette thèse a permis d'identifier et de proposer une approche du rôle de différents acteurs de signalisation liés au métabolisme énergétique et aux flux calciques des spermatozoïdes. Ces acteurs ont été identifiés et étudiés pour la première fois dans les gamètes aviaires. L'un d'entre eux (CaMKI) a également été identifié pour la première fois dans les cellules reproduction. Ces travaux ont aussi permis d'évaluer dans quelle mesure ces protéines sont altérées par la cryopréservation cellulaire, quels dysfonctionnements métaboliques peuvent y être associés et comment ces effets négatifs peuvent être contrecarrés. Ces résultats pourront mener à modifier les protocoles de cryopréservation pour mieux prendre en compte ces nouveaux facteurs.

**Mots clés** : reproduction, AMPK, Metformine, AICAR, Compound C, CaMKK, CaMKI

## Résumé en anglais

The energy metabolism of sperm is a key element of fertilization as it allows them to reach the egg and fertilize it. The sperm cell has important ATP needs, probably because of the energy it uses to move and fertilize the egg. For these reasons, the study of the AMPK kinase, a major actor in energy management, is the focus of this thesis. The objectives of this dissertation is to characterize and describe key elements of the signaling pathway of AMPK, understand their involvement in chicken sperm, and explore how their modulators may impact the function of in vitro preserved gametes.

The study of the impact of AMPK activators and inhibitors on the phosphorylation of AMPK and quality of fresh sperm in vitro has reinforced the hypothesis that AMPK plays a role in many functions related to their energy metabolism, mainly motility and the ability to accomplish the acrosome reaction, and that this role could be different than it has in other animal classes. The activators AICAR and Metformin stimulated motility and the ability to accomplish the acrosome reaction. On the contrary, the inhibitor Compound C decreased motility and the ability to accomplish acrosome reaction but had no effect on viability. AICAR and Metformin also stimulated lactate production, but only AICAR stimulated ATP concentration, while Compound C reduced both. This work shows the central role of AMPK in the regulation of sperm functions.

We then studied the role of AMPK in frozen/thawed chicken sperm. AMPK phosphorylation, antioxidant enzymes activity, mitochondrial potential, ATP, citrate, viability, ability to accomplish the acrosome reaction (AR) and the various parameters of motility, were adversely affected by the freeze-thaw process while the reactive oxygen species (ROS): lipid peroxidation (LPO) and lactate concentration were significantly increased. However, AICAR partially restored superoxide dismutase (SOD): glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR): stimulated the production of ATP, citrate and lactate and subsequently decreased ROS and LPO (malondialdehyde) in the thawed sperm. Consequently, the parameters of motility and acrosome reaction were improved. MET had similar effects to those of AICAR, except it also stimulated the activity of catalase and decreased ATP and mitochondrial potential. The inhibitor Compound C showed the opposite effects of AICAR on SOD, ROS, LPO and AR and the mobility parameters. Our results show that AMPK plays an important role in antioxidant enzymes and is related to regulating the functions of frozen / thawed sperm. Its stimulation limits the negative effects of cryopreservation.

We then studied the regulation of signaling pathway of AMPK by kinases (CaMKK and CaMKI) related to calcium channels and observed their effects on biological functions of rooster sperm. We showed for the first time the presence of CaMKKs ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and CaMKI in different subcellular compartments of sperm. We also highlighted changes in the control channel of AMPK, in sperm motility and RA related to extracellular calcium via  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKKs/CaMKI pathways. The CaMKI pathway is phosphorylated quicker by CaMKKs in presence of extracellular calcium than in absence of it. We also showed that the  $\text{Ca}^{2+}$  entry by the SOC is the most stimulating route for the activation of AMPK through CaMKK. Our study also suggests that the activation of AMPK and CaMKI by CaMKKs regulates sperm RA and motility.

This study identified and proposed an approach of the role of different signaling pathways actors related to energy metabolism and calcium fluxes of sperm. These actors have been identified and studied for the first time in avian gametes. One of them (CaMKI) was also identified for the first time in breeding cells. This work also assessed how these proteins are altered by cell cryopreservation, which metabolic dysfunctions may be associated to them and how these negative effects can be countered. These results could lead to change cryopreservation protocols to better take into account these new factors.

**Keywords:** reproduction, AMPK, Metformin, AICAR, Compound C, CaMKK, CaMKI

# Table des matières

Remerciements

Résumé

Résumé en anglais

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des publications et communications

Liste des abréviations

**Introduction** ..... 1

**Synthèse bibliographique** ..... 3

**1.** ..... A

**anatomie et physiologie du tractus génital chez les oiseaux** ..... 4

1.1. Anatomie de l'appareil génital mâle ..... 4

1.1.1. Testicules..... 4

1.1.2. Voies déférentes ..... 7

1.1.3. Appareil copulateur ..... 7

1.2. Spermatogenèse..... 7

1.3. Sperme..... 8

1.3.1. Spermatozoïdes ..... 8

1.3.2. Plasma séminal..... 11

1.4. Transport, maturation et stockage des sperme dans l'appareil reproducteur mâle ..... 12

1.5. Devenir des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles..... 12

**2. Cryoconservation des spermatozoïdes de coq** ..... 15

2.1. Dommages aux spermatozoïdes associés au refroidissement, à la décongélation et aux chocs thermiques du processus de cryopreservation..... 16

2. 2. Les éléments senseurs de la cryopréservation ..... 17

2.2.1. Les dilueurs ..... 17

2.2.2. La dilution ..... 18

2.2.3. Les cryoprotecteurs ..... 19

2.2.4. Le conditionnement en paillettes pour la conservation de sperme en cryobanque ..... 21

2.2.5. Récolte de la semence ..... 21

<b>3. Methodes d'evaluation des spermatozoïdes</b> .....	<b>21</b>
3.1. Membrane plasmique et intégrité morphologique des spermatozoïdes .....	22
3.2. Évaluation de la fonction mitochondriale .....	24
3.3. Marqueurs testant la réaction acrosomique .....	26
3.4. Évaluation de la mobilité des spermatozoïdes .....	27
3.5. Mesure du pouvoir de fécondation des spermatozoïdes.....	29
<b>4. L'ampk, amp-activated protein kinase</b> .....	<b>30</b>
4.1. Rôle de l'AMPK dans le métabolisme.....	30
4.2. Structure .....	31
4.3. Régulation de l'activité de l'AMPK .....	33
4.3.1. Régulation par des kinases en amont .....	33
4.3.2. Inactivation par des protéines phosphatases.....	34
4.3.3. Activateurs et inhibiteurs pharmacologiques .....	35
4.4. Fonction de l'AMPK.....	37
4.4.1. Régulation du métabolisme des carbohydate.....	37
4.4.2. Régulation du métabolisme des lipides .....	37
4.4.3. Régulation de la néoglucogenèse (principalement dans le foie) .....	38
4.4.4. Régulation de la synthèse protéique .....	38
4.4.5. Régulation de la biogenèse mitochondriale .....	38
4.4.6. Rôles de l'AMPK dans la reproduction .....	39
<b>5. Rôle des canaux calciques impliqués dans les fonctions des spermatozoïdes</b> .....	<b>42</b>
5.1. Canaux calciques voltage-dépendants (VOCCs) .....	43
5.2. Store-operated calcium channels (SOCCs) .....	44
5.3. CatSper .....	45
5.4. Échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ .....	45
5.5. Les $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases .....	46
5.6. Protéines liant le $\text{Ca}^{2+}$ .....	48
5.7. Les récepteurs inositol 1, 4, 5-triphosphates (IP3R) .....	48
5.8. Les récepteurs ryanodine (RYR).....	49
<b>Objectifs de la thèse</b> .....	<b>50</b>
<b>Résultats expérimentaux</b>	
Chapitre I : L'AMPK joue un rôle dans le métabolisme énergétique des spermatozoïdes et dans la régulation des fonctions des spermatozoïdes (mobilité, réaction acrosomique) liées au pouvoir fécondant.....	<b>52</b>

Chapitre II : L'AMPK limite la peroxydation, la production de radicaux libres de l'oxygène, stimule défenses enzymatiques anti-oxydantes et joue un rôle dans la régulation des fonctions des spermatozoïdes (la mobilité, la réaction acrosomique) dans les spermatozoïdes cryopréservés.....	71
Chapitre III : Effets de Calmodulin-dependent protein Kinase Kinases (CaMKKs) sur l'activation de l'AMPK impliqué dans la régulation des fonctions des spermatozoïdes (mobilité, réaction acrosomique).....	107
<b>Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>141</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>158</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>178</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification et caractéristiques des colorants utilisés pour l'analyse de l'intégrité membranaire (d'après Chalah T, 1999).....	<b>23</b>
<b>Tableau 2</b> : Critères d'analyse de motilité massale chez les oiseaux domestiques (d'après Petitjean, 1965).....	<b>29</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Schéma de l'appareil génital du coq (d'après Hodges, 1974).....	6
<b>Figure 2</b> : Vascularisation du testicule de coq (d'après Nishida, 1964).....	6
<b>Figure 3</b> : Diagramme de la spermatogenèse. Le nombre et la durée des divisions spermatogoniales ne sont pas connues chez le coq (d'après de Reviers, 1988).....	10
<b>Figure 4</b> : Ultrastructure du spermatozoïde de coq (d'après de Reviers, 1988).....	11
<b>Figure 5</b> : Anatomie du tractus génital et urinaire chez la femelle en période de reproduction (d'après Taylor, 1970).....	14
<b>Figure 6</b> : Déroulement de la réaction acrosomique chez le coq (d'après Okamura et Nishiyama, 1978).....	14
<b>Figure 7</b> : Marquage au SYBR14/IP des spermatozoïdes (X 400). Les spermatozoïdes colorés en verts sont viables (cellule SYBR14+). Les spermatozoïdes colorés en rouges sont morts (photos D.Nguyen, INRA).....	24
<b>Figure 8</b> : Coloration de spermatozoïdes avec l'éosine-nigrosine. (a) spermatozoïdes morts (éosinophile) ; (b) spermatozoïde cassé au niveau de la tête; (c) spermatozoïdes avec une pliure au niveau de la pièce intermédiaire; (d) spermatozoïde vivant normal (photos D.Nguyen, INRA).....	24
<b>Figure 9</b> : (a) Coloration de spermatozoïdes avec MitoTracker red : mitochondries actives avec un potentiel de membrane élevé (fluorescence rouge) ; (b) Coloration de spermatozoïdes avec JC-1 : les mitochondries actives avec un potentiel de membrane élevé (fluorescence orange) sont distinctes de celles à faible activité (fluorescence verte) qui indiquent des spermatozoïdes morts (photos D.Nguyen, INRA).....	26
<b>Figure 10</b> : spermatozoïde marqué à la PNA-FITC. (a) : spermatozoïde observé en lumière blanche ; (b) : le même spermatozoïde ayant l'acrosome marqué à la PNA-FITC en vert (photos D.Nguyen, INRA).....	27
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique de la VAP, VCL et VSL (Source de Select Breeders services).....	28
<b>Figure 12</b> : Illustration des domaines et principales phosphorylations couplés à la structure cristallographique de la sous-unité $\alpha$ de l'AMPK. ....	32
<b>Figure 13</b> : Illustration des domaines et principales phosphorylations couplés à la structure cristallographique de la sous-unité $\beta$ de l'AMPK. ....	32

<b>Figure 14</b> : Illustration des différents domaines couplés à la structure cristallographique de la sous-unité $\gamma$ de l'AMPK.....	<b>33</b>
<b>Figure 15</b> : Schéma hypothétique de la régulation de l'activité de l'AMPK dans les spermatozoïdes aviaires.....	<b>155</b>
<b>Figure 16</b> : Schéma hypothétique du mécanisme impliqué dans les fonctions des enzymes antioxydantes de l'AMPK dans les spermatozoïdes aviaires. ....	<b>156</b>
<b>Figure 17</b> : Schéma hypothétique de la voie de signalisation du calcium impliquée dans la régulation de l'activation de l'AMPK dans les spermatozoïdes aviaires. ....	<b>157</b>

## **Annexes**

<b>Annexe 1:</b> Changes in the intracellular free $\text{Ca}^{2+}$ concentration in chicken sperm with or without the inhibitors of $\text{Ca}^{2+}$ channel activity at $35^{\circ}\text{C}$ (Article 3) .....	<b>.178</b>
<b>Annexe 2:</b> Effect of $\text{Ca}^{2+}$ channel activity inhibitors (Nifedipine, SNX-482 and MRS-1845) with $+\text{Ca}^{2+}$ on STO-609-induced AMPK phosphorylation in sperm and sperm functions (Article 3) .....	<b>179</b>

# Liste des publications et communications

## Publications

**2014** : **Thi Mong Diep Nguyen**, Alves S, Grasseau I, Métayer-Coustard S, Praud C, Froment P, Blesbois E. Central Role of 5'-AMP-Activated Protein Kinase in Chicken Sperm Functions. *Biol Reprod.* **91** : 121, 1-15.

**2015** : **Thi Mong Diep Nguyen**, Seigneurin F, Froment P, Combarnous Y, Blesbois E. The 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is involved in the antioxidant defenses and cryopreserved chicken sperm functions. *PLoS One.* **10**(7):e0134420.

**2015** : **Thi Mong Diep Nguyen**, Combarnous Y, Praud C, Duittoz A, Blesbois E. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) effect on AMP-activated Protein Kinase (AMPK) regulation of chicken sperm functions (*En révision PLOS ONE*).

**2015** : **Thi Mong Diep Nguyen**, Froment P, Combarnous Y, Blesbois E. Rôle de l'AMPK des spermatozoïdes dans le contrôle de la reproduction. (*Article en préparation*).

**2015** : Danièle KLETT, Philippine MESLIN, **Thi Mong Diep NGUYEN**, Julie MARIOT, Gwenaël JÉGOT, Claire CAHOREAU & Yves COMBARNOUS#. Real-time cAMP synthesis in mouse Tumor Leydig cells in response to gonadotropins: Modulation by Estrogens and Adiponectin. (*Article en préparation*)

**2015** : **Thi Mong Diep Nguyen**, Combarnous Y, Duittoz A, Blesbois E. Potential involvement of IP3R, TRPC1 and L-type channels in the chicken acrosome reaction and motility (*Article en préparation*).

## Communications à des congrès scientifiques

**CRYOBIRDS (15-16/11/2013) : Thi Mong Diep Nguyen, Alves S, Grasseau I, Froment P, Blesbois E.** Role of AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) in the quality of avian male gametes. CRYOBIRDS (Développement de biotechnologies de la reproduction aviaire pour la gestion de la diversité génétique): Saint-Malo (France) (Présentation orale).

**JRA228 (26-28/03/2013) : Thi Mong Diep Nguyen, Alves S, Grasseau I, Froment P, Blesbois E.** Effets des inhibiteurs de l'AMPK (Compound.C et ARA-A) sur la semence de coq. 10èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras; La Rochelle (France) (Poster).

**GB1-0558 (19-23/10/2014) : Thi Mong Diep Nguyen, Francois S, Praud C, Froment P, Blesbois E.** Role of Metformin in the functions of frozen-thawed chicken sperm. 10th Asia Pacific Poultry Conference in Korea (Présentation orale).

**S12 (23-29/06/2014) : Thi Mong Diep Nguyen, Alves S, Métayer-Coustard S, Praud C, Froment P, Blesbois E.** Role of the AMPK protein (5'-AMP-activated protein kinase) in the functions of chicken sperm. European Poultry Conference in Norway (Présentation orale).

**JRA40574580 (25-26/03/2015) : Thi Mong Diep Nguyen, Francois S, Praud C, Froment P, Blesbois E.** Effets de la Metformine sur la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq frais et congelés. 11èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras ; Tours (France) (Présentation poster).

## Liste des abréviations

ACC : acétyl-CoA carboxylase

ADP : adénosine diphosphate

AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside

AKT : protéine kinase B

AMP : adénosine monophosphate

AMPK : AMP-activated protein kinase

ATP : adénosine triphosphate

BPSE : Beltsville poultry semence extender

Ca<sup>2+</sup> : calcium

CaM : calmoduline

CaMKI : calmodulin-dependant kinase I

CaMKK : calmodulin-dependant kinase kinase

DMA N-diméthylacétamide

DMF diméthyl formamide

DMSO le diméthyl sulfoxyde

FOXO : Forkhead box protein O1

FSH follicle stimulating hormone

GUV : glandes utéro-vaginales

HDL : high density lipoprotéins

HMG-CoA reductase: hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase

HNF4 $\alpha$  : Hepatocyte nuclear factor 4 alpha

HVA : high voltage-activated

IA : insémination artificielle

IP3R : récepteurs inositol 1, 4, 5-triphosphates

LH : luteinizing hormone

LKB1 : kinase hépatique B1

LPO : peroxydation lipidique

LVA : low voltage-activated

MAPKs : Mitogen-activated protein kinases

Metformine : N, N-diméthylimidocarbonimidic diamide

MPVI : membrane périvitelline interne

mTOR : mammalian target of rapamycin

Na<sup>+</sup> : sodium

PGC-1 $\alpha$  : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PGCs : primordial germ cells

PI3K : phosphatididyl inositol 3 kinase

PKA : protéine kinase A

PP2 : protein phosphatase 2

PVP : polyvinyl pyrrolidone

RA : réaction acrosomique

RNE : espace nucléaire postérieur

ROS : réactifs de l'oxygène

RYR : récepteurs ryanodine

SHP : small heterodimer partner

SIRT1 : sirtuins 1

TAK1 : transforming growth factor- $\beta$ -Activated Kinase 1

VHDL : very low density lipoproteins

# **Introduction**

## Introduction

Depuis environ un siècle, la production avicole s'est considérablement développée dans le monde, en quantité comme en qualité. Elle possède une place importante dans le cadre de l'apport de protéines animales dans l'alimentation humaine. La consommation de viande de volaille constitue en effet 20 à 25% de la consommation totale de viande dans le monde. Dans les pays en développement, cette part est de 30% minimum. Selon la FAO (<http://vcn.vnn.vn>): la production mondiale de viande de volaille a augmenté de 1,6 % en 2014 et cette tendance devrait se poursuivre avec une augmentation annuelle d'environ 2,3% par an pour les dix prochaines années. Cette production est actuellement d'environ 134,5 millions de tonnes par an et la viande de volaille devrait être la plus consommée dans le monde à partir de 2020.

L'élevage de volaille progresse en s'appuyant notamment sur une sélection de races à haut rendement pour produire de la viande ou des œufs de manière plus efficace et plus rapidement. Cependant, l'élevage industriel intensif d'animaux pour la production de viande et d'œufs a beaucoup réduit la diversité génétique des espèces aviaires domestiques, les rendant notamment plus vulnérables aux maladies et aux variations de l'environnement. On constate aussi une quasi absence de prise en compte des caractères de reproduction dans les schémas de sélection peut-être liée à la méconnaissance des facteurs régissant la qualité des gamètes. Ainsi, la moitié des races et lignées d'oiseaux domestiques est en voie d'extinction. Cela vaut également pour les espèces sauvages, mais des raisons différentes. Face à ces menaces sur la biodiversité aviaire, l'utilisation des biotechnologies de la reproduction devient incontournable pour assurer des réservoirs de gènes suffisamment diversifiés pour faire face aux évolutions des écosystèmes et aux épidémies (Blesbois, 2005 ; Batellier et al, 2005 ; Govoroun et al, 2005 ; Blesbois et Brillard, 2005).

La conservation du sperme est un outil majeur de gestion *ex situ* des ressources génétiques des animaux mâles. Cependant, le processus de congélation/décongélation provoque des altérations biochimiques et physiques, notamment des altérations du métabolisme oxydatif et énergétique. L'ensemble des fonctions cellulaires doit être restitué intégralement après cryopréservation pour que les cellules germinales puissent s'insérer dans un processus de reproduction efficace, notamment la mobilité et la capacité à accomplir la réaction acrosomique. Résoudre ces difficultés techniques permettra à cet outil d'occuper la place importante qui lui revient.

Au-delà d'un intérêt scientifique intrinsèque, l'identification et l'utilisation de nouveaux marqueurs métaboliques clés des cellules germinales peut donc s'avérer très utile pour, d'une part, prédire l'aptitude à la cryopréservation cellulaire, et, d'autre part, contribuer à améliorer les biotechnologies pour la gestion des ressources génétiques.

Dans ce projet, nous nous intéressons à un petit nombre de protéines senseurs des voies de signalisation impliquées dans le métabolisme cellulaire, et en particulier à des molécules qui sont centrales dans le métabolisme énergétique cellulaire. L'AMPK est un complexe protéique activé en cas de déficit énergétique et de stress qui permet le maintien de l'homéostasie énergétique. Lorsqu'elle est activée, l'AMPK réprime les voies anaboliques consommatrices d'énergie (lipogenèse, néoglucogenèse, synthèse protéique) et active les voies cataboliques productrices d'énergie (oxydation des acides gras, glycolyse, protéolyse). Cette protéine est ubiquitaire mais son rôle tissu spécifique a bien été montré dans le foie, le muscle et le tissu adipeux. Cependant, la fonction de l'AMPK dans les spermatozoïdes en général n'a pas encore été suffisamment explorée et elle ne l'avait pas du tout été dans les spermatozoïdes d'oiseaux avant nos travaux. Par conséquent, ce travail a pour objectif principal d'étudier l'implication de l'AMPK dans la fonction de reproduction chez l'oiseau mâle.

La première partie de ce mémoire est consacrée à une synthèse bibliographique. Celle-ci résume dans un premier temps les connaissances actuelles sur la reproduction des oiseaux et la biologie des gamètes mâles et le rôle de canaux calciques dans les spermatozoïdes. Une partie de cette recherche bibliographique a ensuite été consacrée au processus de cryoconservation des spermatozoïdes. Nous étudierons l'histoire de la cryoconservation de la semence et des dommages associés au refroidissement et au choc thermique qu'elle cause. Puis les méthodes d'évaluation de la qualité de spermatozoïdes, la régulation et les fonctions cellulaires de l'AMPK, ainsi que les implications connues de l'AMPK dans les organes régulant la fonction de reproduction, et enfin, nous présenterons les principaux canaux calciques membranaires.

Les résultats expérimentaux de ce travail sont rapportés dans la seconde partie sous la forme de trois articles. Nous y avons en particulier abordé le rôle de l'AMPK dans les spermatozoïdes de coq frais et cryopréservés avant d'étudier la régulation de l'AMPK par des kinases (CaMKKs et CaMKI) en relation avec le métabolisme du calcium. La dernière partie tire les conclusions des résultats obtenus et analyse les perspectives qui découlent de ce travail.

# **Synthèse bibliographique**

## Synthèse bibliographique

Les oiseaux forment une classe de vertébrés supérieurs dont les membres antérieurs ont évolué en ailes, permettant en général l'exercice du vol. L'aptitude au vol s'accompagne de caractéristiques physiologiques favorables à ce mode de déplacement comme les plumes et les sacs aériens. D'autres paramètres facilitent l'adaptation des oiseaux à des conditions environnementales très variables. Parmi ceux-ci (Blesbois, 2014): l'oviparité des oiseaux a évolué vers la production d'œufs télolécithes (avec un volume considérable de vitellus) entourés d'une coquille solide qui procurent à l'embryon un environnement nourricier sécurisé. Contrairement aux mammifères, c'est le gamète femelle qui détermine le sexe chez les oiseaux : l'ovocyte haploïde, hétérogamétique, est porteur d'un chromosome sexuel Z ou W, alors que les spermatozoïdes contiennent tous un chromosome Z. Dans la plupart des espèces aviaires, le chromosome W contient un très petit nombre de gènes (comme le Y de nombreux mammifères): à l'inverse du Z.

Chez presque tous les oiseaux, la présence d'un seul tractus génital femelle rationalise l'espace abdominal. L'ovaire et le tractus droit régressent lors du développement embryonnaire pour laisser se développer une grappe ovarienne et un oviducte gauches qui occupent l'essentiel de la cavité abdominale. L'oviducte unique est une zone très spécialisée assurant en particulier la survie, le stockage et la remontée des spermatozoïdes vers le site de fécondation, ainsi que la formation des différentes structures de l'œuf et le développement du zygote jusqu'à un stade avancé. Le stockage prolongé des spermatozoïdes dans des zones spécialisées de l'oviducte, les glandes utéro-vaginales (GUV): optimise la gestion des gamètes mâles en vue de la fécondation, participe à la sélection des meilleurs spermatozoïdes et à une compétition complexe entre spermes des géniteurs. Ce stockage permet également une "liberté adaptative" des femelles qui peuvent ainsi rester fertiles plusieurs semaines même en absence de mâle (Blesbois et Brillard, 2007). Cette adaptabilité est par exemple mobilisée lorsqu'une nouvelle fécondation est nécessaire en fin de période de reproduction pour compenser la perte de poussins.

La reproduction des oiseaux est, à bien des égards, plus proche de celle des reptiles que de celle des mammifères. Ils ont notamment en commun l'oviparité et le stockage prolongé des spermatozoïdes dans les voies femelle. Elle inclut aussi des particularités anatomiques, physiologiques et fonctionnelles propres à ces espèces telles que les glandes

utéro-vaginales où sont stockés les spermatozoïdes, l'existence d'un seul ovaire et d'un seul oviducte fonctionnels chez la femelle et la production d'œufs à coquille dure ou l'apparition d'un comportement de couvaion qui conduit au maintien d'une température et d'une hygrométrie permettant le développement embryonnaire.

## **1. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DU TRACTUS GÉNITAL CHEZ LES OISEAUX**

### **1.1. Anatomie de l'appareil génital mâle**

Les organes sexuels mâles sont internes chez les oiseaux et contrairement à ce que l'on observe chez la plupart des mammifères, les testicules ne migrent pas et demeurent donc sur leur site d'origine embryologique (Barrie, 2007). La spécificité la plus marquante est que la spermatogenèse se produit à la température interne de l'abdomen, soit environ 41°C. L'appareil génital des mâles peut être divisé en trois unités morphologiques qui sont les testicules, les voies déférentes et l'appareil copulateur.

#### **1.1.1. Testicules**

##### **1.1.1.1. Localisation et dimension testiculaire**

Chez les oiseaux, les testicules (droit et gauche) sont situés entre la base des poumons et les segments intermédiaires des reins. Ils ont à peu près la forme d'un haricot. Ils sont suspendus à la paroi dorsale de la cavité abdominale par un ligament, le mésorchium, très près de l'aorte et de la veine cave (Figure 1). La couleur des testicules est normalement blanchâtre même si elle peut devenir grise ou noire en liaison avec la présence de pigments de mélanine dans les mélanocytes du tissu conjonctif de chaque testicule (Barrie, 2007).

Bien que les deux testicules soient positionnés de manière symétrique par rapport au plan médian, ils sont souvent de taille asymétrique. Le testicule gauche est généralement plus grand que le droit chez de nombreuses espèces d'oiseaux, comme par exemple dans environ 60% des individus chez le coq domestique. Cependant chez certaines espèces, c'est le testicule droit qui est plus souvent de taille supérieure au gauche, comme chez la tourterelle rieuse (*Streptopelia risoria*) (Barrie, 2007). La taille des testicules des oiseaux adultes varie en fonction des espèces, des individus et de la saison (de Reviere, 1988). Cette croissance est due à l'augmentation de la longueur et du diamètre des tubes séminifères ainsi que du nombre de cellules de Leydig et de cellules interstitielles (de Reviere, 1988).

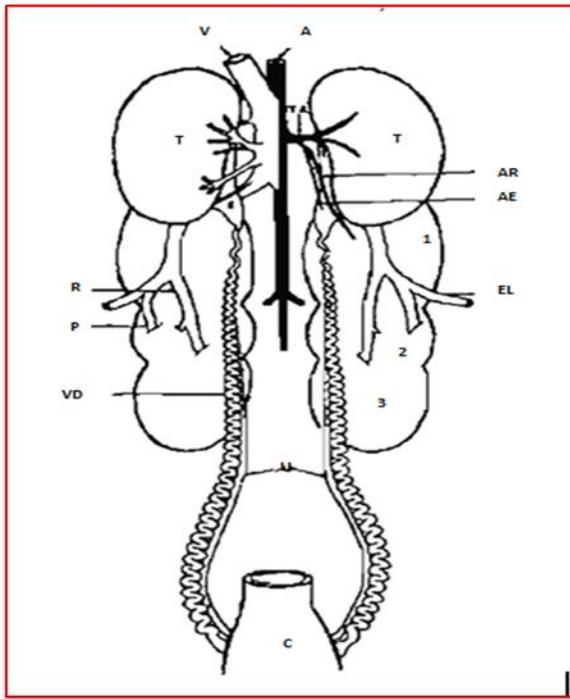
##### **1.1.1.2. Structure interne des testicules d'oiseau**

Le testicule est enchâssé dans une tunique fibreuse, l'albuginée, elle-même constituée de deux parois distinctes, la paroi interne et la paroi externe. La paroi externe (30 à 60  $\mu\text{m}$ ): n'est constituée que de quelques couches de cellules formant un tissu fibro-élastique lâche qui entoure le testicule. Cette première tunique est doublée par le péritoine interne de la cavité abdominale ; bien que constituée de couches relativement denses de fibres élastiques, de collagène et de fibroblastes, il ne semble pas y avoir de réel arrangement au sein de cette structure. A partir de dix semaines d'âge, les prolongements de cette paroi interne pénètrent largement dans le testicule pour couvrir la membrane basale des tubes séminifères (Marvan, 1969). Toutefois, contrairement aux mammifères, ils ne provoquent pas la formation de cloisons qui découpent le testicule en nombreux lobules.

Les compartiments intra-tubulaires représentent chez le coq environ 60% du volume testiculaire total à l'éclosion pour atteindre un maximum moyen de 95% à l'âge adulte (de Reviers, 1971a). Chez les oiseaux, les tubes séminifères se ramifient et se rejoignent pour former un réseau complexe qui se termine au niveau du *rete testis* (Marvan, 1969). Chez le coq adulte, leur longueur totale est de 100 à 300  $\mu\text{m}$  et leur diamètre moyen de 250 à 300  $\mu\text{m}$  (de Reviers, 1971a). Ils sont constitués d'un épithélium séminifère pluristratifié soutenu par une paroi basale. De la périphérie vers la lumière du tube séminifère, on trouve successivement, plus ou moins organisés en couches s'interpénétrant : des spermatogonies, des noyaux des cellules de Sertoli, des spermatocytes I, des spermatocytes II, des spermatides rondes, des spermatides allongées et enfin des spermatozoïdes testiculaires.

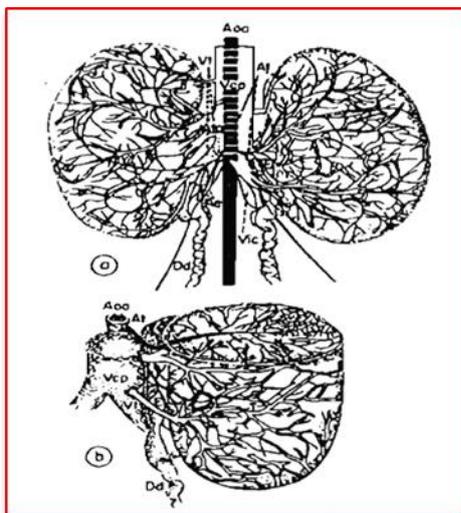
Chez l'adulte, les cellules de Sertoli, principalement sous le contrôle de la FSH, coordonnent l'activité des tubes séminifères et sécrètent de nombreuses protéines ainsi que des cellules myéloïdes. Le tissu intertubulaire (représentant 10% du tissu testiculaire) est réduit à un compartiment de petite taille qui ne représente que 5 à 15% du volume testiculaire chez le coq (de Reviers, 1971a) alors qu'il atteint 10 à 40% de ce volume chez les mammifères (Dadoune et Demoulin, 1991). Le tissu intertubulaire est constitué de tissu conjonctif, d'un réseau artério-veineux et lymphatique, ainsi que d'un réseau nerveux adrénergique, cholinergique. Il contient les cellules de Leydig qui, stimulées par la LH, ont une forte activité stéroïdogène (synthèse de testostérone en particulier). Le réseau artério-veineux testiculaire (Figure 2) a été largement décrit, notamment par Nishida (1964). Le sang arrive directement de l'aorte via une artère testiculaire très courte qui s'enfonce au plus profond du testicule pour se ramifier et irriguer l'ensemble du compartiment tubulaire. Les tubes séminifères sont alors drainés par des veinules qui se rejoignent de façon centrifuge

sous l'albuginée pour se déverser dans la veine cave par un collecteur très fin. Ce réseau ne comprend pas de complexe pampiniforme, comme celui décrit chez les mammifères (Waites, 1970) (qui régule la température testiculaire grâce à un contrôle du débit sanguin). En effet, les testicules étant internes chez les oiseaux, la régulation de la température testiculaire, ne nécessite pas la présence de mécanismes de régulation particuliers.



- A : aorte*
- V : Veine cave postérieure*
- TA : artère testiculaire*
- AR : artère rénale*
- AE : artère épидидymaire*
- T : testicules*
- E : épидидyme*
- C : cloaque*
- R : veine rénale*
- P : veine porte rénale*
- EI : veine iliaque externe*
- 1, 2, 3 : partie antérieure, moyenne et caudale du rein*
- VD : canal déférent*
- U : uretère*

**Figure 1 :** Schéma de l'appareil génital du coq (d'après Hodges, 1974)



- Aoa : aorte*
- At : artère testiculaire principale*
- Ata : artère testiculaire accessoire*
- Vt : Veines testiculaire*
- Ae : artère épидидyme*
- E : épидидyme*
- Dd : canal déférent*
- Vic : veine cave inférieure*

**Figure 2 :** Vascularisation du testicule de coq (d'après Nishida, 1964)

### **1.1.2. Voies déférentes**

Les tubes séminifères se terminent à proximité immédiate du hile testiculaire où ils se connectent avec les tubules du *rete testis*, eux-mêmes reliés au canal efférent, qui débouche latéralement dans le canal épидидymaire. Celui-ci se prolonge par le canal déférent, bien développé, qui s'étend sur 12 à 15 cm et aboutit par une vésicule spermatique dans la paroi latérale du segment intermédiaire du cloaque, l'urodaeum. Chacune des deux vésicules spermatiques se termine par une papille éjaculatrice à structure de pénis. Le canal déférent, où transitent les spermatozoïdes, est très contourné, de sorte que sa longueur réelle excède probablement 30 cm. Il peut être comparé, par ses fonctions, à l'épididyme des mammifères, car il est le lieu de maturation et de stockage des spermatozoïdes. Mais cette nomenclature est toujours discutée, certains auteurs assimilent la partie haute des canaux déférents à l'épididyme de mammifère (Hodges, 1974, Etches, 1996).

### **1.1.3. Appareil copulateur**

Cette dénomination regroupe l'ensemble des replis arrondis et lymphatiques du cloaque, le phallus et les corps vasculaires paracloacaux. Ces derniers sont des corps ovoïdes d'environ 1 cm de longueur sur 5 à 6 mm de diamètre enchâssés dans la paroi du cloaque, à proximité des vésicules spermatiques. Ils sont formés de glomérules vasculaires qui se gonflent de lymphe au moment de l'érection. Celle-ci transsude dans le cloaque à travers les replis lymphatiques, sous forme d'un "fluide transparent" pouvant se mélanger au sperme. Les replis du cloaque se gonflent lors de l'érection ; ils font alors légèrement saillie hors du cloaque et constituent une courte gouttière d'où s'écoule le sperme.

## **1.2. Spermatogenèse**

La spermatogenèse est l'ensemble des transformations subies après la différenciation des cellules germinales primordiales en spermatogonies. Ces transformations se font en étroite relation avec les cellules somatiques de l'épithélium séminifère, les cellules de Sertoli, tissu intertubulaire, et les cellules de Leydig, et sont sous le contrôle des hormones gonadotropes hypophysaires. La spermatogenèse a lieu dans l'épithélium séminifère. Elle a fait l'objet de nombreuses études anciennes- chez les oiseaux (de Reviers, 1971). La spermatogenèse se déroule en trois phases consécutives, les divisions spermatogoniales (mitoses): la méiose pendant laquelle les cellules passent d'un stock de "2n" chromosomes à un stock final de "n" chromosomes et, enfin, la spermiogenèse qui comprend l'ensemble des processus de transformations des spermatides en spermatozoïdes (Figure. 3). La mise en place de ces

processus débute très tôt, c'est-à-dire au cours de l'ontogenèse du tractus génital. Chez les oiseaux, au stade embryonnaire, puis au stade jeune immature, les cellules germinales primordiales se multiplient pour donner naissance aux premières spermatogonies qui sont organisées en une unique couronne cellulaire au sein des tubes séminifères. Après une période de latence pendant le jeune âge, la spermatogenèse termine sa mise en place "qualitative", c'est à dire la production des premiers spermatozoïdes.

Durée de la spermatogenèse : Chez le coq (de Reviers, 1968): la durée de la prophase méiotique (stade spermatocyte I) est de 5,5 jours alors qu'elle est respectivement de 5,2 pour le canard de barbarie (Marchand et al, 1977) et de 3,9 jours chez la caille (Lin et al, 1990). Le passage du spermatocyte II marqué et la première spermatide ronde ne dure que 0,5 jour alors que la spermiogénèse dure 7,5 jours : les stades spermatides rondes (les 3 étapes confondues) durant 2,5 jours ; les deux stades d'élongation durent 0,5 jours et le stade spermatide allongé 4,5 jours. Chez le canard de barbarie et la caille, la spermiogénèse est encore plus rapide que chez le coq (respectivement 5 et 4,5 jours). En comptant la durée de leur transit dans les voies déférentes, les premiers spermatozoïdes marqués apparaissent dans les éjaculats 14 et 12 jours après le marquage chez le coq (Reviers, 1968) et le canard de barbarie (Marchand et al, 1977) et entre 9,5 et 11 jours chez la caille (Lin et al, 1990 et Amir et al, 1973).

### **1.3. Sperme**

#### **1.3.1. Spermatozoïdes**

Les spermatozoïdes d'oiseaux sont filiformes, ils contiennent peu de cytoplasme et possèdent une forte proportion de membranes cellulaires et subcellulaires. Leur protéome contient environ 822 protéines (Labas et al, 2015). Ils sont composés de trois parties : la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle (Figure 4).

##### **1.3.1.1. Tête**

La tête est clairement divisée en deux parties : l'acrosome et le noyau.

**Acrosome** : il est petit et conique et mesure environ 2,5  $\mu\text{m}$  de long et 0,5 de large chez le coq. Il contient la vésicule acrosomique, qui constitue un réservoir de calcium, et des enzymes protéolytiques responsables de l'hydrolyse de la membrane périvitelline interne (MPVI) de l'ovocyte au moment de la fécondation (Brown et Hartree 1976, Palmer et Howarth 1973, McIndoe et Lake, 1974, Kido et al, 1975). Sous la vésicule acrosomique, le perforatorium (à base d'actine) n'a pas de rôle connu chez les oiseaux. Chez les oiseaux, au moment de la fécondation, les spermatozoïdes doivent effectuer la réaction acrosomique pour

traverser la membrane périvitelline interne de l'oeuf avant d'aller pénétrer l'ovocyte. Le bon déroulement de cette réaction est un facteur clé de la réussite de la fécondation. Cette réaction correspond à une fusion entre les membranes plasmique et acrosomique externe conduisant à la vésiculation puis à la disparition de ces membranes (Okamura et Nishiyama, 1978). Elle conduit à la libération du contenu de l'acrosome, c'est-à-dire des enzymes permettant le passage à travers la MPVI. Les principales voies de signalisations impliquées ont également été identifiées par Lemoine et al, 2009. Ainsi, les voies impliquant des protéines kinases, comme la PKA, la PI3K et la MAPK1, sont activées lors du déclenchement de la réaction à l'inverse de la MAPK14. Ces protéines kinases interviennent de façon séquentielle : la PI3K serait activée en premier pour préparer la réaction, la PKA et la MAPK1 étant mise en jeu un peu plus tard au cours du déclenchement.

**Noyau** : le noyau, également filiforme, mesure 0,5x6 µm chez le coq (Lake et al, 1968): est très condensé pour une protection optimale du génome avant son intégration à l'ovocyte. Chez certaines espèces (passériformes): une gaine hélicoïdale entoure la tête donnant un aspect "vrillé" au spermatozoïde.

### **1.3.1.2. Pièce intermédiaire**

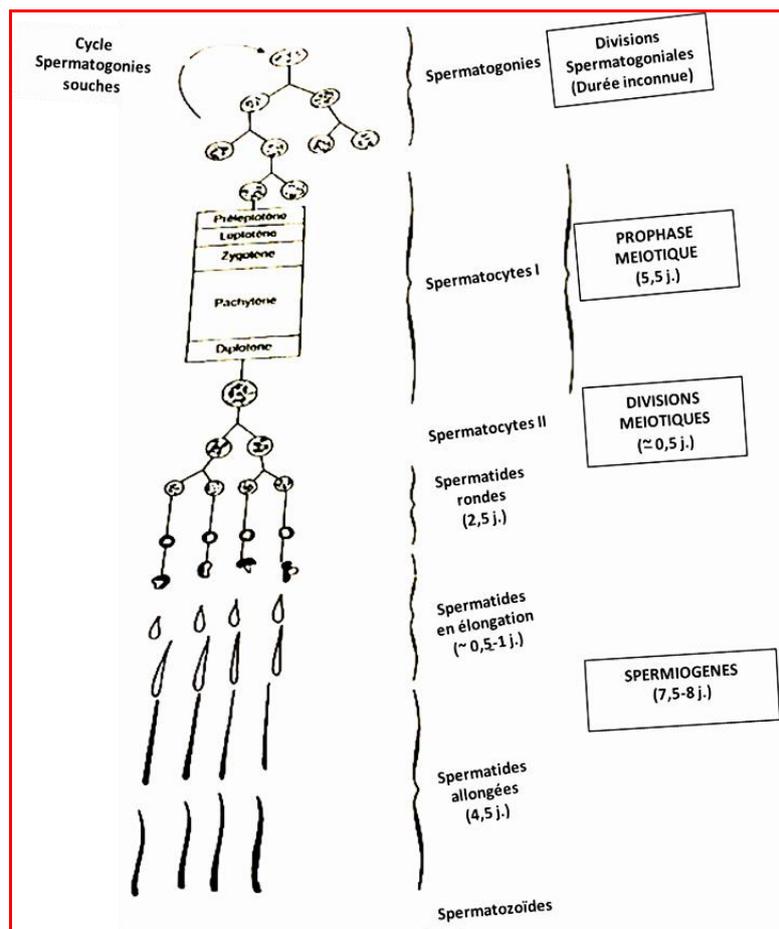
La pièce intermédiaire mesure 5 à 6 µm. Elle se distingue de celle présente chez les mammifères en n'étant entourée ni de colonnes striées ni de fibres denses (Korn et al, 2000). Elle commence à la base du noyau et se termine au niveau de l'annulus, à la frontière du flagelle. Elle comprend les deux centrioles et sa liaison à la tête par le centriole proximal est particulièrement fragile chez les oiseaux. Elle abrite également les mitochondries qui produisent de l'ATP et contribuent à la mobilité du flagelle, indispensable pour accéder aux glandes utéro-vaginales, puis au site de la fécondation, et effectuer la réaction acrosomique des spermatozoïdes. Leur nombre varie grandement selon les espèces : 30 chez le coq et le dindon (Korn et al, 2000): plus de 1000 chez la caille (Korn et al, 2000).

### **1.3.1.3. Flagelle et mobilité des spermatozoïdes**

Le flagelle mesure entre 70 et 90 µm chez le coq et le dindon (Korn, 2000). Il commence dans le plongement du centriole distal de la pièce intermédiaire auquel sont rattachés les deux filaments centraux du complexe axonémal, constitué d'un doublet central et neuf doublets de microtubules périphériques à base de dimères de dynéine (donc une structure proche de celle des spermatozoïdes de mammifères). C'est sans doute la partie du spermatozoïde dont les besoins en énergie sont les plus importants puisqu'elle est responsable

de sa mobilité lors de la remontée des spermatozoïdes jusqu'au site de fécondation et puis lors de la réaction acrosomique (Fawcett, 1970). Chez la plupart des oiseaux (sauf les passériformes): l'axonème est entouré d'une gaine fibreuse sur une grande partie du flagelle.

Les mouvements des flagelles sont en fait liés à des ondulations de l'axonème qui sont dues à des glissements des doublets de microtubules les uns par rapport aux autres. Ces glissements sont induits par des mouvements d'avant en arrière des bras de dynéine. La dynéine est une énorme protéine formée de plusieurs têtes (bras de la dynéine). Elle fait partie des protéines motrices (classe de moteurs moléculaires). Un peu comme les filaments de myosine des muscles, les bras de dynéine sont formés d'une queue de laquelle émergent deux ou trois têtes globulaires dont l'angulation par rapport à la base commune peut varier. L'énergie du mouvement est fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Les bras de dynéine présentent une activité ATPasique marquée (Satir et al, 1981).

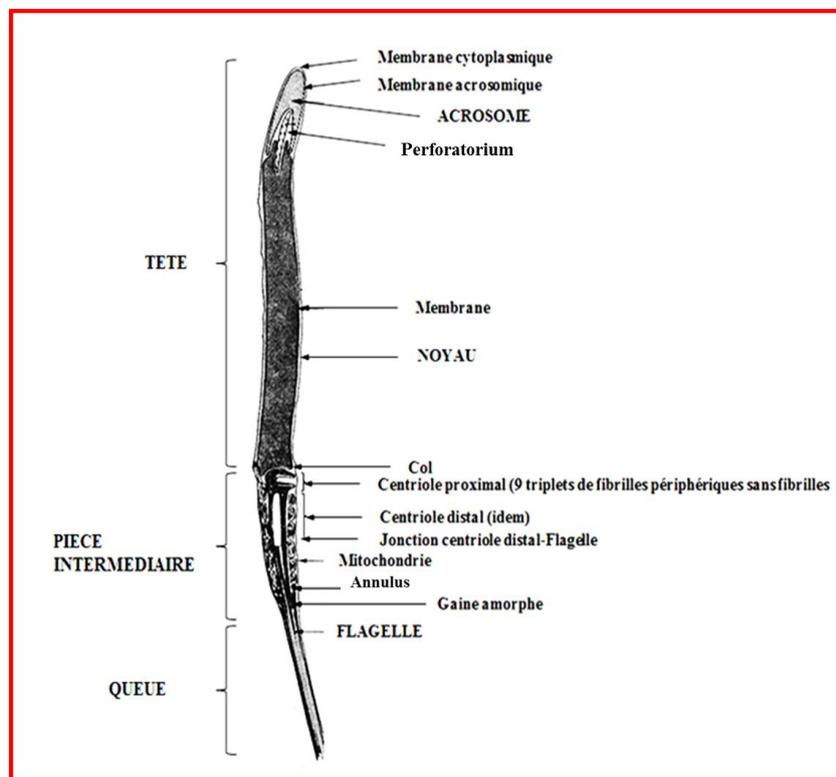


**Figure 3 :** Diagramme de la spermatogénèse. Le nombre et la durée des divisions spermatogoniales ne sont pas connus chez le coq (d'après de Reviers, 1988)

### 1.3.2. Plasma séminal

Les spermatozoïdes éjaculés baignent dans un liquide appelé plasma séminal, issu des sécrétions des cellules du tractus génital male et des spermatozoïdes eux-mêmes. Sa composition est riche en sels (140 mmol de  $\text{Na}^+$ , 20-50 mmol de  $\text{Cl}^-$ ) et en glutamate (80mmol): mais dix fois moins concentrée en protéines que le sang, avec comme protéine majeure la sérum-albumine (Blesbois et Caffin, 1992). Il contient aussi de nombreuses vésicules lipidiques et lipoprotéines (HDL, VHDL) mais est en revanche très pauvre en glucose. Le protéome du plasma séminal a été identifié récemment caractérisé par notre équipe avec plus de 607 protéines (Labas et al, 2015).

Le pH du plasma séminal est neutre ou légèrement basique. Il varie de 7,2 chez le coq (Nishiyama, 1955) à 8,2 chez la perruche (Samour et al, 1986). La pression osmotique n'est connue que pour quelques espèces et est d'environ 320 mOsm/kg (Etches, 1996). Il stimule la mobilité des spermatozoïdes pendant leur parcours dans les voies génitales mâles. Il donne cependant des résultats contrastés lorsqu'il est utilisé pour la conservation *in vitro* des spermatozoïdes, chez les mammifères (Maxwell et Johnson, 1999) comme chez les oiseaux (Ashizawa et Wishart, 1987 ; Blesbois et de Reviers, 1992 ; Mohan et al, 1995).



**Figure 4 :** Ultrastructure du spermatozoïde de coq (d'après de Reviers, 1988)

#### **1.4. Transport, maturation et stockage des spermatozoïdes dans l'appareil reproducteur mâle**

Les spermatozoïdes produits sont collectés par le *rete testis*, transitent dans les voies déférentes, où s'achève l'acquisition de leurs compétences de mobilité et de fécondation. La durée de ce transit chez les oiseaux est brève, comparée à celle des mammifères : 24 heures chez le coq (de Reviere, 1988) contre 13 ou 14 jours chez le bélier ou le taureau (Courrot, 1981). Les mécanismes et la plupart des changements biochimiques ou métaboliques occasionnés par cette maturation demeurent très peu connus chez les oiseaux. Chez le coq, les transformations morphologiques des spermatozoïdes liées à leur maturation se limitent à un épaississement des parois mitochondriales (Etches, 1996). D'ailleurs, à la sortie du testicule, les spermatozoïdes possèdent déjà l'essentiel de leur capacité de motilité (Ashizawa et Sano 1990) et un pouvoir fécondant non négligeable (Howarth, 1983). Ces capacités se renforcent quand même le long de l'épididyme.

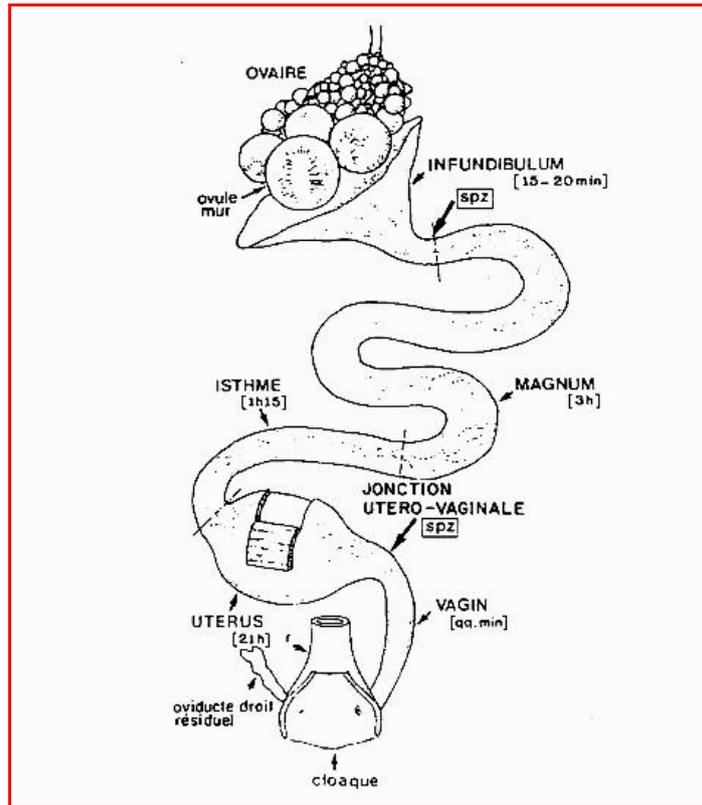
En attendant l'éjaculation, les spermatozoïdes de coq sont principalement stockés dans la partie distale de l'ampoule du canal déférent. La quantité de spermatozoïdes stockés varie en fonction de la production testiculaire mais aussi de la fréquence des collectes de semence ou des accouplements. Elle peut représenter jusqu'à 3-4 jours de production testiculaire s'il n'y a pas de récolte du sperme. Les spermatozoïdes peuvent survivre jusqu'à 2 semaines dans les voies déférentes (de Reviere, 1988). Cependant, un stockage prolongé dans le tractus génital mâle altère leur pouvoir fécondant ainsi que leur aptitude à conserver une mobilité élevée (Petitjean, 1970).

#### **1.5. Devenir des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles**

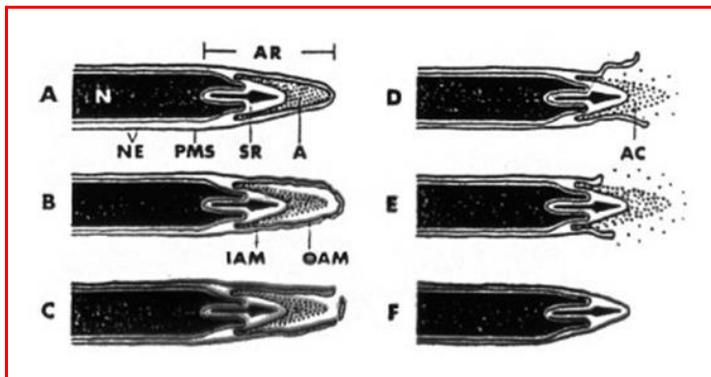
Après l'accouplement ou l'IA, les spermatozoïdes sont déposés dans le vagin. Dès lors, ils subissent un processus drastique de sélection vaginale. Seul 1 % des spermatozoïdes déposés dans le vagin accèdent aux GUV (Brillard, 1993): et 1 % de ces derniers sont ensuite retrouvés sur le site de fécondation : 99,9 % des spermatozoïdes sont donc éliminés dans le tractus femelle, qui agit comme une succession de filtres. La sélection pour l'accès aux GUV est fonction des capacités de mobilité des gamètes et de mécanismes variés pouvant faire intervenir des immunoglobulines, des cytokines et une activité vaginale (Blesbois et Brillard, 2007 ; Blesbois, 2011).

Les spermatozoïdes d'oiseaux sont capables de féconder un ovule jusqu'à plusieurs semaines après leur arrivée dans le tractus génital femelle (3 semaines chez le coq, Brillard et

Mc Daniel, 1986, et jusqu'à 15 semaines chez la dinde, Sauveur, 1979). Ce sont des glandes tubulaires spécialisées généralement situées à la jonction utéro-vaginale ou à la base de l'infundibulum, les nids spermatiques, qui permettent de conserver les spermatozoïdes aussi longtemps chez les oiseaux (Figure 5). Leur nombre varie beaucoup selon les espèces (150 à 20 000) selon la durée possible de stockage des spermatozoïdes (de 5 jours chez certains passériformes à 3 mois chez la dinde). Chez la poule, la durée de la période fertile après un accouplement est d'environ 3 semaines avec un maximum de fertilité (proche de 100 %) pendant plus d'une semaine. Pour atteindre ces périodes fertiles, les femelles stockent les spermatozoïdes dans les GUV (2 à 3 milliers chez la poule). Ce sont des invaginations de la muqueuse utérine à l'intérieur desquelles les spermatozoïdes sont rangés dans le sens des glandes, le flagelle vers l'oviducte et la tête vers les glandes (Tingari et Lake, 1973). Les glandes infundibulaires sont plus petites et moins nombreuses (quelques centaines) et sont dans la partie basale de l'infundibulum, en bordure du magnum. Pour aider les spermatozoïdes à entrer dans les GUV, des cils produisant des mouvements pulsatiles sont disposés sur les cellules situées sur la partie supérieure de la glande. Après stockage dans les GUV, les spermatozoïdes remontent les parties hautes de l'oviducte en croisant la descente de l'ovocyte fécondé la veille. Ils rencontrent en particulier dans l'utérus un environnement extrêmement riche en calcium (jusqu'à 15 mM) sans enclencher de RA (Figure 6). La RA se produit dans l'infundibulum au contact de la MPVI mais peut être engagée sans délai *in vitro* chez des spermatozoïdes éjaculés en présence de calcium, de MPVI ou d'ionophore calcique (Lemoine et al, 2008).



**Figure 5 :** Anatomie du tractus génital et urinaire chez la femelle en période de reproduction (d'après Taylor, 1970)



AR : acrosome.  
 IAM : membrane acrosomique interne.  
 OAM : membrane acrosomique externe.  
 N : noyau.  
 NE : enveloppe nucléaire.  
 PMS : membrane plasmique du spermatozoïde.  
 SR : baguette sub-acrosomique.

A : Région antérieure de la tête de spermatozoïde intacte.  
 B : Étape initiale de la réaction acrosomique.  
 C : Ouverture de l'acrosome dans sa région apicale par fusion avec la membrane plasmique et de la membrane acrosomique externe.  
 D, E : Derniers stades de la réaction acrosomiques (AC), les membranes ont fusionné et disparaissent.  
 F : Tête d'un spermatozoïde après la réaction acrosomique : la membrane acrosomique interne a fusionné avec la membrane plasmique pour former une membrane continue.

**Figure 6.** Déroulement de la réaction acrosomique chez le coq (d'après Okamura et Nishiyama, 1978)

## 2. CRYOCONSERVATION DES SPERMATOZOÏDES DE COQ

L'impact négatif de la cryopréservation de la semence sur sa qualité est connu depuis longtemps et est constaté chez toutes les espèces. Une grande part des dégâts qui se produisent principalement au niveau des membranes de la cellule est la conséquence directe des importantes variations de température et de pression osmotique que les spermatozoïdes doivent traverser (Hammerstedt et al, 1990 ; Watson, 2000): qui se traduisent notamment par la formation de cristaux de glace à l'intérieur et autour de la cellule. Cela est particulièrement nuisible au bon fonctionnement de la cellule en causant de graves dommages à la membrane plasmique, à l'acrosome ou aux mitochondries (Holt, 2000).

La cryopréservation est un moyen de préserver le matériel génétique qui a des applications dans l'agriculture, l'aquaculture et la conservation des espèces et races menacées (Holt WV, 1997). Des tentatives visant à préserver le sperme à basse température sont menées depuis 1776, alors que Spallanzani procédait à des expériences avec du sperme de grenouille, d'étalon et d'humain dans la neige (Bwanga, 1991). Shaffner et al, 1941 ont été les premiers à obtenir des poussins à partir de semence congelée de coq. Depuis, les semences de nombreuses espèces avicoles ont reçu différents traitements pour être congelées, mais les taux de fertilité ne sont pas toujours acceptables, et certaines semences ne peuvent pas être mises en cryobanque (Sant Jalme et al, 2003 ; Sontakke et al, 2004 ; Tselutin et al, 1995 ; Blesbois et al, 2007).

Chez les oiseaux, la cryopréservation du sperme a un grand potentiel d'application dans différents domaines, notamment l'optimisation de la pratique de l'insémination artificielle et la sélection, la reproduction à différents niveaux dans l'industrie de la volaille, la prévention des maladies, ou la conservation *ex situ in vitro* des ressources génétiques par l'établissement de banques de semence cryopréservée. Ces applications dans ce dernier domaine sont d'un intérêt particulier car la cryopréservation du sperme est la méthode la plus facilement réalisable pour la gestion *ex situ* des ressources génétiques aviaires puisqu'il n'est pas possible de cryopréserver des embryons ou des ovocytes, principalement en raison de leur grande taille, et de leur haute teneur en lipides (Blesbois et al, 2007). Les spermatozoïdes aviaires sont généralement reconnus comme étant plus sensibles à la cryopréservation que ceux des mammifères, et leurs taux de fécondité après avoir été cryopreservés sont considérablement inférieurs à ceux de n'importe quelle espèce de mammifère domestique (Long, 2006). Les difficultés rencontrées pour la congélation du sperme aviaire pourraient être liées à la morphologie particulière des spermatozoïdes d'oiseaux (Long, 2006 ; Donoghue

et Wishart, 2000). En outre, la biologie de la reproduction des oiseaux influe sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes cryopreservés. En effet, un séjour prolongé du sperme dans le tractus génital femelle est nécessaire pour maintenir de bons niveaux de fécondité pendant plusieurs jours (Blesbois, 2007). Bien que la cryopréservation du sperme des oiseaux domestiques ait été largement étudiée au cours des cinquante dernières années (Donoghue et al, 2000 ; Lake, 1986, Bellagamba, 1993): des méthodes efficaces pour congeler cette semence n'ont émergé que dans la dernière décennie du XXème siècle. Les méthodes utilisant des cryoprotecteurs tels que le glycerol, le N-diméthylacétamide (DMA): ou le DMSO, des procédures de congélation/décongélation lente ou rapide ainsi que différentes techniques de conservation en pastilles, flacons ou pailles ont été étudiées (Blesbois, 2007 ; Blesbois, 2011). Les taux de fécondité les plus élevés ont été obtenus avec du sperme congelé en pellet (gouttes de sperme) avec du DMA et directement plongé dans l'azote liquide (Tselutin et al, 1999): ou avec du sperme congelé dans des paillettes avec du glycérol (Seigneurin et Blesbois, 1995 ; Long, 2004).

### **2.1. Dommages aux spermatozoïdes associés au refroidissement, à la décongélation et aux chocs thermiques du processus de cryopreservation**

Bien que la cryopréservation de cellules germinales soit un outil précieux pour l'industrie de la volaille, la congélation de la semence n'est pas encore une procédure fréquemment utilisée (Bellagamba, 1993 ; Fulton, 2006 ; Long, 2006 ; Blesbois et al, 2007). Les principales utilisations de la cryopréservation du sperme chez les oiseaux sont liées à la gestion de la diversité génétique (Blesbois, 2007). Toutefois, les principaux programmes nationaux pour la préservation des ressources aviaires, réalisés aux États-Unis, aux Pays-Bas et en France, ont choisi différents protocoles de congélation/décongélation. Des études portant sur différentes espèces aviaires (jars et canards) ont souvent montré une grande variabilité dans les résultats en termes de taux de fécondité, mais ont néanmoins réussi à dégager des lignes directrices permettant d'obtenir des niveaux de fertilité acceptables (Blesbois, 2007). Cependant, la qualité du sperme congelé/décongelé, ainsi que les taux de fécondité obtenus après insémination artificielle à l'aide dudit sperme cryopreservé sont relativement faibles. Cela est en partie dû à certaines caractéristiques biologiques et physiologiques uniques des spermatozoïdes d'oiseaux qui les rendent potentiellement plus sensibles aux dommages causés par le gel (Donoghue et Wishart, 2000 ; Blesbois, 2007 ; Blanco et al, 2008). La cryopréservation est un processus dangereux qui induit de nombreux changements défavorables dans les spermatozoïdes. La congélation et la décongélation causent des dégâts

structurels dans les membranes plasmiques, les mitochondries et la région acrosomique (Harris et al, 1973 ; Xia et al ; 1988) et modifient la perméabilité de la membrane cellulaire, la mobilité et les capacités d'induire la réaction acrosomique (Blesbois et al, 2005 ; Mocé et al, 2010 ; Lemoine et al, 2011).

Pendant la phase de initiale refroidissement à 5°C, la base phospholipidique de la membrane plasmique (> 70%) est affectée par le choc thermique (Holt, 2000a ; Komarek et al, 1965 ; Watson, 2000). Les membranes de spermatozoïdes aviaires sont riches en acides gras polyinsaturés et peuvent de plus facilement subir une peroxydation lipidique (LPO) en présence de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) lors du processus de congélation (Alvarez et Storey, 1982 ; Cerolini et al, 2006 ; Fujihara et Howarth, 1978 ; Surai et al, 1998). Bien que la réduction de la viabilité ne soit pas entièrement due aux lésions de la membrane plasmique durant la congélation, nous savons que les espèces à faible viabilité post-décongélation ont un ratio plus élevé d'acides gras insaturés/saturés, et des niveaux de cholestérol dans la membrane moins élevés (Holt, 2000b ; Waterhouse et al, 2006). La proportion d'acides gras insaturés détermine en partie à quelle température se produisent les transitions de phase. C'est pourquoi les acides gras, saturés et insaturés, sont des facteurs importants dans la capacité qu'ont les spermatozoïdes à faire face aux dommages liés aux transitions de phase (Drobnis et al, 1993 ; White, 1993). Les dommages de la membrane provoqués pendant le refroidissement ont un effet désastreux sur la capacité des cellules à réguler les mouvements du fluide à travers la membrane, et vont grandement affecter le niveau de déshydratation au cours de la phase de congélation (Hernandez et al, 2007a). Il convient de noter que de nombreux aspects du choc thermique causé par le froid et liés à une lésion de la membrane peuvent être contrôlés dans une certaine mesure, mais pas éliminés, en utilisant des agents cryoprotecteurs et des taux de congélation/décongélation appropriés (Hammerstedt et al, 1990). Les dégâts souvent irréversibles causés par les chocs thermiques et osmotiques résultent directement de la composition de la membrane plasmique. Il est donc essentiel que les spermatozoïdes soient stabilisés en contrôlant parfaitement la température et en utilisant un milieu approprié avant la congélation.

## **2. 2. Les éléments senseurs de la cryopréservation**

### **2.2.1. Les dilueurs**

Les dilueurs doivent avoir une composition compatible avec le plasma séminal afin de remplir leur rôle de maintien en vie des spermatozoïdes. Les paramètres physicochimiques du

sperme de coq doivent toujours être respectés dans la composition des dilueurs : le pH et la pression osmotique (de Reviers M, 1988).

**Le pH** : Les spermatozoïdes ont besoin d'un pH proche de 7 mais un dilueur avec un pH allant de 7 à 8.5 ne semble pas affecter la qualité de la semence d'après Labbé et al, 2003, alors que Lake et Ravie, 1979 indiquent que des pH de 6.8 ou 7.1 donnent de bons résultats de maintien de la viabilité alors qu'un pH de 5.8 fait diminuer la survie des spermatozoïdes dans le dilueur. Enfin, un pH de 7.4 ne semble pas affecter les spermatozoïdes. Si le pH est trop bas, la mobilité des spermatozoïdes est réduite, comme la production d'acides lactique et la consommation d'oxygène (Bogdonoff et Schaffner, 1954). Le tampon doit limiter efficacement les variations de pH.

**L'osmolarité** : c'est le second élément très important à contrôler dans la préparation du dilueur. Ainsi, en conditions hypo-osmotiques l'eau rentre dans les spermatozoïdes qui gonflent, entraînant des ruptures de membrane notamment au niveau de la pièce intermédiaire (Bakst, 1980). L'intégrité des spermatozoïdes étant altérée, ils perdent leur pouvoir fécondant (Clarke et al, 1984). D'après Clarke et al, 1984, la perméabilité de la membrane plasmique se détériore avec l'âge des animaux, rendant les spermatozoïdes plus sensibles aux variations osmotiques. Le composant le plus souvent utilisé conférant l'osmolarité au dilueur est le glutamate de sodium.

**Les substrats énergétiques** : le glucose, le fructose, mais aussi des acides gras, utilisés comme substrats, permettent le maintien du métabolisme énergétique et par conséquent de la viabilité des spermatozoïdes.

### **2.2.2. La dilution**

Le sperme des oiseaux étant visqueux et très concentré donc visqueux, il est important de le diluer avant la congélation, cela permet également d'ajouter l'agent cryoprotecteur en limitant son effet hyperosmotique. Le sperme de dindon a une concentration de 8 à 12 x10<sup>9</sup> spz/ml, alors que celui de pintade est à environ 6 à 8 x10<sup>9</sup> spz/ml. Quant au coq, la concentration d'un éjaculat varie entre 4-5x10<sup>9</sup> spz/ml. Cependant, le volume récolté par dindon est de l'ordre de 200µl à 1ml par éjaculat, 50-250µl seulement pour la pintade et environ 300µl à 1.5ml pour le coq.

Pour la congélation, le taux de dilution doit être adapté à chaque espèce. Ainsi, le taux de dilution chez le coq est d'1/3 alors que chez le dindon, qui a une semence plus concentrée, le taux de dilution le plus approprié semble être de 1/5.

### 2.2.3. Les cryoprotecteurs

Comme leur nom l'indique, les cryoprotecteurs ont un rôle de protection des cellules pendant la congélation-décongélation. Le cryoprotecteur est le premier élément à déterminer pour cryoconserver des semences : après des essais *in vitro*, il faut choisir celui qui permet d'obtenir le meilleur taux de fertilité. Deux types de cryoprotecteurs existent en fonction de leur action de protection qui est soit interne, soit externe à la cellule.

#### **Les cryoprotecteurs internes :**

Les cryoprotecteurs internes sont, entre autres, le glycérol, l'éthylène glycol, le diméthylacétamide (DMA): le diméthyl sulfoxyde (DMSO): le diméthyl formamide (DMF): le méthanol. Ces molécules ont la capacité de pénétrer dans le cytoplasme cellulaire et de favoriser la déshydratation de la cellule en remplaçant l'eau intracellulaire, et donc de limiter la formation de cristaux intracellulaires durant la congélation. Après avoir choisi un cryoprotecteur, il est important d'adapter la vitesse de congélation car un mauvais couple cryoprotecteur-vitesse de congélation induit des effets toxiques sur la semence (Holt WV, 2000a).

Le premier cryoprotecteur ayant donné des taux de fertilité satisfaisants sur la semence des volailles est le glycérol (Smith AU et Polge C, 1950). Ce cryoprotecteur a donc été le plus utilisé et ses effets sur les spermatozoïdes et les voies génitales des poules ont été étudiés. Le recensement de ces effets a été réalisé par Hammerstedt et Graham, 1992. Ce cryoprotecteur modifie la viscosité du cytoplasme et l'activité des cellules.

Le glycérol est probablement le cryoprotecteur le plus efficace et le moins toxique pour les spermatozoïdes de coq (Chalah et al, 1999 ; Tselutin et al, 1999): mais son introduction dans le vagin conduit à l'absence totale de fécondation s'il est présent à des concentrations > 2 % de la dose de semence (Lake, 1986). Pour contrer cet effet "contraceptif", il est donc nécessaire de procéder à sa lente élimination avant l'insémination. Parmi les hypothèses pour expliquer l'effet contraceptif du glycérol (Hammerstedt et Graham, 1992): il a été suggéré que les dommages sont créés par un déséquilibre osmotique brusque dans les membranes plasmiques provoqué par l'ajout d'un milieu exempt de glycérol à du sperme qui en est déjà imprégné quelques secondes avant l'insémination. D'autres hypothèses comprennent notamment la dégradation rapide du cytosquelette des spermatozoïdes qui suit la procédure de décongélation. Des effets directs du glycérol sur l'équilibre bio-énergétique, une augmentation de la perméabilité de la membrane aux composants toxiques et des

changements directs dans la bi-couche lipidique de la membrane ont également été suggérés. Fait intéressant, l'insémination chez les oiseaux est généralement intravaginale pour éviter un dysfonctionnement du cycle de ponte. Cette pratique est différente de celle qu'on trouve dans la plupart des espèces de mammifères, pour lesquelles l'insémination intra-utérine est la règle. Chez les espèces aviaires, l'effet contraceptif du glycérol est à son niveau le plus élevé lorsque la semence est déposée dans le vagin ou à la jonction utéro-vaginale, mais il disparaît dans le cas d'une insémination effectuée dans l'oviducte supérieure. Cela suggère fortement que, selon l'emplacement de son dépôt, le glycérol stimule une barrière de nature inconnue qui porte atteinte à la migration des spermatozoïdes vers les sites de stockage. Malgré cela, l'utilisation du glycérol comme cryoprotecteur, combinée à sa lente élimination contrôlée quelques minutes avant l'insémination a démontré son efficacité, y compris pour la cryoconservation de spermatozoïdes de coq provenant de lignées peu fertiles (Blesbois et al, 2007) et permet d'obtenir des taux de fertilité de 75% et même supérieurs à 90% lorsqu'une bonne vitesse de congélation est choisie (Seigneurin et Blesbois, 1995 ; Tselutin et al, 1999). D'autres techniques de congélation ont été mises en place en utilisant des cryoprotecteurs sans action contraceptive pour ne pas avoir à les retirer par centrifugation avant les inséminations.

Ces cryoprotecteurs sont entre autres le DMA, le DMF, le DMSO ou l'éthylène glycol (Bellagamba et al, 1993 ; Blesbois et Brillard, 2007). Pour chaque cryoprotecteur, mais surtout chaque espèce, il faut adapter la concentration du cryoprotecteur, le temps et la température d'équilibration, les vitesses de congélation et de décongélation. Néanmoins, le DMSO et l'éthylène glycol semblent être les plus toxiques et donc les moins bons cryoprotecteurs. Il en résulte que le glycérol est le cryoprotecteur le moins toxique et le plus efficace mais son action contraceptive lors des inséminations est contraignante (Donoghue et Wishart, 2000).

Un autre point important à maîtriser est la concentration du cryoprotecteur car si elle est trop faible, les spermatozoïdes ne sont pas assez protégés durant la congélation-décongélation, alors que si elle est trop élevée, il devient toxique. Il est donc important de tester la concentration d'un cryoprotecteur sur les spermatozoïdes pour mettre au point une technique de congélation.

### **Les cryoprotecteurs externes :**

Les cryoprotecteurs externes permettent de compléter l'action des cryoprotecteurs à action interne en protégeant par l'extérieur les membranes plasmiques. Ces composés à action externe sont :

- Des sucres complexes tels que le raffinose, l'inositol, le lactose ou le tréhalose.
- Des polymères comme le Polyvinyl pyrrolidone (PVP).
- Le jaune d'œuf ou les fractions lipoprotéiques qui en sont issues.

#### **2.2.4. Le conditionnement en paillettes pour la conservation de sperme en cryobanque**

Le sperme peut être conditionné en pellet, dans des fioles ou dans des paillettes mais pour la mise en cryobanque, les paillettes sont requises. Le remplissage s'effectue par aspiration jusqu'à l'arrivée du sperme sur le filtre. Puis, on réalise une bulle d'air pour pouvoir ensuite souder les paillettes. Enfin, le stockage des paillettes congelées s'effectue dans des bombonnes d'azote de "transfert" avant de placer la totalité des paillettes de la race dans les deux sites de la cryobanque. Le contrôle des niveaux d'azote dans ces bombonnes doit être effectué deux fois par semaine à cause de l'évaporation de l'azote liquide.

#### **2.2.5. Récolte de la semence**

Ce point présente une importance capitale dans la zootechnie du coq reproducteur, car la récolte et l'évaluation du sperme sont à la base des techniques d'insémination artificielle, d'élevage et de sélection des reproducteurs mâles. Chez le coq, le moyen le plus efficace et le plus connu de récolter le sperme est le massage dorso-abdominal avec traite du cloaque décrit par Burrows et Quinn, 1935. Le préleveur qui aspire la semence doit veiller à ne récupérer que de la semence car il n'est pas rare que du sang ou du fluide transparent viennent se mélanger au sperme. Ce fluide transparent diminue la concentration en spermatozoïdes, mais ne semble pas impacter leur fertilité (Lake, 1985 ; Van Wambeke et Fujihara, 1994). D'après Bakst et Cecil, 1983, il serait préférable de ne presser que deux fois le cloaque de coq pour ne pas accroître le volume de fluide transparent au dépend du sperme. Enfin, les replis lymphatiques étant dans le cloaque, les fèces et l'urine peuvent venir contaminer la semence, c'est pourquoi le préleveur doit faire attention à ne pas en récupérer.

### **3. MÉTHODES D'ÉVALUATION DES SPERMATOZOÏDES**

La qualité des spermatozoïdes peut être caractérisée par l'état des différentes fonctions cellulaires devant être conservées intactes pour permettre la fécondation de l'ovocyte. Les

tests d'évaluation de la qualité des spermatozoïdes sont nombreux. Ils font appel soit à des mesures directes de fertilité, soit à des mesures indirectes par des tests *in vitro*.

La mesure de la fertilité correspond au pourcentage d'œufs fécondés par rapport au nombre d'œufs pondus après insémination artificielle. Cette mesure permet une évaluation directe du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. On peut également approcher la fertilité *in vivo/in vitro* de façon indirecte par comptage du nombre de spermatozoïdes piégés entre les deux membranes périvitellines dans l'œuf pondu ou en comptant le nombre de trous effectués par les spermatozoïdes dans les membranes périvitellines de ces œufs.

### **3.1. Membrane plasmique et intégrité morphologique des spermatozoïdes**

La membrane plasmique, composée d'une bicouche lipidique support de différentes protéines et carbohydrates, crée une enveloppe autour du spermatozoïde et intervient dans la régulation des fonctions spermatiques par la création d'un gradient ionique avec de très nombreux rôles dans les échanges entre milieux extra et intra cellulaires. De ce fait, l'évaluation de son intégrité semble être une composante importante de l'évaluation de la semence. Différentes procédures de laboratoire ont été développées pour tester cette intégrité. Les tests permettant d'évaluer la perméabilité de la membrane plasmique sont souvent assimilés à des tests donnant une estimation de la viabilité. De nombreux tests reposant sur la capacité de colorants non fluorescents ou de fluorochromes à pénétrer dans les cellules en fonction de leur perméabilité membranaire ont été mis au point chez les mammifères et les oiseaux (Tableau 1).

Ces colorants peuvent être répartis en deux catégories :

- Les colorants d'exclusion tels que l'éosine, et les fluorochromes, l'iodure de propidium (IP): ou le bromure d'éthidium, qui pénètrent dans la cellule lorsque la membrane est altérée. Ces colorants sont généralement associés à la mort cellulaire.

- Les colorants supra vitaux tels que les fluorochromes Hoechst 342 ou SYBR-14 qui pénètrent dans toutes les cellules. Ces colorants sont des fluorochromes, le plus souvent utilisés en association avec les colorants d'exclusion afin de distinguer au sein d'une population cellulaire, les cellules viables (avec une membrane plasmique intègre) des cellules non viables (avec une membrane plasmique altérée).

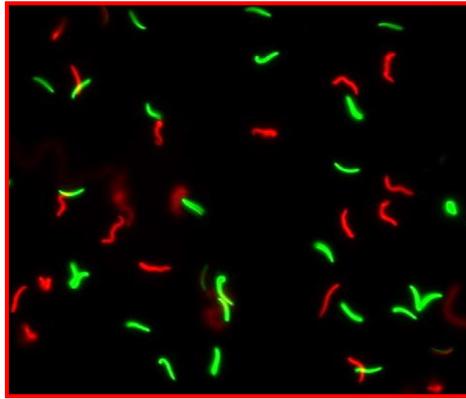
Dans mes travaux, j'ai utilisé IP et Sybr-14 pour identifier la viabilité des spermatozoïdes (Figure 7).

L'éosine, colorant non fluorescent qui colore en rose le cytoplasme des cellules devenues perméables, est également utilisée en association avec la nigrosine, colorant de fond, pour estimer la viabilité des spermatozoïdes de mammifères (Blom, 1950) et d'oiseaux (Bakst, 1980 ; Chalah et Brillard, 1998) (Figure 8). Cette coloration permet également d'observer et d'estimer l'état morphologique des spermatozoïdes et donc de révéler plusieurs types d'altérations telles que les doubles flagelles, les flagelles cassés, pliés ou enroulés, ou encore les pliures au niveau de la pièce intermédiaire (Bakst, 1980). Ainsi, Cooper et Rowell, 1958 ont mis en évidence une corrélation négative ( $r = -0,89$ ) entre le pourcentage des spermatozoïdes révélés morts et la fertilité chez le coq alors que Wishart et Palmer, 1986 ont mis en évidence dans la même espèce une corrélation positive ( $r = 0,67$ ) entre les spermatozoïdes révélés viables et normaux (non éosinophiles) et la fertilité.

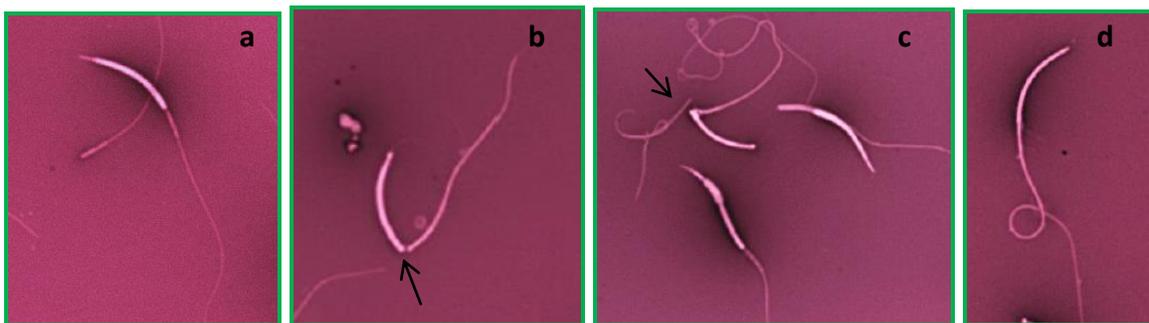
L'intégrité membranaire des spermatozoïdes peut également être évaluée par un test hypo-osmotique. Ce test consiste à imposer un stress hypo-osmotique aux cellules afin de mettre en évidence une fragilité des membranes accrue par la conservation in vitro. Ce test n'a cependant pas pu être appliqué avec succès aux oiseaux.

**Tableau 1** : Classification et caractéristiques des colorants utilisés pour l'analyse de l'intégrité membranaire (d'après Chalah T, 1999)

Colorants	Nature	Type	Principes de coloration	Excitation (nm)	Emission (nm)
<b>Éosine</b>	exclusion	Non fluorescent	Transport passif	-	-
<b>Bromure d'éthidium</b>	exclusion	fluorescent	Intercalant entre les bases d'ADN ou d'ARN	530	605
<b>Iodure de propidium</b>	exclusion	fluorescent	Intercalant entre les bases d'ADN ou d'ARN	530	617
<b>Hoechst 342</b>	supravital	fluorescent	Fixation sur les bases A-T de l'ADN	340	450
<b>Sybr 14</b>	supravital	fluorescent	Fixation sur l'ADN	488	515



**Figure 7 :** Marquage au SYBR14/IP des spermatozoïdes (X 400). Les spermatozoïdes colorés en verts sont viables (cellule SYBR14+). Les spermatozoïdes colorés en rouges sont morts (photos D.Nguyen, INRA)



**Figure 8 :** Coloration de spermatozoïdes avec l'éosine-nigrosine. (a) spermatozoïdes morts (éosinophile) ; (b) spermatozoïde cassé au niveau de la tête; (c) spermatozoïdes avec une pliure au niveau de la pièce intermédiaire; (d) spermatozoïde vivant normal (photos D.Nguyen, INRA)

### 3.2. Évaluation de la fonction mitochondriale

Le spermatozoïde actif contient une grande quantité d'ATP (Adénosine TriPhosphate) produite au cours du cycle ATC réalisé par les mitochondries au niveau de la pièce intermédiaire et par la glycolyse, principalement au niveau de la pièce principale (Miki et al, 2004 ; Mukai et Okuno, 2004).

Les marqueurs fluorescents sélectifs des mitochondries sont abondants. La rhodamine 123 et le 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine (JC-1) sont des

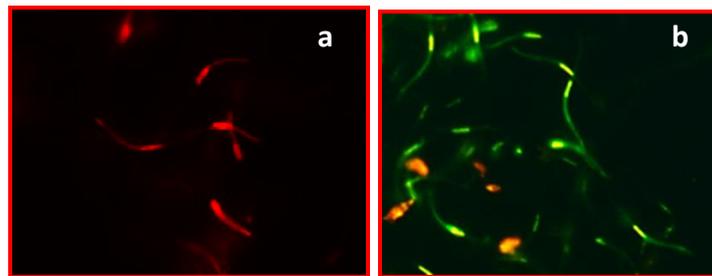
cations lipophiles qui permettent de détecter une hétérogénéité membranaire au sein des mitochondries (Smiley et al, 1991). Les MitoTracker comprennent un assortiment de marqueurs dont les caractéristiques spectrales et l'adaptabilité à la perméabilité et à la fixation diffèrent selon le stade de respiration de la mitochondrie. Ces molécules diffusent à travers la membrane plasmique et s'accumulent dans les mitochondries.

La rhodamine 123 émet une fluorescence verte (515 à 575 nm) qui s'accumule lorsque les mitochondries présentent un potentiel de membrane élevé (Garner, 1997). Après avoir été largement utilisée, elle est maintenant remplacée par d'autres marqueurs à cause de ses nombreux inconvénients : (1) le temps nécessaire pour obtenir un équilibre de distribution au sein de la membrane mitochondriale, (2) le degré de fixation non spécifique aux composants de la membrane, (3) les effets toxiques sur l'intégrité de la fonction mitochondriale, (4) la procédure d'échantillonnage, (5) l'instabilité à la lumière, et (6) la nécessité d'une grande quantité de matériel biologique (Cossarizza A et al, 1996). Elle permet de distinguer les cellules vivantes mais ne peut pas être utilisée pour différencier des mitochondries avec un fort ou un faible potentiel de membrane. En effet, elle ne présente qu'une seule population de cellules, marquées en vert (Gravance CG et al, 2001).

Le potentiel membranaire mitochondrial a été évalué à l'aide de la chlorométhyl-X-rosamine (MitoTracker Red). Les composés dénommés « MitoTracker » ont la capacité de s'accumuler dans la mitochondrie, où ils peuvent réagir avec un groupement « Thiol » sur les peptides et protéines. La réaction engendre un conjugué aldéhyde fluorescent. Plus le potentiel membranaire mitochondrial est fort, plus le marquage est important. Ce potentiel est important dans les cellules vivantes. Cependant, lors de l'apoptose, une chute de ce potentiel est observée. Le composé est excité à une longueur d'onde de 579 nm et émet à une longueur d'onde de 599 nm (Garner, 1997) (Figure 9a).

Le marqueur JC-1 permet d'évaluer le niveau d'énergie mitochondrial : la couleur des pics d'émission passe du vert (510-520 nm) au rouge-orange (590 nm) lorsque la polarisation de la membrane augmente (Figure 9b). Ce phénomène traduit la formation réversible d'agrégats rouge-orange lorsque le potentiel membranaire est élevé par rapport aux monomères verts lors d'un faible potentiel membranaire (Varner, 2008 ; Garner, 1997 ; Thomas, 1998 ; Gravance et al, 2001). Ainsi, il existe une corrélation significative entre le rapport fluorescence orange / fluorescence verte et la valeur du potentiel membranaire (Garner, 1997 ; Cossarizza, 1996). C'est le fluorochrome qui apporte le plus de rigueur dans l'estimation de la fonction mitochondriale (Gravance et al, 2001). Les spermatozoïdes

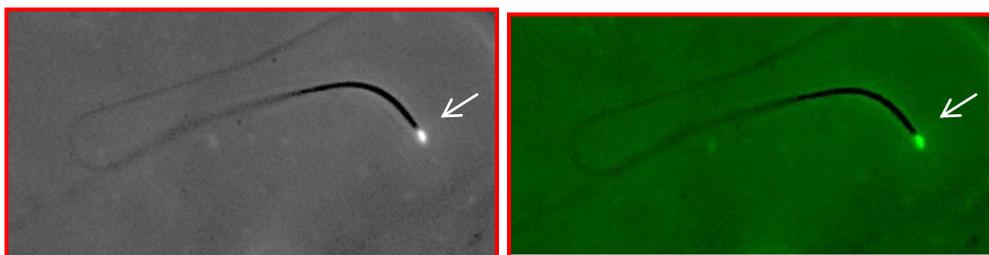
mobiles montrent une forte coloration orange au niveau de la pièce intermédiaire, ce qui indique un potentiel de membrane des mitochondries élevé. A l'opposé, les spermatozoïdes immobiles, ayant un faible potentiel membranaire, présentent une coloration verte (Gravance et al, 2001). Chez les oiseaux, l'analyse de la fonction mitochondriale des spermatozoïdes par fluorescence à la JC-1 semble être une méthode efficace et est la plus utilisée.



**Figure 9 :** (a) Coloration de spermatozoïdes avec MitoTracker red : mitochondries actives avec un potentiel de membrane élevé (fluorescence rouge) ; (b) Coloration de spermatozoïdes avec JC-1 : les mitochondries actives avec un potentiel de membrane élevé (fluorescence orange) sont distinctes de celles à faible activité (fluorescence verte) qui indiquent des spermatozoïdes morts (photos D.Nguyen, INRA)

### 3.3. Marqueurs testant la réaction acrosomique

Plusieurs méthodes basées sur l'utilisation de lectines couplées à un fluorochrome (ex : isothiocyanate de fluorescéine ou FITC) ont été développées pour faciliter l'évaluation de l'état, la présence ou l'absence de l'acrosome mammalien en microscopie à fluorescence (Centola et al, 1990) ou en cytométrie en flux (Uhler et al, 1993). Les lectines sont des glycoprotéines d'origine animale ou végétale, qui se caractérisent par leur affinité pour les structures saccharidiques (Koehler, 1981). Conjuguées à des marqueurs fluorescents, elles permettent la mise en évidence de sucres spécifiques. Deux sortes de marquages d'acrosome peuvent être effectués : un marquage direct sur des membranes intactes ou un marquage indirect qui, après perméabilisation des membranes, permet au colorant de se fixer au contenu de l'acrosome. Parmi les lectines, le marquage direct par la PNA (Peanut agglutinin) couplée au FITC a également été testé chez les oiseaux pour mettre en évidence le déclenchement de la réaction acrosomique (Horrocks et al, 2000) (Figure 10).



**Figure 10** : spermatozoïde marqué à la PNA-FITC. (a) : spermatozoïde observé en lumière blanche ; (b) : le même spermatozoïde ayant l'acrosome marqué à la PNA-FITC en vert (photos D.Nguyen, INRA)

### 3.4. Évaluation de la mobilité des spermatozoïdes

La mobilité des spermatozoïdes peut être définie par des caractéristiques concernant l'ensemble de la population (pourcentage de cellules mobiles, type de mouvement de l'ensemble) ou par des caractéristiques individuelles telles que la vitesse et la fréquence des battements du flagelle.

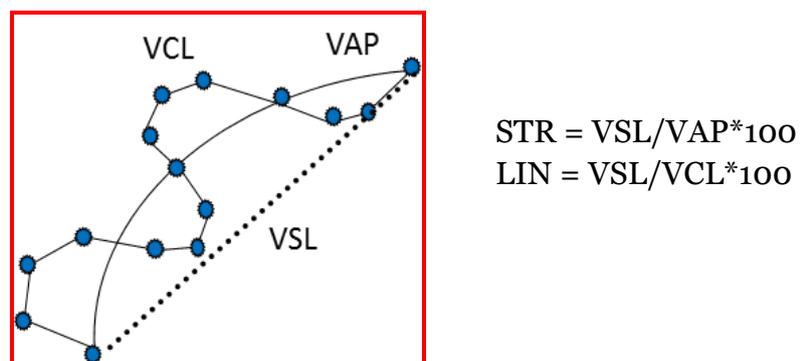
La mobilité massale a été largement utilisée chez les oiseaux. Elle est basée sur l'observation directe, par l'expérimentateur, des mouvements d'ensemble des spermatozoïdes et des types de mouvements individuels : oscillants, progressifs, tourbillonnants. Ces critères sont répertoriés dans une échelle allant de 0 à 9 et permettant l'attribution d'une note (Tableau 2) par microscopie (Petitjean, 1965).

Une semence ayant une mobilité de 4 à 9 sur l'échelle peut être conservée. Plusieurs types de mesures de la mobilité du sperme ont été développés chez les mammifères et adaptés aux oiseaux. Plusieurs systèmes automatisés de mesure faisant appel à une assistance par ordinateur (CASA : Computer Assisted Semen Analysis) ont été développés (Figure 11). Le système d'analyse automatisée CASA est actuellement en place dans plusieurs laboratoires de référence afin d'estimer objectivement les caractéristiques de mouvement des spermatozoïdes. Il permet de visualiser et de numériser des images successives, de traiter et d'analyser les données et de fournir ensuite des informations objectives, précises et significatives sur la cinématique de cellules individuelles permettant d'apporter des données statistiques sur la population moyenne de cellules (Amann, 2004). L'analyse des spermatozoïdes se fait grâce à un système optique composé d'une source de lumière, d'un microscope et d'une caméra vidéo qui digitalise les images. Ces images sont ensuite traitées par un ordinateur équipé d'un logiciel d'analyse d'image intégré qui permet de définir de façon objective et répétable des

paramètres tels que la proportion de spermatozoïdes mobiles, leur vitesse, la linéarité de leurs trajectoires, etc.

Ces analyseurs automatiques de mobilité fournissent un très grand nombre de mesures objectives sur les caractéristiques de mobilité des spermatozoïdes :

- Le pourcentage de spermatozoïdes motiles.
- La vitesse curviligne (VCL) est la distance dans le temps de la trajectoire réelle de la tête du spermatozoïde (Figure 11).
- La vitesse en ligne droite (VSL) est la distance en ligne droite entre la tête du spermatozoïde au début de l'analyse et sa position à la fin du temps écoulé (Figure 11).
- La vitesse de trajet (VAP) est la vitesse ou position moyenne des spermatozoïdes ( $\mu\text{m/s}$ ) le long d'un chemin de 5 points mathématiquement lissé où les spermatozoïdes se déplacent au fil du temps (Figure 11).
- Le pourcentage de spermatozoïdes rapides est le pourcentage de spermatozoïdes en mouvement avec une  $VAP > 50 \mu\text{m/s}$  (pour l'oiseau).
- Le pourcentage de spermatozoïdes progressifs est la proportion de spermatozoïdes rapides avec une rectitude  $> 75 \mu\text{m/s}$  (pour l'oiseau).



**Figure 11** : Représentation schématique des VAP, VCL et VSL

(Source de Select Breeders services).

**Tableau 2** : Critères d'analyse de mobilité massale chez les oiseaux domestiques (d'après Petitjean, 1965).

Notes	Caractéristiques de l'échantillon
0	Échantillon ne présentant que des spermatozoïdes immobiles.
1	Présence de quelques spermatozoïdes agités (oscillation sur place).
2	Présence d'une proportion importante de spermatozoïdes agités sans déplacement notable.
3	Quelques spermatozoïdes se déplacent lentement.
4	Quelques spermatozoïdes sont immobiles, d'autres sont agités sur place alors que d'autres sont mobiles. L'aspect général détermine une mobilité moyenne.
5	Comme le 4, mais la proportion de spermatozoïdes mobiles est supérieure à la moyenne. La mobilité est assez bonne mais pas homogène dans tous les différents champs observés. Souvent, on note la présence de spermatozoïdes agglutinés.
6	La quasi-totalité des spermatozoïdes se déplacent, la mobilité est bonne et d'aspect plus homogène dans tous les différents champs observés.
7	Comme le 6, mais amorces de mouvements de vagues lents dans tous les différents champs observés.
8	La mobilité est très bonne, les vagues se manifestent de façon énergique et prennent l'aspect de tourbillons.
9	La mobilité est excellente, les vagues et les tourbillons sont très rapides.

### 3.6. Mesure du pouvoir de fécondation des spermatozoïdes

L'insémination artificielle s'effectue en réalisant une pression sur la partie abdominale de la femelle qui provoque une éversion du cloaque faisant apparaître l'orifice vaginal. L'extrémité du pistolet doseur contenant la semence (environ 2 cm) est introduite dans le vagin puis la dose est inséminée. La pression abdominale est relâchée lors du retrait du pistolet. Si l'insémination est trop profonde des lésions sont occasionnées, tandis que si elle ne l'est pas assez un rejet partiel ou total de la dose peut avoir lieu, ce qui impacte fortement la fertilité. Pour la sauvegarde du pouvoir fécondant des spermatozoïdes, il est important de maîtriser toutes les étapes dès la collecte de la semence jusqu'à l'insémination artificielle. Tous les paramètres cités précédemment doivent être adaptés au sperme de chaque espèce pour limiter les lésions cellulaires responsables de la diminution de la fertilité.

Après la mise en place d'une dose de sperme, les femelles des oiseaux domestiques ont la particularité de pondre des œufs fécondés pendant une durée qui varie de quelques jours (caille) à quelques mois (dinde). Elle peut atteindre trois semaines chez la poule. Chez cette dernière espèce, le taux de fécondation des œufs n'est vraiment élevé que dans les 6 à 10 jours qui suivent l'insémination, soit 7 jours en moyenne. Ce taux augmente avec le nombre de spermatozoïdes inséminés (Taneja et Gowe 1961): mais diminue avec l'âge des poules. Cette notion conduit à préciser que l'intervalle à respecter entre deux inséminations de semence fraîche consécutives doit être d'une semaine, de manière à inséminer un nombre minimum de spermatozoïdes sans perte de fertilité. En fait, cet intervalle est fonction de l'âge des poules car la durée de leur période fertile diminue avec l'âge, ce que l'on peut corriger en partie en augmentant la dose de spermatozoïdes plutôt que la fréquence des inséminations. Encore faut-il être prudent sur ce point car il existe entre différents croisements commerciaux des variations importantes du stockage des spermatozoïdes pour un âge et pour une dose donnés. Ces variations peuvent entraîner des écarts non négligeables de fertilité entre groupes inséminés par ailleurs dans les mêmes conditions.

En outre, quand il y a insémination une fois par semaine avec des nombres élevés de spermatozoïdes (100 à 200 millions) de bonne qualité, il est rare que le taux de fécondation soit maximum avant la troisième semaine chez toutes les poules. Cela peut être dû au fait que seule une très faible part (1 à 2 % en moyenne) des spermatozoïdes inséminés sont effectivement stockés après chaque insémination dans les glandes utéro vaginales de l'oviducte. Quoi qu'il en soit, il faut en fait, au début de chaque période d'insémination, inséminer les poules deux jours de suite, éventuellement trois, pour pouvoir atteindre d'emblée un taux de fécondation maximum et connaître rapidement leur aptitude à la fécondation. Avec la semence congelée, la fréquence d'insémination doit être doublée.

## **4. L'AMPK, AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE**

### **4.1. Rôle de l'AMPK dans le métabolisme**

L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est un senseur du métabolisme énergétique cellulaire qui participe à de multiples cascades de kinases. Cette sérine-thréonine protéine kinase a été conservée tout au long de l'évolution des eukaryotes, de la levure aux mammifères (Hardie, 2003). L'AMPK participe à la détection et au contrôle de l'équilibre énergétique cellulaire de l'ensemble du corps par sa sensibilité à l'AMP et à l'ADP. L'AMPK

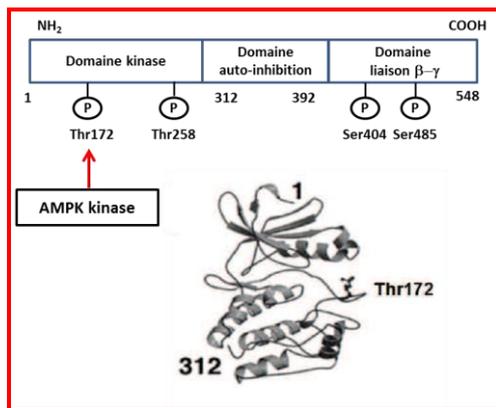
est activée allostériquement suite à l'augmentation des ratios AMP/ATP et/ou ADP/ATP (Hardie et al, 2012): via sa phosphorylation par diverses kinases. L'activation de l'AMPK vise généralement à compenser la perte d'ATP grâce à la stimulation des mécanismes cataboliques et à l'inhibition des mécanismes anaboliques.

L'AMPK a été caractérisée pour la première fois en 1975 dans le foie de rat, comme une kinase phosphorylant et inhibant l'HMG-CoA réductase, l'enzyme clé de la synthèse du cholestérol. Ce n'est qu'en 1987, que l'AMPK est identifiée comme l'unique enzyme responsable de l'inhibition de la synthèse du cholestérol et des acides gras (Carling et al, 1987). Grâce à son clonage en 1994, les rôles de l'AMPK ont pu être mieux établis. L'AMPK est alors définie comme un senseur métabolique majeur permettant l'ajustement précis des besoins et des disponibilités énergétiques cellulaires (Beri et al, 1994 ; Kahn et al, 2005).

#### **4.2. Structure**

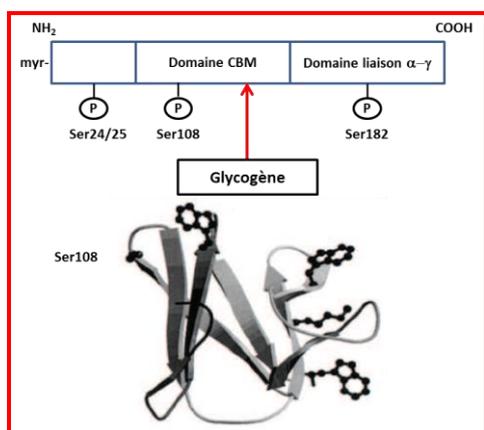
L'AMPK est un complexe hétérotrimérique formé d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ . Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont liées par la sous-unité  $\alpha$  (Wong et Lodish, 2006). Des homologues de toutes les sous-unités de l'AMPK ont été trouvés chez toutes les espèces animales dont le génome a été séquencé (Hardie et al, 2003). 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 dont certains subissent des épissages alternatifs donnant ainsi une diversité importante d'hétérotrimères (Stapleton et al, 1996). En fait, les différentes isoformes permettent la formation de 12 complexes possibles ( $\alpha\beta\gamma$ ).

La sous-unité catalytique  $\alpha$  possède au niveau de sa partie N-terminale un domaine catalytique de type sérine/thréonine kinase ainsi que le site de phosphorylation (Thr172 par des kinases en amont (Figure 12) (Hanks et al, 1988). La phosphorylation du résidu Thr172 a été identifiée comme étant déterminante et requise pour l'activité de l'AMPK (Hawley et al, 1996) et demeure le principal site de régulation de l'enzyme (Stein et al, 2000). D'autres sites de phosphorylation semblant jouer un rôle dans la régulation de l'activité ont été caractérisés sur la sous-unité catalytique  $\alpha$  située en thréonine 258 (Thr258): sérine 404 (Ser404) et sérine 485 (Ser485) (Kemp et al, 2003). La sous-unité  $\alpha$  contient en son milieu de séquence un domaine d'auto-inhibition réprimant l'activité kinase en l'absence d'AMP (Crute et al, 1998). L'extrémité C-terminale est constituée d'un domaine de liaison aux sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  (Iseli et al, 2005).



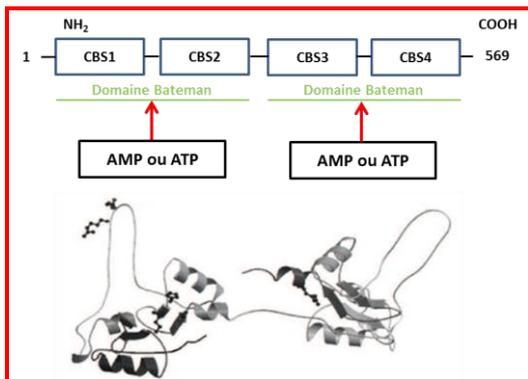
**Figure 12** : Illustration des domaines et principales phosphorylations couplés à la structure cristallographique de la sous-unité  $\alpha$  de l'AMPK. Par ordre alphabétique : Ser : sérine ; Thr : thréonine (d'après des illustrations provenant de Kemp et al, 2003).

La sous-unité  $\beta$  est l'une des deux sous-unités régulatrices de l'AMPK (Figure 13). Elle possède deux régions conservées. La première région est un domaine de liaison aux carbohydrates (« carbohydrate-binding module - containing family 48 » ou CBM) ([www.cazy.org/CBM48.html](http://www.cazy.org/CBM48.html)). Ce domaine était précédemment appelé « glycogen binding domain » (GBD) (Hudson et al, 2003 ; Polekhina et al, 2003). Le CBM permet à l'AMPK d'estimer le statut des réserves énergétiques via la quantité et la qualité du glycogène auquel il se lie (Koay et al, 2007 ; Koay et al, 2010 ; McBride et al, 2009). La deuxième région conservée est un domaine C-terminal nécessaire pour former un complexe avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  (domaine de liaison  $\alpha$ - $\gamma$ ) (Iseli et al, 2005 ; Thornton et al, 1998). La partie N-terminale possède la particularité de pouvoir être modifiée par myristoylation. Cette modification post-traductionnelle pourrait contrôler la localisation intracellulaire de la sous-unité  $\beta$ , mais aussi faciliter les interactions avec d'autres protéines (Mitchelhill et al, 1997 ; Warden et al, 2001).



**Figure 13** : Illustration des domaines et principales phosphorylations couplés à la structure cristallographique de la sous-unité  $\beta$  de l'AMPK. Par ordre alphabétique : CBM : carbohydrate-binding module - containing family 48 ; Ser : sérine (d'après des illustrations provenant de Kemp et al, 2003).

La deuxième sous-unité régulatrice de l'AMPK est la sous-unité  $\gamma$  (Figure 14). À l'extrémité N-terminale, elle contient quatre répétitions en tandem d'une structure connue sous le nom de « cystathionine- $\beta$ -synthase » (CBS). Ces structures se lient par paire et forment deux modules appelés « domaines Bateman ». Chaque domaine permet la liaison d'une molécule d'AMP, d'ADP ou d'ATP de façon mutuellement exclusive (Bateman, 1997 ; Kemp, 2004 ; Scott, 2004).



**Figure 14** : Illustration des différents domaines couplés à la structure cristallographique de la sous-unité  $\gamma$  de l'AMPK. AMP: adénosine monophosphate ; ATP: adénosine triphosphate ; CBS: cystathionine- $\beta$ -synthase (d'après des illustrations provenant de Kemp et al, 2003).

### 4.3. Régulation de l'activité de l'AMPK

L'AMPK a pour rôle de rétablir l'équilibre énergétique de la cellule en maintenant suffisante la concentration en ATP. Une fois activée, elle stimule les voies cataboliques générant de l'ATP (oxydation lipidique, capture du glucose par les tissus...) et inhibe les voies anaboliques consommant de l'ATP (synthèses lipidique et protéique). La régulation de l'activité de l'AMPK est un processus complexe impliquant des kinases et des protéines phosphatases (Hardie et al, 2006).

#### 4.3.1. Régulation par des kinases en amont

L'activation de l'AMPK exige la phosphorylation du résidu Thr172 situé dans le domaine kinase de la sous-unité  $\alpha$  réalisée par une kinase en amont (Hawley et al, 1996). Il existe trois AMPK kinases chez les mammifères : LKB1 (ou sérine/thréonine kinase 11 (STK11)): Calmodulin-dépendant kinase kinase  $\beta$  (CaMKK $\beta$ ): et Transforming growth factor- $\beta$ -Activated Kinase 1 (TAK1).

**CaMKK $\beta$**  : La Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline dépendant protein kinase kinase  $\beta$  (CaMKK $\beta$ ) est la seconde kinase importante impliquée dans l'activation de l'AMPK (Hawley et al, 1995). Contrairement à LKB1 qui phosphoryle l'AMPK lors d'un changement du ratio AMP/ATP,

l'activation de la CaMKK $\beta$  est totalement indépendante du niveau d'AMP présent dans la cellule. CaMKK $\beta$  phosphoryle et active également l'AMPK en réponse à des concentrations intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> élevées (Woods et al, 2005) et est impliquée dans des tissus et des fonctions précis tels que l'excitabilité neuronale (Hawley et al, 2005): l'activation de la thrombine dans les cellules endothéliales (Stahmann et al, 2006) ou les contractions musculaires (Hawley et al, 1995). Il est légitime de penser que le calcium prépare la cellule à mobiliser de l'énergie cellulaire puisqu'il est le signal de l'imminence d'une intense consommation d'énergie.

**LKB1** : la protéine kinase « liver kinase B1 » (aussi appelée « Serine/threonine kinase 11 » STK11) a été la première AMPK kinase décrite (Hawley et al, 2003). Pour être fonctionnelle, LKB1 doit former un complexe avec deux autres unités auxiliaires : « STE20-related adaptor protein  $\alpha/\beta$  » (STRAD $\alpha$  ou STRAD $\beta$ ) et « scaffolding mouse protein 25  $\alpha/\beta$  » (MO25 $\alpha$  ou MO25 $\beta$ ) (Baas et al, 2003 ; Boudeau et al, 2003). L'association des trois sous-unités est nécessaire pour une activité complète (Hawley et al, 2003). Le complexe LKB1/STRAD/MO25 semble posséder une activité basale continue et ne semble pas être augmenté par la concentration en AMP. La capacité du complexe LKB1/STRAD/MO25 à augmenter l'activité de l'AMPK serait facilitée par le changement de conformation de l'AMPK par l'AMP, faisant du site catalytique de la sous-unité  $\alpha$  de l'AMPK un substrat plus facilement accessible pour LKB1 (Hawley et al, 2003). Cependant, comme LKB1 ne possède pas de modulateur pharmacologique connu, nous avons logiquement choisi de nous focaliser sur CaMKK dans notre travail.

D'autres kinases peuvent également activer l'AMPK : les protéines TAK1 (Transforming growth factor- $\beta$ -Activated Kinase 1) et KSR2 (kinase suppressor of Ras) (Xie et al, 2006 ; Momcilovic et al, 2006). Ainsi la phosphorylation de l'AMPK dans d'autres sites a été signalée, tels que Ser485 (en  $\alpha$ 1) ou Ser491 (en  $\alpha$ 2) par Akt / PKB (Horman et al, 2006 ; Kovacic et al, 2003) et,  $\alpha$ -Ser173 par PKA (Hurley et al, 2006).

#### **4.3.2. Inactivation par des protéines phosphatases**

Les phosphatases possèdent également un rôle crucial dans le maintien de l'activité de l'AMPK. Il n'existe cependant pas de phosphatase unique déphosphorylant l'AMPK. PP1, PP2A (famille des PPP) et PP2C $\alpha$  (de la famille des PPM): trois des quatre classes majeures de sérine/thréonine phosphatases chez les mammifères, sont capables de déphosphoryler la Thr172 (Carling D et Hardie DG, 1989).

### 4.3.3. Activateurs et inhibiteurs pharmacologiques

**Metformine :** La Metformine (N, N-diméthylimidocarbonimidic diamide) est l'agent antidiabétique le plus utilisé. Elle réduit la glycémie sans stimuler la sécrétion d'insuline. Bien qu'elle soit administrée depuis 1957, les mécanismes par lesquels la Metformine abaisse le glucose et les lipides ne sont pas encore tout à fait clairs. Zhou et al ont montré que les effets bénéfiques de la Metformine étaient AMPK-dépendants (Zhou et al, 2001). Par ailleurs, il semble que la Metformine n'active pas directement l'AMPK, mais qu'elle agit en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, suggérant une activation indirecte de l'AMPK en augmentant le ratio AMP/ATP intracellulaire (Owen et al, 2000). Ce mécanisme d'action a été observé dans les hépatocytes mais aussi dans les cellules musculaires, les cellules du pancréas et les cellules endothéliales (Zhou et al, 2001 ; Leclerc et al, 2004). Hawley et al, 2003 ont montré que le mécanisme d'action de la Metformine semble également impliquer la protéine kinase PKC $\zeta$  qui phosphoryle LKB1 sur la Ser428. Cette action favorise l'export nucléaire de LKB1 puis l'activation de l'AMPK par ce dernier (Xie et al, 2008). Par contre, certains effets de la Metformine comme l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique semblent à la fois LKB1 et AMPK-indépendants, suggérant donc l'activation d'autres voies de signalisation par cet agent anti-diabétique (Foretz et al, 2010).

**AICAR :** Le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) active l'AMPK plus directement et est souvent utilisé lors des expérimentations *in vitro* car il pénètre facilement dans la cellule (Corton et al, 1995). L'AICAR est rapidement phosphorylé en analogue de l'AMP, le ZMP. L'accumulation de ZMP aboutit à l'activation de l'AMPK en mimant les effets de l'AMP : activation allostérique de l'AMPK, phosphorylation du résidu Thr172 et inhibition de sa déphosphorylation. Ainsi, l'utilisation d'AICAR a permis de caractériser les effets inhibiteurs de l'AMPK sur l'ACC et sur l'HMG CoA réductase dans les hépatocytes du rat et dans les adipocytes (Sullivan et al, 1994). Dans le muscle de rat, l'AICAR stimule la capture du glucose et l'oxydation des acides gras, alors que dans le foie, ce composé inhibe la néoglucogenèse (PEPCK et G6Pase) en dégradant le facteur de transcription FOXO1 (Barthel et al, 2002 ; Lochhead et al, 2000 ; Merrill et al, 1997). Ces effets sont AMPK-dépendants. Cependant, les résultats obtenus par l'utilisation de cet activateur devraient être étudiés et évalués avec soin, car l'action du ZMP n'est pas complètement spécifique à l'AMPK et pourrait réguler d'autres enzymes indépendamment de l'AMPK, comme par exemple la glycogène phosphorylase participant à la glycogénolyse

(Longnus et al, 2003): et la fructose-1,6-biphosphatase (Vincent et al, 1991) intervenant dans la glycolyse et la néoglucogénèse.

**A769662** : C'est un nouvel activateur de l'AMPK. Contrairement à d'autres activateurs pharmacologiques, il active directement l'AMPK en imitant les effets de l'AMP. Il stimule l'AMPK par une action allostérique et l'inhibition de la déphosphorylation de l'AMPK à Thr-172 à travers l'interaction avec la sous-unité  $\beta$ 1. L'A769662 est le seul activateur pharmacologique de l'AMPK qui active directement cette kinase (Cool et al, 2006 ; Goransson et al, 2007). En effet, les autres composés pharmacologiques tels que l'AICAR ou la Metformine n'agissent pas directement mais par l'intermédiaire d'autres activateurs de l'AMPK : l'AICAR et la Metformine miment l'augmentation du ratio AMP/ATP (par l'analogue ZMP de l'AMP pour l'AICAR et en inhibant la chaîne respiratoire pour la Metformine). La perfusion intrapéritonéale de ce nouvel activateur est capable d'inhiber l'activité de l'ACC, de diminuer les concentrations de malonyl-CoA et l'accumulation de lipides au niveau hépatique chez des rongeurs (Cool et al, 2006). Les concentrations de l'A769662 atteignent des valeurs maximales dans le foie, mais sont beaucoup moins importantes dans le muscle squelettique ce qui pourrait expliquer l'absence de diminution des concentrations de malonyl-CoA musculaire après perfusion d'A769662 en intrapéritonéale. Cet activateur de l'AMPK est capable d'augmenter l'activité de l'AMPK et la phosphorylation de l'ACC sur muscle isolé (Goransson et al, 2007) ou sur lignées de cellules musculaires et sur cellules musculaires primaires humaines (Guigas et al, 2008). Cependant, l'A769662 requiert d'être dilué dans du DMSO qui est très toxique pour les spermatozoïdes. Son action d'activateur aurait donc été en concurrence avec la toxicité du DMSO et il nous aurait été difficile de l'évaluer. C'est pourquoi nous avons choisi de ne pas utiliser l'A769662 dans nos travaux.

**Compound C** : Le "Compound C" (CC) est un inhibiteur de l'AMPK, réversible et compétitif de l'ATP. Lorsque les cellules sont soumises à différents stimuli AMPK-dépendants (activateurs pharmacologiques ou physiologiques): le composé C n'est plus capable d'inhiber complètement l'AMPK. Ainsi, l'addition simultanée de composé C avec l'AICAR ou la Metformine permet de limiter l'activation de l'AMPK par ces activateurs. Les effets du composé C sont contraires à ceux induits par les activateurs de l'AMPK. Cet inhibiteur de l'AMPK réduit efficacement l'oxydation des acides gras et le transport du glucose dans le muscle ainsi que la néoglucogénèse hépatique (Merrill et al, 1997 ; Zhou et al, 2001).

#### **4.4. Fonction de l'AMPK**

Dans cette partie, notre but n'est pas d'être exhaustif vis-à-vis de toutes les cibles de l'AMPK, mais de fournir quelques clés permettant de comprendre comment l'AMPK influe sur le métabolisme cellulaire et la prolifération afin de maintenir un niveau stable et viable d'ATP.

##### **4.4.1. Régulation du métabolisme des carbohydrate**

L'AMPK, activée en réponse à un stress énergétique, stimule l'incorporation de glucose dans la cellule et la glycolyse aérobie. En parallèle, elle inhibe la synthèse de glycogène pour limiter d'une part la consommation d'énergie, et empêcher d'autre part que le glucose-6-phosphate ne soit dérivé de la glycolyse vers la synthèse de glycogène. Capture du glucose (principalement dans le muscle squelettique et le tissu adipeux) : l'AMPK active l'entrée de glucose dans les muscles et les organes de stockage en stimulant la translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane plasmique (Kurth-Kraczek et al, 1999): probablement par un mécanisme commun à l'insuline : la phosphorylation du substrat de l'AKT, l'AS160. L'AMPK contribue donc à améliorer la sensibilité à l'insuline (Treebak et al, 2006). De plus, l'activation de l'AMPK par un traitement à l'AICAR sur des muscles de rats isolés montre que l'AMPK est capable d'augmenter l'oxydation des glucides au niveau musculaire (Smith et al, 2005). Ainsi, dans des conditions où l'AMPK est active, le glucose qui entre dans la cellule est dirigé vers son oxydation, productrice d'énergie, plutôt que vers sa mise en réserve sous forme de glycogène, coûteuse en énergie.

##### **4.4.2. Régulation du métabolisme des lipides**

L'AMPK est un modulateur clé du métabolisme des lipides, l'une de ses principales cibles est la voie de synthèse des acides gras. De manière similaire au métabolisme des carbohydrates, son action peut être dirigée sur certaines cibles exprimées dans des tissus particuliers, ou peut-être ubiquitaire. L'AMPK régule plusieurs acteurs importants du métabolisme des lipides et son action globale est en faveur de l'oxydation des acides gras et en défaveur de leur biosynthèse. L'AMPK contrôle le devenir des acides gras en réduisant le taux de malonyl-CoA intracellulaire qui est à la fois un précurseur essentiel à la synthèse des acides gras et aussi un inhibiteur de l'oxydation mitochondriale des acides gras. En effet, elle participe à la régulation allostérique de la CPT1 (la carnitine-palmitoyl-CoA transférase-1) qui catalyse l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. L'AMPK phosphoryle et inhibe l'acétyl-CoA carboxylase (une enzyme clé dans la biosynthèse des acides gras) (Corton et al,

1994). Quand l'ACC est inhibée, la production de malonyl-CoA est arrêtée ; cette enzyme a pour rôle d'allonger la chaîne des acides gras durant leur biosynthèse. En situation de synthèse des acides gras, la malonyl-CoA inhibe la carnitine-palmitoyl-CoA transferase-1 (CPT1): qui est impliquée dans l'hydrolyse des acides gras. Cependant, lorsque le niveau de malonyl-CoA diminue, l'inhibition est levée sur CPT1, ce qui va favoriser l'entrée des longues chaînes d'acide gras dans la mitochondrie où elles vont être oxydées (Velasco et al, 1997). Enfin, l'AMPK régule finement la synthèse du cholestérol en phosphorylant et inhibant l'HMG-CoA Réductase (Carling et Hardie, 1989). Cette voie de signalisation de l'AMPK est très importante dans la réduction des réserves lipidiques dans les muscles et le foie. L'activation de l'AMPK ne bloque pas uniquement la synthèse des acides gras, mais active leur oxydation lors de la signalisation par la leptine ou de la contraction musculaire.

#### **4.4.3. Régulation de la néoglucogénèse (principalement dans le foie)**

L'AMPK contrôle l'homéostasie du glucose principalement via l'inhibition de l'expression des gènes néoglucogéniques (PEPCK et G6Pase) et de la production hépatique de glucose (Lochhead et al, 2000). Plusieurs facteurs de transcription régulés par l'AMPK sont susceptibles de contrôler l'expression de PEPCK et G6Pase : FOXO1 (Barthel et al, 2002): HNF4 $\alpha$  (Leclerc et al, 2001): SHP (Kim et al, 2008) et TORC2 (Shaw et al, 2005 ; Viollet et al, 2009).

#### **4.4.4. Régulation de la synthèse protéique**

La synthèse protéique est régulée dans tous les tissus par la voie de signalisation de l'insuline PI3K/AKT/mTOR/S6K1. La protéine kinase S6K1 induit la synthèse protéique ainsi que la croissance cellulaire (Holz et Blenis, 2005). L'AMPK réprime la synthèse protéique par l'inhibition de la voie mTOR/S6K1 via la phosphorylation de TSC2 en amont de mTOR et via la phosphorylation du complexe 1 (raptor) de mTOR (mTORC1) (Van et al, 2011).

#### **4.4.5. Régulation de la biogenèse mitochondriale**

L'AMPK phosphoryle et active PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) qui contrôle l'expression de nombreux facteurs de transcription pour induire la biogenèse mitochondriale. Il en résulte une plus grande capacité oxydative mitochondriale (Canto et Auwerx, 2010). PGC1 $\alpha$  est un régulateur particulièrement important de la biogenèse mitochondriale et de l'activité respiratoire dans les adipocytes (Rohas et al, 2007): mais

également dans d'autres tissus (Lin et al, 2005). L'AMPK peut activer directement PGC1 $\alpha$ , ou indirectement par le biais de SIRT1 (Canto et al, 2009).

#### **4.4.6. Rôles de l'AMPK dans la reproduction**

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le système AMPK est sensible à de nombreux stimuli, principalement témoins d'une baisse de l'énergie disponible, qui lui permettent d'agir en chef d'orchestre afin de pallier de façon rapide mais aussi à plus long terme aux demandes énergétiques. Véritable senseur et régulateur majeur de l'énergie au niveau cellulaire, tissulaire et corporel, l'AMPK est impliquée dans la régulation des métabolismes lipidiques, glucidiques et protéiques des tissus périphériques. Au niveau plus central de l'hypothalamus, l'AMPK est impliquée dans les dépenses énergétiques et la prise alimentaire. Kinase ubiquitaire, elle a aussi été caractérisée dans les tissus reproducteurs mâle et femelle. En plus de sa sensibilité aux hormones et aux cytokines, dont certaines impliquées dans la reproduction, l'AMPK possède la capacité de moduler la synthèse des hormones stéroïdiennes via le niveau de cholestérol. C'est assez naturellement qu'au cours des années 2000, il a été suggéré que ce régulateur majeur de l'énergie soit impliqué dans les processus très coûteux en énergie de la reproduction (Tosca et al, 2005). Nous allons dans ce paragraphe décrire le rôle de l'AMPK dans les cellules ovariennes et détailler les quelques travaux existants sur son implication dans la fonction de reproduction mâle.

##### **4.4.6.1. Rôle de l'AMPK au niveau des ovaires**

La présence de l'AMPK a été attestée dans les différents types de cellules spécifiques du follicule ovarien : ovocytes, cellules de la granulosa, de la thèque, du corps jaune (corpus luteum) ou du cumulus, chez plusieurs espèces invertébrées (Carattino et al, 2005 ; Tosca et al, 2007 ; Tosca et al, 2006a ; Tosca et al, 2005 ; Stricker et al, 2010).

Dans les cellules de la granulosa, chez la rate, l'AICAR inhibe la sécrétion de la progestérone par un mécanisme AMPK-dépendant via une inhibition de la 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -HydroxySteroid Dehydrogenase): elle-même due à une inhibition des MAPKs ERK1/2 (Mitogen-Activated Protein Kinases Extracellular-signal-Regulated Kinase 1/2 (Tosca et al, 2005). Dans les cellules de la granulosa de rate en culture, l'AMPK, activée par la Metformine, inhibe la sécrétion de la progestérone par ces cellules en inhibant les niveaux protéiques de la 3 $\beta$ -HSD et de la StAR et le niveau de phosphorylation des MAPKs ERK1/2 (Tosca et al, 2006a). Chez la vache, la Metformine inhibe également la stéroïdogénèse (progestérone et également oestradiol) dans ces mêmes cellules via l'AMPK (Tosca et al, 2007). Ces études montrent que

l'AMPK régule d'une manière générale la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa en agissant sur l'expression des différentes protéines de la stéroïdogenèse et sur la voie de signalisation des MAPKs ERK1/2. En outre, il a aussi été montré que la Metformine inhibe la production d'estradiol et de progestérone dans les cellules de la granulosa humaine (Mansfield R et al, 2003). Richardson et al, 2009, ont constaté une augmentation de la production de lactate dans la granulosa d'humains traités par la Metformine, en parallèle d'une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK dans ces cellules. Chez la poule, l'AMPK est présente dans les cellules de la granulosa et de la thèque des follicules préovulatoires (Tosca et al, 2006b). Dans les cellules de granulosa en culture, l'AMPK, activée par l'AICAR, régule la sécrétion de la progestérone et l'expression de la StAR par une modulation des MAPKs ERK1/2 (Tosca et al, 2006b). Dans l'ovaire, la Metformine diminue directement l'estradiol et la progestérone dans les cellules de la granulosa d'humains, et l'inhibition de la production de progestérone par la Metformine dans les cellules de la granulosa de rat provoque une augmentation de l'AMPK phosphorylée (Pellatt et al, 2011).

Dans des cultures primaires de cellules de la thèque interne de ratte, l'ajout de Metformine est corrélé à une augmentation de l'activité de l'AMPK et à une inhibition de la prolifération induite par une stimulation par l'insuline (Will et al, 2012). Dans cette dernière étude, les auteurs ne font pas mention d'une modulation de la stéroïdogenèse. La Metformine pourrait donc conduire à une baisse de la synthèse d'androgènes via l'activation de l'AMPK dans les cellules de la thèque.

Dans les cellules lutéales du corps jaune, la LH (luteinizing hormone) inhibe l'activité de l'AMPK alors que son activation (par un activateur pharmacologique comme l'AICAR) diminue la synthèse de progestérone induite par la LH chez la vache (Hou et al, 2010). Donc, comme observé dans les cellules de la granulosa, l'AMPK est impliquée dans la synthèse de progestérone. L'AMPK est aussi présente dans l'ovocyte et les complexes cumulo-ovocytaires de souris (Downs et al, 2002).

Dans les cellules de l'ovocyte, l'AICAR et la Metformine bloquent de manière réversible la reprise de méiose dans des ovocytes porcins entourés des cellules du cumulus (Mayes et al, 2006). Chez les espèces porcine et bovine, l'AMPK pourrait inhiber la sécrétion de la progestérone dans les cellules du cumulus comme elle le fait dans les cellules de la granulosa (Tosca et al, 2005, 2006a, 2006b, 2007): sécrétion cruciale pour une bonne maturation (Zhang et al, 1989 ; Borman et al, 2004): et aussi inhiber la synthèse protéique comme dans d'autres types cellulaires (Horman et al, 2002 ; Browne et al, 2004): processus

important au cours de la maturation ovocytaire chez ces espèces en particulier (Khatir et al, 1998). Ainsi, l'AMPK pourrait contrôler dans l'ovaire la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa et la maturation ovocytaire mais aussi être impliquée dans les fonctions du corps jaune. L'AMPK est aussi présente dans l'hypophyse et y contrôler la sécrétion des gonadotropines LH et FSH (Follicle Stimulating Hormone) qui régulent elles-mêmes les sécrétions de progestérone et d'oestradiol.

#### **4.4.6.2. Rôle de l'AMPK au niveau des testicules**

Le rôle de l'AMPK dans le fonctionnement cellulaire de la reproduction chez le mâle n'a été que peu étudié. En 2000, Hardie et al. ont identifié pour la première fois les différentes sous unités de l'AMPK dans divers tissus, dont le testicule : la sous unité  $\alpha 1$  y est majoritairement exprimée (75% contre 25% pour l' $\alpha 2$ ) (Cheung et al, 2000). L'AMPK a ensuite également été identifiée dans les cellules germinales, les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli (Tanwar et al, 2012 ; Tartarin et al, 2012 ; Towler et al, 2008).

Chez les mammifères, Galardo et al, 2007 ont montré que l'AMPK est présent dans les cellules de Sertoli et que l'activation de l'AMPK par l'AICAR dans les cellules de Sertoli entraîne une augmentation de la synthèse de lactate. Les mêmes auteurs ont mis en évidence l'implication de l'AMPK dans la stabilité de la distribution de la protéine ZO-1 (protéine associée au complexe fonctionnel entre les cellules de Sertoli) en cas de stress calcique (Galardo et al, 2010). Metformine a aussi réduit l'instabilité et la prolifération cellulaire induite par les changements génomiques du diabète dans les cellules somatiques et germinales (Attia et al, 2009). L'ingestion de resveratrol, un autre activateur de l'AMPK, entraîne une augmentation de la testostérone (+52%): du nombre de spermatozoïdes (+16%) et de leur mobilité (+23%) (Shin et al, 2008). Plus récemment, il a été montré que la Metformine diminue la production de testostérone in vitro et réduit la taille des testicules et la population de cellules de Sertoli in vivo (Tartarin et al, 2012). Cette réduction de la population Sertoli serait due à une diminution de la prolifération cellulaire plutôt qu'à la mort de cellules (Tartarin et al, 2012): indiquant que la Metformine altère les fonctions physiologiques des cellules de Sertoli.

La relation entre l'AMPK et la mobilité des spermatozoïdes a été rapportée chez des souris knock-out AMPK  $\alpha 1$ . Les spermatozoïdes de ce modèle présentent une diminution prononcée de leur mobilité par rapport au type sauvage (Tartarin et al, 2012). Cependant, on ne sait pas si la diminution de la mobilité est causée par un effet direct de l'absence de

l'AMPK, ou s'il est le résultat d'altérations structurelles et/ou fonctionnelles décrites dans les souris knock-out  $\alpha 1$  AMPK (Tartarin et al, 2012). D'autres études fonctionnelles spécifiquement basées sur l'utilisation d'un inhibiteur de compound C suggèrent un rôle possible de l'AMPK dans le contrôle de l'organisation des lipides de la membrane, le potentiel mitochondrial et l'intégrité de l'acrosome (Hurtado de Llera et al, 2012). En outre, le compound C diminue aussi la mobilité de spermatozoïdes pendant le stockage à long terme de sperme de porc (Hurtado de Llera et al, 2013). Un autre activateur de l'AMPK, l'A769662, augmente aussi les paramètres de mobilité et l'intégrité de la membrane de l'acrosome des spermatozoïdes de porc (Hurtado de Llera et al, 2015). Par contre le rôle de l'AMPK sur les fonctions des spermatozoïdes de coq n'a pas encore été étudié. C'est une des raisons pour lesquelles nous avons abordé cette voie au cours de ma thèse.

## **5. ROLE DES CANAUX CALCIQUES IMPLIQUÉS DANS LES FONCTIONS DES SPERMATOZOÏDES**

Le calcium est un messager secondaire ubiquitaire impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires : la transcription, les activités enzymatiques, la phosphorylation de protéines, la mort cellulaire et bien d'autres (Carafoli, 2002).

Il est essentiel au cours de la fécondation. *In vitro*, les ions calcium peuvent affecter la mobilité des spermatozoïdes aviaires et leur métabolisme. Ces deux paramètres peuvent être stimulés ou inhibés par le calcium selon l'espèce et la concentration (Thomson et Wishart, 1991). La présence de  $Ca^{2+}$  dans le milieu extracellulaire est nécessaire pour l'initiation de la réaction acrosomique des spermatozoïdes chez les oiseaux (Lemoine et al, 2008). L'augmentation du  $Ca^{2+}$  serait le résultat d'une modulation des différentes voies dépendantes du  $Ca^{2+}$  et des différents canaux calciques causant une augmentation de l'influx ou une diminution de l'influx d'ion calcium (Wennemuth et al, 2003).

L'AMPK est un senseur important du métabolisme énergétique. Une de ses kinases activatrices est la CaMKK qui est elle-même activée suite à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Dans cette étude, nous avons voulu déterminer la régulation de la voie de signalisation de l'AMPK par des kinases (CaMKKs) liées aux voies de canaux calciques et le lien avec les fonctions biologiques des spermatozoïdes de coq.

Dans les spermatozoïdes, la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  peut-être régulée par une pompe  $Ca^{2+}$ /ATPase (agissant comme une pompe à extrusion du  $Ca^{2+}$ ) (Fraser et

McDermott, 1992) et des échangeur  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , et  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (agissant comme systèmes d'entrée et de sortie du  $\text{Ca}^{2+}$ ) au niveau de la membrane plasmique (Fraser, 1995): et des différents canaux calciques, et, éventuellement, par la réserve intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  des magasins (Blackmore, 1992 ; Serres, 1994). L'activation des canaux calciques dans la membrane plasmique ou la membrane de l'acrosome entraîne une modification de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Cependant, les mécanismes d'action du calcium impliqués dans les spermatozoïdes de mammifères ont déjà faits l'objet de nombreux travaux, ceux des oiseaux ont été très peu étudiés. Les travaux d'Ashizawa et de ses collaborateurs (1994) ont indiqué pour la première fois le rôle de la calmoduline dans la régulation de la mobilité des flagelles et de l'activité métabolique des spermatozoïdes de volailles en utilisant la calmoduline antagoniste. Lemoine et al, 2009, ont expliqué le rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, qui est très important dans l'initiation de la réaction acrosomique des spermatozoïdes chez les oiseaux mais les mécanismes du calcium et le fonctionnement des canaux calciques dans les spermatozoïdes d'oiseaux ne sont pas encore connus. Grâce à notre travail, nous espérons poursuivre l'amélioration des connaissances dans ce domaine. Dans cette partie, mon but est donc de présenter des canaux calciques capables de contrôler les changements de concentration de calcium intracellulaire et impliqués dans les fonctions des spermatozoïdes, surtout chez les mammifères car ces canaux calciques n'ont pas encore été étudiés dans les spermatozoïdes d'oiseaux.

### **5.1. Canaux calciques voltage-dépendants (VOCCs)**

Dans les spermatozoïdes de mammifères, y compris humains, la réaction de l'acrosome est inhibée par une diminution du calcium extracellulaire (Blackmore, 1999 ; Florman, 1994 ; Florman et al, 1992). De plus, lorsque les spermatozoïdes de mammifères sont exposés à la zone pellucide, l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  et la réaction de l'acrosome sont aussi bloquées en présence de 1,4-dihydropyridine (DHPs): une classe d'inhibiteurs spécifiques des VOCCs (Arnoult et al, 1996 ; Florman, 1994 ; Florman et al, 1992). Ceci suggère que l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  initié lors de la réaction de l'acrosome se fait via les VOCCs.

Les VOCCs font partie d'une famille de protéines transmembranaires formant des canaux (Catterall, 2000). La fonction majeure des VOCCs est de convertir les changements de potentiel membranaire en signal intracellulaire impliquant le  $\text{Ca}^{2+}$ . L'unité formant le pore de tous les VOCCs est la sous-unité  $\alpha 1$ . Dix gènes codent pour cette sous-unité ( $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1I$ ,  $\alpha 1S$ ). Les VOCCs comprennent également trois ou quatre sous-unités auxiliaires qui contribuent à

leur spécificité et à leur localisation. Cette famille possède donc une très grande diversité de caractéristiques biophysiques, telles que la dépendance au potentiel membranaire, l'activation ou l'inactivation et la sensibilité aux agents pharmacologiques. Les VOCCs sont classés en deux classes fonctionnelles : les canaux activés par haut voltage (high voltage-activated ; HVA) ou par bas voltage (low voltage-activated ; LVA). Les HVA s'ouvrent suite à une importante dépolarisation de la membrane et ont été classés initialement selon leurs caractéristiques biochimiques et pharmacologiques. On retrouve les types L, N, P/Q et R. La nouvelle nomenclature identifie les HVA selon les gènes de la sous-unité  $\alpha 1$  comme suit :  $Ca_v1.1$  à  $Ca_v1.4$  et  $Ca_v2.1$  à  $Ca_v2.3$ . Les LVA, aussi appelés les canaux de type T, sont codés par les gènes  $Ca_v3$  ( $Ca_v3.1$  à  $Ca_v3.3$ ) et s'ouvrent après une faible dépolarisation de la membrane (Catterall et al, 2003).

Dans les spermatozoïdes, des canaux de types L ont été trouvée au niveau du flagelle d'oursins (Granados-Gonzalez et al, 2005): et au niveau de l'acrosome et de la pièce principale chez la souris (Westenbroek et al, 1999). On a également trouvé des canaux de types R au niveau des mitochondries et de l'acrosome chez les oursins (Granados-Gonzalez et al, 2005): ou au niveau de l'acrosome et de la pièce principale chez la souris (Westenbroek et al, 1999).

## **5.2. Store-operated calcium channels (SOCCs)**

Dans les cellules somatiques, le relargage du  $Ca^{2+}$  des réservoirs intracellulaires active des canaux calciques, les SOCCs, situés au niveau de la membrane plasmique, provoquant ainsi une entrée importante et soutenue de  $Ca^{2+}$  du milieu extracellulaire (Putney, 1990). L'identité des SOCCs est encore inconnue mais les membres de la famille des récepteurs de potentiel transitoire de forme canonique (canonical transient receptor potential ; TRPC) sont des candidats probables des SOCCs (Padinjat et al, 2004). Il y a sept membres de la famille des *TRPC*, *TRPC 1-7*. Plusieurs des membres de la famille ont été détectés dans les cellules germinales et dans les spermatozoïdes. Les transcrits de *TRPC 1-7* et de *TRPC 1, 3, 6 et 7* ont été retrouvés dans les cellules germinales de souris et d'humains respectivement (Castellano et al, 2003 ; Trevino et al, 2001).

Cependant, des données obtenues au niveau des différents systèmes cellulaires suggèrent que les canaux cationiques de la famille des TRP ne peuvent à eux seuls assurer les courants Soc. Il a été récemment démontré que l'intervention des canaux calciques dans le courant SOC ne se limite pas à la famille des TRP. En effet, deux protéines, STIM (Stroma interacting molecule) (Liou et al, 2005), et ORAI ou CRACM (Calcium release-activated

channel molulator) (Feske et al, 2006), ont été récemment identifiées et leur participation dans le courant calcique de type SOC a été mise en évidence.

Deux isoformes de la protéine STIM sont actuellement connues (STIM1 et STIM2). Ce sont des protéines à un domaine transmembranaire localisées dans la membrane du réticulum. Des travaux récents montrent que STIM1 peut jouer le rôle d'un "sensor de calcium" dans le réticulum et participer dans les voies de signalisation conduisant à l'activation des canaux SOC.

Quant aux protéines Orai (CRACM), ce sont des protéines membranaires à 4 domaines transmembranaires avec des extrémités N et C-terminales intracellulaires avec un supposé "pore" situé entre les segments transmembranaires TM2 et TM3 (Feske et al, 2006). Trois isoformes de cette famille sont actuellement connues : Orai 1, Orai 2 et Orai 3.

Les protéines STIM, Orai et TRPCs ont été trouvées dans les spermatozoïdes d'humain (Castellano et al, 2003 ; Darszon et al, 2012 ; Lefièvre et al, 2012). STIM1 est localisée principalement au niveau du cou, de la pièce intermédiaire et de l'acrosome ; Orai 1 et 2 sont localisées dans l'acrosome, la pièce intermédiaire et le flagelle ; Orais 3 est localisée dans la région du cou des spermatozoïdes des humains (Lefièvre et al, 2012). Dans les spermatozoïdes matures de souris, on retrouve au niveau du flagelle TRPC 1, 3 et 6 (Trevino et al, 2001): tandis qu'au niveau de la tête, surtout au niveau acrosomique, on retrouve TRPC 1, 2 et 5 (Jungnickel et al, 2001 ; Sutton et al, 2004). Les TRPC se retrouvent également dans les spermatozoïdes humains, TRPC 1 et 4 exclusivement au niveau du flagelle, alors que TRPC 3 et 6 sont exprimés au niveau du flagelle et de la tête (Castellano et al, 2003). La localisation des TRPC suggère un rôle pour ces candidats SOCCs au niveau de la mobilité, bien qu'aucune démonstration n'ait encore été faite. Cependant, le rôle de TRPC 2 dans l'entrée soutenue de  $Ca^{2+}$  lors de la réaction acrosomique induite par la zone pellucide chez les spermatozoïdes de souris a été démontré par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique (Jungnickel et al, 2001). TRPC 1 et 5 pourraient également jouer un rôle dans la réaction acrosomique (Sutton et al, 2004).

### **5.3. CatSper**

Récemment, une nouvelle famille de canaux calciques exclusivement exprimée dans les spermatozoïdes a été identifiée, la famille CatSper (Cation channel of sperm). Quatre sous-unités de la famille ont été identifiées : CatSper1 (Ren et al, 2001); CatSper2 (Quill et al, 2001) et CatSper3 et 4 (Lobley et al, 2003). Les quatre membres de la famille sont

presqu'exclusivement exprimés dans le testicule. L'expression des CatSper a d'abord été observée au niveau des spermatides rondes dans le testicule de souris (Nikpoor et al, 2004 ; Ren et al, 2001). Dans les spermatozoïdes matures, la protéine CatSper 2 est localisée au niveau du flagelle et CatSper 1 au niveau de la pièce principale du flagelle. Cette localisation au niveau du flagelle suggère un rôle important des CatSper dans la mobilité, ce qui concorde avec les résultats d'une étude chez les spermatozoïdes humains qui montrent une diminution de la mobilité chez les sujets qui expriment faiblement CatSper (Nikpoor et al, 2004). De plus, les spermatozoïdes d'un knockout de CatSper 1 chez la souris sont submobiles et infertiles (Ren et al, 2001).

#### **5.4. Échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$**

Les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , par leur modulation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , ont un rôle très important dans l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  (Blaustein et al, 1999). Ils sont divisés en deux grandes familles : les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) et les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  dépendants du  $\text{K}^+$  (NCKX). Ces deux types d'échangeurs peuvent fonctionner de façon bidirectionnelle. Cependant, lorsque la concentration extracellulaire est élevée en  $\text{Na}^+$ , les NCX échangent trois ions extracellulaires de  $\text{Na}^+$  contre un ion intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ . De la même façon, lorsque les concentrations en  $\text{Na}^+$  extracellulaire et en  $\text{K}^+$  intracellulaire sont élevées, les NCKX échangent quatre ions extracellulaires de  $\text{Na}^+$  contre un ion intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  et un ion intracellulaire de  $\text{K}^+$ . Ceci permet de maintenir la concentration intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$  à des niveaux plus bas. La direction de l'échange peut être inversée soit par dépolarisation de la membrane cellulaire, soit en enlevant le  $\text{Na}^+$  extracellulaire (Philipson et al, 2000). Chez les mammifères, il y a trois membres des NCX (NCX1-3) et six membres des NCKX (NCKX1-6) (Lytton, 2007).

Plusieurs études démontrent la présence de NCX ou NCKX dans le système reproducteur mâle de différentes espèces. Dans les spermatozoïdes de rat, une activité NCX a été démontrée dans des extraits de membranes plasmiques du flagelle (Bradley et al, 1980). Chez les spermatozoïdes d'oursin, le NCKX est localisé au niveau de la membrane plasmique du flagelle et de la mitochondrie (Su et al, 2002). Chez l'humain, NCX est localisé au niveau de l'acrosome, de la pièce intermédiaire et de la région du cou du spermatozoïde, ce qui suggère des rôles de cet échangeur dans les processus de mobilité, de capacitation et de réaction acrosomique (Krasznai et al, 2006).

#### **5.5. Les $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases**

A l'inverse de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases peut transporter le calcium contre son gradient électrochimique en hydrolysant de l'ATP. Elle va utiliser l'ATP comme énergie, et l'hydrolyse de l'ATP comme énergie pour transporter un ion calcium de l'intérieur vers l'extérieur. Les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases comprennent trois familles : les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de la membrane plasmique (4 protéines : *PMCA 1-4* ou *ATP2B 1-4*): qui font transiter le  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire (Carafoli, 1994 ; Greb et al, 1989 ; Strehler et al, 1990): les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases du réticulum endoplasmique/sarcoplasmique (3 protéines : *SERCA 1-3* ou *ATP2A 1-3*) (Brandi et al, 1987 ; Burk et al, 1989 ; Gunteski-Hamblin et al, 1988 ; Lytton et al, 1988 ; MacLennan et al., 1985): et une  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la voie sécrétrice (*SPCA* ou *PMRI* ou *ATP2C1*) (Gunteski-Hamblin et al, 1992 ; Shull et al, 2003 ; Ton et al, 2002 ; Van Baelen et al, 2003).

Au niveau de la membrane plasmique, les PMCA pompent le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique vers le milieu extracellulaire à l'aide de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de type PMCA sont aussi appelées  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases dépendantes de la calmoduline puisque leur activation nécessite la liaison de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM à leur extrémité C terminale (Carafoli, 1994). Dans les spermatozoïdes souris, une activité  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPases a été mesurée et cette activité augmente en présence de CaM (Adeoya-Osiguwa et al, 1996). Cette activité a été en particulier attribuée à PMCA4 (Schuh et al, 2004). PMCA 4 se localise au niveau de la pièce principale du flagelle, ce qui suggère un rôle dans la mobilité du spermatozoïde. La présence et l'activité de PMCA ont aussi été retrouvées dans les flagelles des spermatozoïdes bovins (Triphan et al, 2007). Une PMCA est aussi retrouvée au niveau de la tête des spermatozoïdes de l'oursin de mer (Gunaratne et al, 2006a) et son rôle semble aussi être relié à la mobilité, puisqu'en utilisant un inhibiteur spécifique des PMCA le carboxyeosin (CE): la mobilité des spermatozoïdes est inhibée.

Les SERCA sont situées au niveau du RE et elles permettent de pomper le  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur du RE en utilisant également l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Ces pompes ont une faible capacité de pompage, mais possèdent une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , permettant de maintenir le niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  relativement bas. Dans les spermatozoïdes, des activités ATPases sont présentes sur la membrane externe de l'acrosome de quelques espèces de mammifères (Breitbart et al, 1984 ; Gordon, 1973 ; Gordon et al, 1978).

La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de type SPCA a été retrouvée dans les spermatozoïdes humains et d'oursins (Gunaratne et al, 2006c ; Harper et al, 2005). SPCA est localisée dans la région du cou, possiblement au niveau de l'espace nucléaire postérieur (RNE) et au niveau de la pièce

intermédiaire du spermatozoïde humain (Ho et al, 2001 ; Ho et al, 2003). Chez l'oursin, SPCA est localisée au niveau de la mitochondrie géante qui forme la pièce intermédiaire du flagelle dans cette espèce et pourrait servir de réservoir de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## **5.6. Protéines liant le $\text{Ca}^{2+}$**

Bien que la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire libre soit principalement modulée par les différents canaux calciques, il existe plusieurs protéines qui lient le  $\text{Ca}^{2+}$ . D'ailleurs, les voies de signalisation dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  sont souvent médiées par des protéines qui détectent ou sont sensibles aux  $[\text{Ca-Ca}^{2+}]_i$  (Carafoli, 1994). La transduction de signal dépend du changement conformationnel spécifique et  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant de ces protéines, ce qui permet l'ouverture des sites de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$ . Une des grandes familles de protéines liants le  $\text{Ca}^{2+}$  est la calmoduline (CaM). Cette famille peut moduler différentes voies de signalisation.

La CaM est retrouvée dans la tête et le flagelle des spermatozoïdes de plusieurs espèces (Tash et Means, 1987 ; Tash et al, 1988): ce qui suggère que la CaM puisse jouer un rôle dans les fonctions des gamètes. La CaM inhiberait également la réaction acrosomique induite par la zone pellucide ou la progestérone chez les spermatozoïdes humains (D'après Yunes et al, 2002). À l'opposé, il a été montré que la CaM pouvait avoir des effets positifs sur la capacitation et la réaction acrosomique (Bendahmane et al, 2001 ; Feng et al, 2007 ; Li et al, 1996). Yunes et al, 2002 suggèrent que ces observations divergentes démontrent que la CaM aurait des effets multiples reliés à la réaction acrosomique. D'autre part, la CaM modulerait positivement la mobilité des spermatozoïdes de plusieurs espèces (Ahmad et al, 1995 ; Si et al, 2000 ; White et al, 1989). Des études plus récentes démontrent que la voie  $\text{Ca}^{2+}$  /CaM/CaMK est impliquée dans la mobilité des spermatozoïdes bovins et murins (Ignotz et al, 2005 ; Schlingmann et al, 2007). Cependant, son implication dans les spermatozoïdes d'oiseaux est inconnue.

## **5.7. Les récepteurs inositol 1, 4, 5-triphosphates (IP3R)**

Les canaux calciques inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP3) sensibles, aussi appelés récepteurs IP3 ou IP3R, ont été étudiés dans divers types cellulaires incluant les spermatozoïdes (Vermassen et al, 2004). L'IP3R est l'élément central dans la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  car il est directement responsable de la relâche calcique intracellulaire. Trois isoformes d'IP3R qui ont été identifiées chez les mammifères, IP3R 1-3. Une perte du signal spécifique d'IP3R au niveau de l'acrosome peut être observée suite à l'induction de la réaction acrosomique confirmant la localisation d'IP3R au niveau de la membrane externe de

l'acrosome (Kuroda et al, 1999). Chez l'humain, IP3R1 est localisée sur la partie antérieure de l'acrosome comme chez le bovin (Ho et al, 2003). De plus, les IP3R sont aussi retrouvées à la jonction de la tête et du flagelle chez les spermatozoïdes bovins (Ho et al, 2003). Cette région du cou est aussi marquée par un anticorps spécifique pour IP3R1 chez les spermatozoïdes humains (NaabyHansen et al, 2001). Également dans les spermatozoïdes humains, IP3R3 est détectée dans la région postérieure de la tête, au niveau de la pièce intermédiaire et dans une portion du flagelle, alors qu'IP3R2 n'est pas détectable (Kuroda et al, 1999). L'utilisation d'un activateur d'IP3R, le thimerosal, provoque la réaction de l'acrosome des spermatozoïdes murins suggérant que la libération du  $Ca^{2+}$  des réservoirs intracellulaire via IP3R est une étape importante dans le processus de réaction acrosomique dans les spermatozoïdes de mammifères (Herrick et al., 2005).

### **5.8. Les récepteurs ryanodine (RYR)**

Les récepteurs ryanodine (RYR) font aussi partie des canaux permettant la relargage du  $Ca^{2+}$  des réservoirs intracellulaire et ont d'abord été caractérisés dans le processus de Calcium-induced calcium release (CICR) (Berridge et al, 2003). La ryanodine est un alcaloïde neutre d'origine végétale, inhibiteur de ce canal. Ce canal permet également le relâchement de calcium du réticulum endoplasmique vers l'intérieur de la cellule. Il peut être activé directement par une interaction mécanique avec un canal sensible aux Dihydropyridines de la membrane plasmique (Marty et al, 1994): par le calcium ou encore par la caféine. En revanche, il est inhibé par la ryanodine, le Magnésium et le rouge de ruthénium. Trois différents isoformes différentes du RYR ont été identifiés : RYR1, RYR2 et RYR3. Dans le système reproducteur mâle, la présence de RYR1 et 3, mais pas de RYR2, a été démontrée au niveau des cellules germinales, principalement aux stades de spermatocytes et de spermatides dans le testicule de souris (Chiarella et al, 2004 ; Trevino et al, 1998). De plus, l'équipe de Trevino et al. (1998) a seulement détectée RYR3 au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes murins. Cependant, le signal de RYR3 est présent dans les spermatozoïdes dont l'acrosome est intact et qui ont accompli la réaction acrosomique, suggérant que RYR3 n'est pas associé la membrane externe de l'acrosome (Trevino et al, 1998). Dans les spermatozoïdes humains, le marquage à l'aide d'un analogue de la ryanodine couplé à un agent fluorescent se fait majoritairement au niveau de la pièce intermédiaire avec un signal faible dans l'acrosome (Harper et al, 2004).

## **Objectifs de la thèse**

## Objectifs de la thèse

Le métabolisme énergétique est un acteur important de la fertilité d'un individu. Les spermatozoïdes, cellules germinales très spécialisées, ont besoin d'une grande quantité d'ATP pour assurer la mobilité et la capacité de fécondation. Cela est particulièrement important dans le cas d'une conservation *in vitro* au cours de laquelle les spermatozoïdes subissent de nombreux stress (thermiques, osmotiques, oxydatifs) qui altèrent leurs capacités énergétiques. Etudier les protéines senseurs des voies de signalisation impliquées dans le métabolisme cellulaire, notamment en se concentrant sur des molécules spécifiques des voies de signalisation du métabolisme énergétique peut permettre de lever des verrous limitant les capacités des gamètes à être conservées.

L'AMPK est une kinase très conservée chez les eucaryotes, qui est sensible à de nombreux stimuli biologiques lui permettant de jouer le rôle de senseur énergétique. Elle possède un rôle de régulateur dynamique de la gestion de l'énergie en modulant de nombreuses voies métaboliques aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organisme entier (Carling, 2004). Dans ce cadre, les objectifs de cette thèse de doctorat sont de caractériser et de décrire des éléments clés appartenant à la voie de signalisation énergétique de l'AMPK, de comprendre leur implication dans la gestion de l'énergie dans les spermatozoïdes de coq et d'explorer comment leurs modulateurs peuvent impacter les fonctions des gamètes conservés *in vitro*.

➤ Notre première partie détermine le rôle de l'AMPK sur les fonctions biologiques (mobilité, viabilité, et réalisation de la réaction acrosomique) des spermatozoïdes de coq incubés *in vitro*. Cette première partie se déroule en deux phases. Dans un premier temps, nous utilisons des modulateurs de l'AMPK (activateurs : Metformine , AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside ; inhibiteur : Compound.C) pour agir directement sur les spermatozoïdes de coq éjaculés et incubés à 35°C *in vitro* pour évaluer l'influence de l'AMPK sur la qualité des spermatozoïdes frais. Dans un deuxième temps, nous avons localisé l'AMPK dans les spermatozoïdes par immunofluorescence et évalué le degré et les variations de phosphorylation de l'AMPK par western blot.

➤ Notre deuxième partie consiste à rechercher si la régulation de l'AMPK peut avoir un rôle dans le succès de la cryopréservation des gamètes. Pour le découvrir, nous avons continué à examiner quantitativement la phosphorylation de cette protéine et son influence sur

les fonctions des spermatozoïdes congelés en cryopréservant ces derniers en présence de différents régulateurs pharmacologiques. Nous avons comparé la qualité des spermatozoïdes avant et après cryopréservation. Nous avons également examiné le rôle de l'AMPK sur la peroxydation, les principales enzymes antioxydantes et différents indicateurs métaboliques (ATP, lactate, citrate) dans les spermatozoïdes congelés et décongelés.

➤ La dernière partie visait à étudier la régulation de la voie de signalisation de l'AMPK par des kinases (CaMKKs et CaMKI) liés aux voies de signalisation calciques et leur lien avec les fonctions biologiques des spermatozoïdes. Cette signalisation implique l'activation et la régulation de canaux calciques (deux canaux de type L et R dépendant des variations de potentiel, un canal « Store Operated Channels » (SOC)). Nous avons localisé les protéines d'intérêt (CaMKKs et le substrat CaMKI) dans les spermatozoïdes par immunofluorescence et nous avons ensuite vérifié l'effet d'un inhibiteur de CaMKK STO-609 sur la phosphorylation de l'AMPK et de CaMKI et aussi sur les fonctions biologiques des spermatozoïdes en présence ou absence de calcium extracellulaire. Enfin, nous avons testé l'influence de l'inhibition des différents canaux calciques sur l'activation de l'AMPK par CaMKK et sur la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes.

En conclusion : Ces travaux permettent d'identifier le rôle de différents acteurs de signalisation liés au métabolisme énergétique et aux flux calciques sur les fonctions cellulaires des spermatozoïdes. Ils permettent également d'évaluer si ces protéines sont altérées par la cryopréservation cellulaire, quels dysfonctionnements métaboliques peuvent y être associés et comment ils peuvent être contrecarrés. Ces résultats pourront mener à modifier les protocoles de cryopréservation pour mieux prendre en compte ces nouveaux facteurs.

## **Résultats expérimentaux**

## **Chapitre I**

# **L'AMPK joue un rôle dans le métabolisme énergétique des spermatozoïdes et dans la régulation des fonctions des spermatozoïdes**

## **Chapitre I : L'AMPK joue un rôle dans le métabolisme énergétique des spermatozoïdes et dans la régulation des fonctions des spermatozoïdes liées au pouvoir fécondant**

La capacité des spermatozoïdes à féconder l'ovocyte dépend de processus d'énergie cellulaire très sensibles. Cette énergie est fournie sous la forme d'ATP, synthétisé par la glycolyse dans le cytoplasme ou par la phosphorylation oxydative dans les mitochondries. L'AMPK (5'-AMP activated protein kinase) est un senseur du rapport ATP/AMP et intervient dans les régulations du métabolisme des glucoses, des lipides et des protéines. Lorsque l'AMPK est activée, elle stimule les voies cataboliques qui produisent l'ATP et inhibe les voies anaboliques qui consomment l'ATP pour rétablir l'équilibre énergétique de la cellule. Le but de cette étude est d'examiner le rôle de la protéine senseur (AMPK) dans le métabolisme des spermatozoïdes d'oiseaux.

Dans cette étude, nous avons posé l'hypothèse que l'AMPK joue un rôle important dans le métabolisme énergétique des spermatozoïdes d'oiseaux et affecte leur qualité dans des conditions *in vitro*.

Au cours des premières expériences, les spermatozoïdes ont été dilués dans un milieu composé de BPSE modifié (dilueur utilisé pour la conservation de la semence aviaire) et incubés à 35°C en présence ou en absence de doses croissantes d'activateurs (Metformine, AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside) ou d'inhibiteur (Compound C) de l'AMPK.

Nous avons ensuite évalué les effets des modulateurs sur la mobilité des spermatozoïdes, mesurée par l'analyse automatisée de mobilité assistée par ordinateur (CASA, IVOS Hamilton Thorne) selon la méthode décrite par Blesbois et al (2008): et fait de même pour la viabilité en utilisant l'association de 2 fluorochromes : l'iodure de propidium (IP) et le Sybr14 (Chalah et Brillard, 1998). L'aptitude à la réaction acrosomique a été évaluée après marquage des acrosomes des spermatozoïdes à la PNA-FITC (Fluorescein Isothiocyanate – PeaNut Agglutinin) selon la méthode de Horrocks et al (2000): par incubation des spermatozoïdes 5min à 41°C dans du NaCl-TES (Standard medium) contenant 5mM de Ca<sup>2+</sup> et 50µl de membrane périvitelline interne (MPVI) soniquée.

Nous nous sommes également intéressés à la spécificité de leurs effets sur des indicateurs des métabolismes énergétiques (concentration de lactate et d'ATP).

Nous avons également mesuré l'expression de la protéine AMPK dans les spermatozoïdes par immunofluorescence indirecte et son degré de phosphorylation par western blot.

Ce travail est présenté sous forme d'article : « Central Role of 5'-AMP-Activated Protein Kinase in Chicken Sperm Functions » paru dans *Biology of Reproduction*, 2014, **91** : 121, 1-15.

## Central Role of 5'-AMP-Activated Protein Kinase in Chicken Sperm Functions<sup>1</sup>

Thi Mong Diep Nguyen,<sup>3,5</sup> Sabine Alves,<sup>3</sup> Isabelle Grasseau,<sup>3</sup> Sonia Métayer-Coustard,<sup>4</sup> Christophe Praud,<sup>4</sup> Pascal Froment,<sup>3</sup> and Elisabeth Blesbois<sup>2,3</sup>

<sup>3</sup>INRA, Unité Mixte de Recherche de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France

<sup>4</sup>INRA, Unité de Recherches Avicoles, Nouzilly, France

<sup>5</sup>Université François Rabelais, Tours, France

### ABSTRACT

Avian gametes present specific features related to their internal long-term mode of fertilization. Among other central actors of energetic metabolism control, it has been suspected that 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) influences sperm functions and thus plays a key role in fertilization success. In the present work, we studied AMPK localization and function in chicken sperm incubated *in vitro*. Effects of the pharmacological AMPK activators (AICAR, metformin) and the AMPK inhibitor compound C were assessed by evaluating AMPK $\alpha$  (Thr<sup>172</sup>) phosphorylation (by Western blotting), semen quality (by viability, motility, and ability to perform acrosome reaction), and energetic metabolism indicators (lactate, ATP). Localization of AMPK in subcellular sperm compartments was evaluated by immunocytochemistry. Total AMPK was found in all compartments except for the nucleus, but the phosphorylated form phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK was essentially localized in the flagellum and acrosome. AMPK activators significantly improved AMPK phosphorylation, sperm motility (increased by 40% motile, 90% progressive, and 60% rapid sperm), acrosome reaction and lactate production (increased by 40%) and viability. The AMPK inhibitor significantly reduced AMPK phosphorylation and percentages of motility (decrease by 25%), progressive energy (decrease by 35%), and rapid sperm (decrease by 30%), acrosome reaction, lactate production, and ATP release. The two activators differed in their effect on ATP concentration: AICAR stimulated ATP formation, whereas metformin did not. Our results indicate that AMPK plays a key role in the regulation of chicken sperm functions and metabolism. This action differs from that suggested in mammals, mainly by its crucial involvement in the acrosome reaction process.

*5'-AMP-activated protein kinase, acrosome reaction, AMPK, chicken sperm, motility, signaling pathways*

### INTRODUCTION

Sperm are highly specialized cells which require high ATP as energy source to ensure motility and fertilizing ability. Avian gametes present specific features related to their very

complex system of internal fertilization [1–3] and to the adaptation of flying animals to a wide geographical distribution. Unlike mammal sperm, chicken sperm acquire their motility [4] and part of their fertilizing ability as soon as they leave the testis [5]. Their fertilizing ability further increases in the epididymis [6]. As in other amniote species, the head of the avian sperm contains mainly condensed paternal genetic DNA and acrosome proteins intended to interact with the oocyte. Acrosome reaction is required to achieve fertilization. The intermediate piece contains approximately 30 mitochondria in the chicken, involved mainly in the energy supply for flagellum movement. The flagellum, which is very long in chicken sperm (90  $\mu$ m), allows the sperm to reach the storage tubules of the uterovaginal junction, where they may stay for weeks before reaching the fertilization site in the infundibulum. These biological features imply a central role of energetic metabolism, so that sperm fertilizing ability is preserved during the long period of time of its residence in the avian female genital tract (up to 3 weeks).

5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is a serine/threonine protein kinase that is a sensor of energy metabolism in the cells. AMPK activation stimulates catabolic pathways that produce ATP and simultaneously inhibit ATP-consuming anabolic pathways, thus adjusting cellular energy balance [7, 8]. AMPK is a heterotrimeric enzyme with an  $\alpha$  catalytic subunit and 2 regulatory subunits,  $\beta$  and  $\gamma$  [9–10]. Seven isoforms ( $\alpha$  1,  $\alpha$  2,  $\beta$  1,  $\beta$  2,  $\gamma$  1,  $\gamma$  2, and  $\gamma$  3) are encoded by different genes [11]. AMPK is activated when the AMP:ATP ratio is high and is phosphorylated by the upstream kinases such as liver kinase B1 (LKB1, also known as serine/threonine kinase 11 [STK11]) [12], calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase  $\beta$  (CaMKK $\beta$ ) [13], and GF- $\beta$ -activated kinase (TAK1) [14] at Thr<sup>172</sup> on its  $\alpha$ -subunit. AMPK can also be activated by pharmacological modulators, for example, activators such as 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) and metformin (MET; 1,1-dimethylbiguanide hydrochloride), and inhibitors such as compound C (CC; 6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)-phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo [1, 5-a] pyrimidine).

In 2001, Zhou et al. [15] demonstrated for the first time that MET might be acting through AMPK [15]. Moreover, MET does not directly activate AMPK but inhibits complex I of the mitochondrial respiratory chain, suggesting an indirect activation of AMPK by increasing the intracellular AMP:ATP ratio [16]. MET improves insulin signaling pathways and consequently glucose and lipid metabolism [17, 18]. In reproduction, MET increases AMPK phosphorylation in granulosa cells of bovine and rat ovaries [19, 20] and lactate production in human granulosa cells [21] and in rat Sertoli cells [22]. MET also improves the motility of boar and frozen-thawed mice sperm [23, 24].

Unlike MET, AICAR is a direct activator of AMPK. In the cell, AICAR is rapidly phosphorylated into an AMP analog, 5-

<sup>1</sup>This work was supported by grants from the Vietnamese government, the INRA (National Institute of Agronomic Research), the French National Agency of Research (ANR Cryobirds), and the CRB-Anim French National Research Infrastructure.

<sup>2</sup>Correspondence: Elisabeth Blesbois, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA-UMR85, CNRS-UMR6175, F. Rabelais University, IFCE, 37380 Nouzilly, France.

E-mail: Elisabeth.Blesbois@tours.inra.fr

Received: 27 May 2014.

First decision: 17 June 2014.

Accepted: 1 October 2014.

© 2014 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

eISSN: 1529-7268 <http://www.biolreprod.org>

ISSN: 0006-3363

aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (ZMP), that activates AMPK by mimicking the effects of AMP on the kinase [25, 26]. In rat skeletal muscles, AICAR stimulates glucose uptake and the oxidation of fatty acids [27], whereas in the liver, this compound inhibits gluconeogenesis (PEPCK and G6Pase) [28]. In gonads, AICAR stimulates lactate production in rat Sertoli cells by increasing phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK, and it increases AMPK $\alpha$ 1 phosphorylation in rat granulosa cells [29–30].

Compound C has been studied extensively as an inhibitor of AMPK [31]. It is a selective AMPK competitive inhibitor at ATP-binding sites [32]. It may also block uptake by the cells [33]. In addition, CC reduces fatty acid oxidation and glucose transport in rat muscle and hepatic gluconeogenesis [15] and stimulates insulin release by reducing AMPK phosphorylation [34]. CC significantly decreases motility parameters of boar sperm [35].

The role of AMPK in male avian gametes remains largely unknown. The present study aimed at better understanding its role in chicken sperm functions. We localized and quantified total AMPK and its phosphorylated form at Thr<sup>172</sup> in chicken sperm and examined the effects of the AMPK activators AICAR and MET and inhibitor CC on sperm functions (viability, motility, and ability to accomplish acrosome reaction) and on energy metabolism (lactate and ATP).

Study of the role of AMPK in male gametes should provide new ways to increase semen quality, especially when sperm are subjected to biotechnological methodologies such as cryopreservation.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and Reagents

All chemicals used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) unless otherwise noted. CC, AICAR, and MET were obtained from Calbiochem (Billerica, MA). A stock solution of CC was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO), and stock solutions of MET and AICAR were prepared in deionized water. Complete mini-EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets were from Roche Diagnostics. Tris/glycine buffer (10 $\times$ ), Tris/glycine/SDS buffer (10 $\times$ ), and Precision Plus protein All Blue Standards (catalog no. 161-0373) were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA) and anti-AMPK $\alpha$  from Millipore (Billerica, MA); anti-phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  and anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) horseradish-peroxidase (HRP)-linked antibodies from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). PI/Sybr-14 (live/dead sperm viability kit) was purchased from Molecular Probes (Saint Aubin, France).

### Animals and Semen Collection

Animal breeding and experiments were conducted with respect to animal welfare and followed the welfare European regulation. All procedures were performed in accordance with the agreement of the French Direction of Veterinary Services and were authorized and registered with the competent French authority in compliance with the requirements of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (28 August 2012, C37-175-1). Experiments were thus conducted in accordance with the SSR's specific guidelines.

Animals were 22- to 55-week-old adult chickens of the D<sup>+</sup> line [36]. Semen was collected by dorsoabdominal massage [37] and was centrifuged for 10 minutes at 600g at 20°C [38, 39]. Sperm pellets were resuspended in Beltsville poultry semen extender (BPSE) [40] at a final sperm concentration of 500  $\times$  10<sup>6</sup> cells/ml as measured by optical density absorption with a spectrophotometer (IMV, L'Aigle, France) at 530 nm. BPSE buffer contained 2 mM potassium citrate, 45 mM sodium glutamate, 1.7 mM magnesium chloride, 55 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16 mM N-Tris-[hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethanesulfonic acid [TES], 32 mM sodium acetate, and 5g/L glucose; pH 7.3 and osmolality 350 mOsmol/kg.

### Sperm Incubation with Modulators of AMPK

The AMPK modulators, either the inhibitors (CC and adenine 9- $\beta$ -D-arabinofuranoside [ARA-A]) or activators (AICAR and MET) were tested. Because the effects of ARA-A on sperm quality were very similar to those of CC, only the effects of CC were fully studied in the present work.

We chose to work at 35°C, although chicken body temperature is 41°C, because sperm motility is reduced at 40°C and above and is known to be higher at slightly lower temperatures [41, 42]. In addition, viability and RA decreased very quickly at 41°C (Fig. 1). Regarding the time factor, we tested durations from 10 to 90 min, and we found that incubations up to 40 min were best to retain normal sperm quality (significant alterations were observed at longer incubations) (Fig. 1).

Thus, sperm samples were incubated at 35°C in the presence or absence of 1–10  $\mu$ M CC, 0.2–10 mM AICAR, and 0.5–5 mM MET or in solvents alone (DMSO for CC and deionized water for MET and AICAR). In one experiment, cells were pretreated with AICAR for 15 min before exposure to CC. The most efficient concentrations for sperm quality (viability, motility parameters, and acrosome reaction) were 5  $\mu$ M for CC, 1 mM for MET, and 2 mM for AICAR, as shown in Supplemental Figs. S1–S9 (available online at [www.biolreprod.org](http://www.biolreprod.org)). These doses were thus used to obtain the results presented in the present study.

### Western Blotting

For Western blotting experiments, total proteins were extracted from chicken sperm in lysis buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 100 mM sodium pyrophosphate, 4 mM sodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, and 0.5% NP-40 IGEPAL containing a protease inhibitor cocktail with EDTA). Cell lysates were centrifuged at 12000g for 30 min at 4°C, and protein concentration in each supernatant was determined by a colorimetric assay (DC protein assay; Bio-Rad). The proteins were then separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (Whatman Protran; Dassel, Germany). Afterward, the membranes were incubated in anti-phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  (62 kDa) or in anti-total AMPK $\alpha$  (62 kDa) diluted in 5% bovine serum albumin in TBS-Tween 0.1% (1:1000 final dilution) overnight at 4°C. Finally, the membranes were further incubated for 1 h in HRP-conjugated secondary goat anti-rabbit antibody (1:2000 final dilution). The intensity of bands in the signal was analyzed using Odyssey software, version 1.2 (Licor Biosciences, Lincoln, NE).

### Immunocytochemistry

Total AMPK $\alpha$  and phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  were localized in chicken sperm by immunocytochemistry. Sperm cells at 500  $\times$  10<sup>6</sup> cells/ml were fixed in paraformaldehyde (4%) for 4 min, spread onto a poly-L-lysine slide, and then air-dried at room temperature. Afterward, sperm cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS; 3 times for 3 min each) and then permeabilized for 10 min with 0.35% Triton X-100 in PBS. Nonspecific binding was blocked with PBS supplemented with 10% goat serum (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature. Samples were then incubated overnight at 4°C with anti-AMPK $\alpha$  or anti-phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  diluted 1:50 in PBS-1% goat serum, rinsed (3 times for 3 min each) with PBS, and then incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L; Southern Biotech; Birmingham, AL) (1:100 dilution in PBS-1% goat serum) for 1 h at 4°C. Then, sperm cells were washed (3 times for 3 min each) with PBS and incubated with Cy2-streptavidin (1:200 dilution in PBS; Southern Biotech) for 45 min at room temperature in the dark, rinsed (3 times for 3 min each) with PBS, and incubated with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.05  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) for 10 min. The presence of total AMPK $\alpha$  and phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  in sperm was examined by fluorescence microscopy (Axioplan 2; Zeiss Gruppe, Jena, Germany). Negative control immunostaining was also performed at the same time by omitting the primary antibody.

We measured the amount of fluorescence (corrected total cell fluorescence [CTCF] in arbitrary units) of phospho-AMPK-positive cells by using ImageJ software (version 1.41; National Institutes of Health, Bethesda, MD). A regional quantitation of the signal was drawn around each cell to be measured. The same region in an area without fluorescent cells was used for background subtraction. CTCF was calculated as integrated density – [area of selected cell  $\times$  mean fluorescence of background readings]. All experiments were performed at least four times.

### Sperm Viability Assessment

Sperm were diluted in Lake 7.1 buffer [43] down to 20  $\times$  10<sup>6</sup> cells/ml, 5  $\mu$ l of Sybr-14 was added, and then the solution was incubated for 10 min in

## AMPK IN CHICKEN SPERM FUNCTIONS

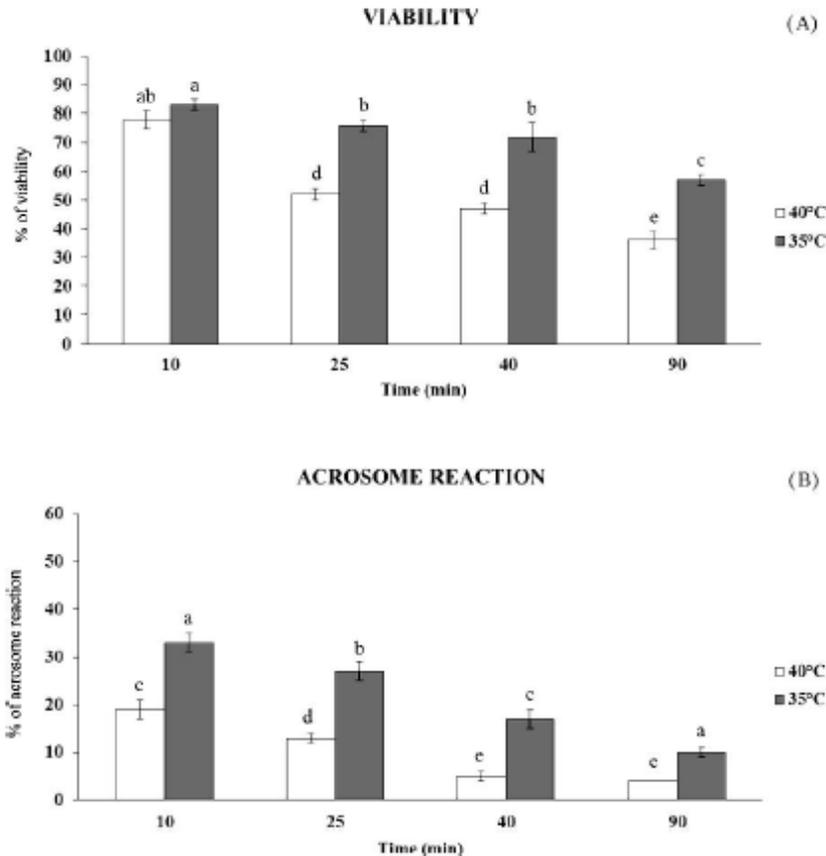


FIG. 1. Effect of temperature (35°C and 41°C) on sperm viability and acrosome reaction. Sperm were incubated at 35°C and 41°C for 90 min. Viability (A) and acrosome reaction (B) decreased much faster at the chicken body temperature of 41°C than at 35°C. A) The experiment was performed four times; Values (%) are means  $\pm$  SEM. Different superscript letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.001$ ) of viability between the two temperatures. There was a significant decrease of sperm viability with time ( $P < 0.001$ ). B) Different superscript letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.001$ ) of sperm acrosome reaction between the two temperatures. There was a significant decrease of sperm acrosome reaction with time ( $P < 0.001$ ).

darkness at 4°C. Afterward, 2  $\mu$ l of propidium iodide (PI) was added, and the incubation was continued for 5 min in the dark at 4°C. After incubation, sperm cell viability was assessed by fluorescence microscopy (Axioplan 2; Zeiss): living cells appeared green and dead ones red. A total of 600 sperm were counted per replicate (10 replicates per treatment). All preparations were analyzed by the same observer.

### Analysis of Sperm Motility by Computer-Assisted Sperm Analysis System

Sperm motility parameters were evaluated by computer-assisted sperm analysis (CASA;IVOS model motility analyzer; Hamilton Thorne, Beverly, MA) [44]. In this experiment, the parameters measured were percentage of motile sperm (%), curvilinear velocity (VCL, in  $\mu$ m/sec), path velocity (VAP, in  $\mu$ m/sec), progressive velocity (VSL, in  $\mu$ m/sec), straightness (STR, in %; e.g.,  $STR = VSL/VAP \times 100$ ), linearity (LIN, in %;  $LIN = VSL/VCL \times 100$ ), rapid cells (percentage of motile sperm with  $VAP > 50 \mu$ m/sec, in %), and progressive sperm (rapid sperm-to-straightness ratio of  $>75\%$  [in %]).

### Acrosome Reaction Assessment with FITC-PNA

After AMPK modulator treatment, completion of the acrosome reaction was detected by fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) binding [45]. Sperm cells were incubated at 41°C with 50  $\mu$ l of the inner perivitelline layer and 500  $\mu$ l of NaCl-TEES containing 5 mM  $Ca^{2+}$

for 5 min. Samples were then centrifuged at 400g for 5 min, and pellets were resuspended in 100  $\mu$ l of NaCl-TEES. FITC-PNA was then added (1 mg/ml), and sperm were incubated for 10 min in the dark at 4°C, washed in 440  $\mu$ l of NaCl-TEES, and centrifuged at 400g for 5 min. The pellets were resuspended in 200  $\mu$ l of NaCl-TEES for analysis. The sperm that completed their acrosome reactions were observed under fluorescence microscopy (Axioplan 2; Zeiss). A minimum of 100 sperm for each treatment from 10 replicates per treatment were examined, and sperm that had undergone acrosome reaction were characterized by green fluorescence of their acrosomal region [38, 39]. All preparations were analyzed by a single observer.

### Measurement of ATP Concentration

After incubation of sperm with or without AMPK modulators, ATP concentration was measured using the Cell-Titer-Glo assay (Promega, Madison, WI). Standards were prepared from ATP standard (Promega) using serial dilutions to obtain concentrations of  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-11}$ , and  $1 \times 10^{-12}$  M. Briefly, the assay buffer and substrate were equilibrated to room temperature, and the buffer was transferred with the substrate. After 30 min, 50  $\mu$ l of sample was added to 50  $\mu$ l of luciferin/luciferase reagent in 96-well plates while plates and the contents were mixed for 2 min and incubation was continued for 10 min at room temperature. The luminescence at integration  $\times 1000$  (ms) was read using an Ascent Luminoskan luminometer (ThermoScientific, Palm Beach, FL) with BPSE as a blank for each experiment.

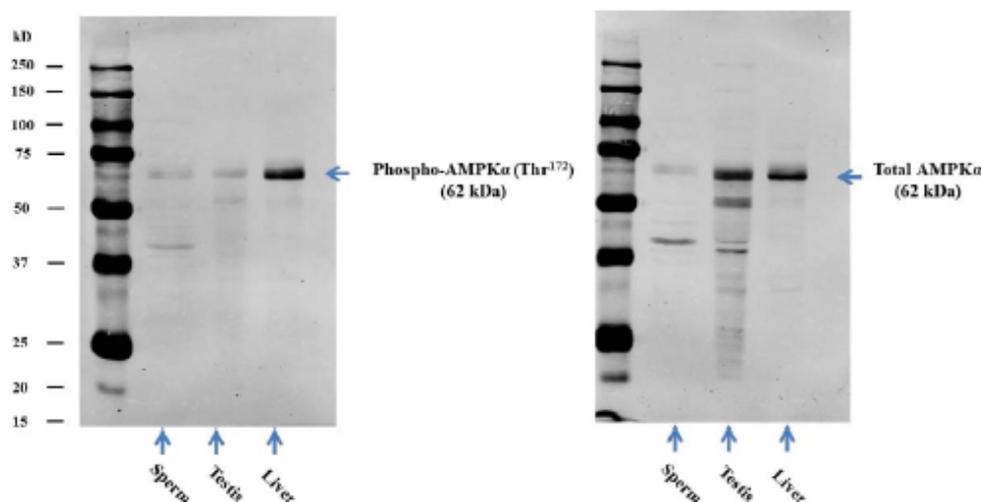


FIG. 2. Identification of AMPK in chicken sperm. Sperm lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and then probed with anti-phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  and anti-AMPK $\alpha$  antibodies. Cell lysates from chicken liver and chicken testis were used as positive controls.

#### Lactate Concentration Measurement

After sperm were incubated in the absence or presence of AMPK modulators, sperm were disrupted by ultrasonic treatment in 0.9% NaCl and centrifuged at 14000g for 10 min. The supernatant was recovered and used to measure lactate concentration by the enzymatic method, measuring the NADH formed consequently to lactate oxidation by LDH as described by Gütman and Wahlefeld [46] by spectrophotometry at 340 nm. We used BPSE as a blank, and a standard curve with increasing concentrations of lactic acid (L[+]) lactic acid was constructed before measurement of test samples.

#### Statistical Analysis

Data are as means  $\pm$  S.E.M. Statistical analysis used Statview (Nesbit, MS) and SPSS version 16.0 (IBM, Armonk, NY). The significance of the differences between treatments was calculated by Student's *t*-test or ANOVA. The level of significance was set at a *P* value of <0.05.

## RESULTS

#### Identification and Localization of AMPK and Phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK in Chicken Sperm

The presence of AMPK and its phosphorylated form, phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK, in chicken sperm was assessed with Western blotting and indirect immunofluorescence using primary antibodies against AMPK $\alpha$  and phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$ .

Western blotting for the catalytic  $\alpha$ -subunit of AMPK in chicken sperm as well as positive controls (chicken liver and testis) revealed a main band with an apparent molecular weight of 62 kDa (both phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  and total AMPK $\alpha$ ) (Fig. 2). A nonspecific band of molecular weight (~40 kDa) was also found in chicken sperm.

Immunofluorescence data (Fig. 3) showed that the total AMPK protein was observed in the acrosomal region and in the midpiece as well as in the entire flagellum (Fig. 3B), but phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK was localized mainly in the flagellum and acrosome regions and at a much lower intensity in the midpiece (Fig. 3F).

#### Modulator Effects on AMPK Phosphorylation and Localization in Chicken Sperm

To assess activation or inhibition of AMPK, Western blot analyses using antibodies against phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  and total AMPK $\alpha$  (as loading control) were performed with chicken sperm in the absence or presence of 2 mM AICAR, 1 mM MET, or 5  $\mu$ M CC.

The amount of Thr<sup>172</sup>-phosphorylated AMPK $\alpha$  was significantly increased in sperm preparations treated with AICAR compared to untreated sperm after 10 min and 25 min of incubation (Fig. 4A) while MET increased phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK levels after 25 and 40 min (Fig. 4B). In contrast, CC reduced phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK levels after 25 min of incubation compared to that of the control (Fig. 4C).

The nonspecific band (~40 kDa) was not affected by the pharmacological modulators. Therefore, we focused on the effects of AMPK modulator treatments on AMPK localization in sperm at 25 min. The staining of phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK protein was more visible in cells treated with the AMPK activators AICAR and MET (Fig. 5, A.c and A.d) and less present in cells treated with the AMPK inhibitor CC (Fig. 5A.b) than in cells treated with vehicle alone as control (Fig. 5A.a). Specifically, in the AMPK activator-treated cells, the staining of phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK in the flagellum was stronger with AICAR (Fig. 5A.h) and MET (Fig. 5A.i) than in the control (Fig. 5A.f), but there was no visible difference in the acrosome. In the presence of CC inhibitor, we found only a faint staining in the flagellum (Fig. 5A.g), and with AICAR, phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK appeared present in the midpiece (Fig. 5A.h).

We also observed that the percentage of positive cells for phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK was significantly increased with the AMPK activators (81% with AICAR and 70% with MET) compared to that of control (Fig. 5B). Conversely, the AMPK inhibitor CC significantly decreased the total number of fluorescent cells by 74% compared to that of the control (Fig. 5B). Fluorescent intensity levels of phospho-AMPK were also significantly reduced by CC and increased by AICAR and MET (Fig. 5C).

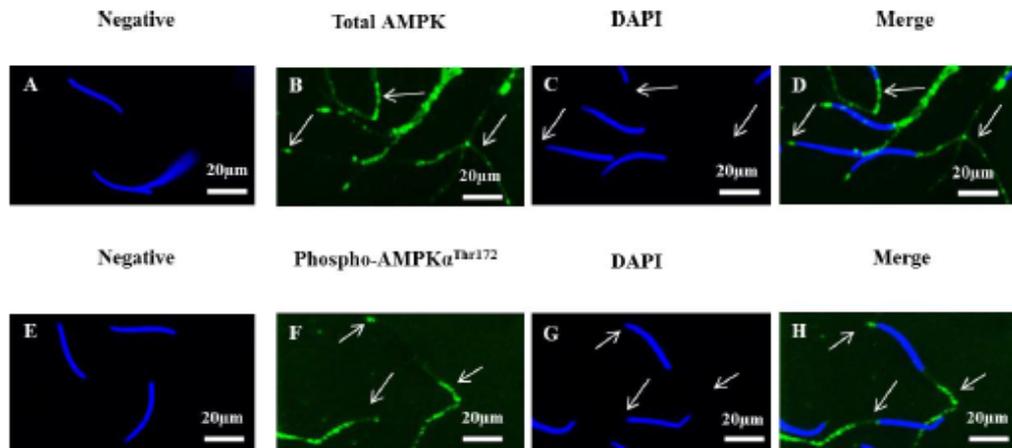


FIG. 3. Immunolocalization of AMPK and phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK in chicken sperm. Sperm cells were incubated for 25 min at 35°C and then used for immunolocalization of AMPK $\alpha$  and phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  (see *Materials and Methods*). Immunofluorescence staining of total AMPK $\alpha$  (B) green or phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  (F) green was conducted in chicken sperm. Nuclei were stained with DAPI (C and G) blue. Merged fluorescence with DAPI staining images are shown (D and H). For negative control, primary antibody was not added (A and E). White arrows indicate regions containing phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK and AMPK immunoreactivity. Bars = 20  $\mu$ m.

*Modulator Effects on Sperm Quality*

**Sperm motility.** AMPK modulators modified sperm motility parameters (% motile, % rapid cells, VAP in  $\mu$ m/sec, VSL in  $\mu$ m/sec, VCL in  $\mu$ m/sec, % STR, and % LIN) (Tables 1–3). The AICAR stimulation affected sperm faster than MET. Most motility parameters were rapidly (after 10 min) and significantly increased with AICAR compared to control (Table 1). The percentage of motile sperm was significantly increased by AICAR at 10 min (mean increase, ~19%) and at 25 min (mean increase, ~38%) compared to that of the control. The motility parameters progressive sperm and rapid sperm percentages were also significantly increased to a maximum at 25 min: up to 98% for progressive sperm and 70% for rapid sperm. Concomitantly, AICAR significantly increased most velocity parameters studied at 10 min, including progressive by 28%, VAP by 16%, and VSL by 15%, and the rest of sperm motility parameters were also significantly increased by 25 min.

The addition of MET did not affect sperm motility parameters after 10 min, but they were all significantly increased compared to those in control at 25 and at 40 min of incubation (Table 2). The percentage of motile sperm was significantly increased at 25 min (~36%) and at 40 min (~47%) compared to the control. The percentage of rapid sperm was significantly increased at 25 min by 67% and at 40 min by 58% compared to that of the control. The percentage of progressive sperm was significantly increased at 25 min by 85% and at 40 min by more than 100%. Moreover, the velocity was significantly increased at 25 min and at 40 min.

Conversely, treatment of chicken sperm with CC significantly decreased motile, rapid cells, progressive, VAP, STR, and LIN at 25 min and 40 min of incubation, whereas VSL and VCL were significantly decreased compared to those of control at 40 min (approximately 24% reduction of the percentage of motile sperm and 34% of the percentage of rapid sperm at 25 min; approximately 26% reduction of the percentage of motile sperm and 27% the percentage of rapid sperm at 40 min; and approximately 35% reduction of the percentage of progressive sperm at 25 and 40 min) (Table 3).

We also observed a significant decrease in motile, rapid, and progressive sperm after 40 min of incubation for the controls as well as for those treated with AICAR or CC. However, with MET, the decrease was significant only for motile sperm after 40 min of incubation. We also observed a significant decrease of VCL and STR with CC at this time of incubation.

**Acrosome reaction.** The percentage of sperm able to undergo a successful acrosome reaction was significantly increased by AICAR at 10 min (mean increase, ~34%), at 25 min (mean increase, ~52%), and at 40 min (mean increase, ~47%) compared to those of the control (Fig. 6A). With MET, the acrosome reaction rate was significantly increased at 25 min (mean increase, ~47%) and at 40 min (mean increase, ~66%) compared to the control (Fig. 6B). Treatment of sperm with CC significantly decreased the acrosome reaction rate at 25 min (mean decrease, ~29%) and at 40 min (mean decrease, ~25%) compared to the control (Fig. 6C). Thus, AMPK activators increased the rate of acrosome reaction whereas the inhibitor decreased it. Moreover, the ability of sperm to undergo the acrosome reaction was negatively affected over time in all treatments ( $P < 0.01$ ). However, we also observed a significant decrease in the rate of acrosome reaction after 40 min of incubation for the controls as well as for the treated samples.

**Sperm viability.** We studied the effects of AMPK modulators on sperm viability to ensure that the experimental conditions stay compatible with living cells and also to potentially correlate with other studies. The percentage of sperm viability as assessed with SYBR14/PI was significantly increased at 25 and at 40 min of incubation at 35°C with AICAR (mean increase, ~9%) (Table 1) and with MET (mean increase, ~8%) (Table 2) compared to the control. Treatment with the AMPK inhibitor CC did not significantly affect sperm viability for a given time. However, a significant decrease of viability over the 40 min of incubation was observed for the controls and CC but not for AICAR and MET treatments (Table 3).

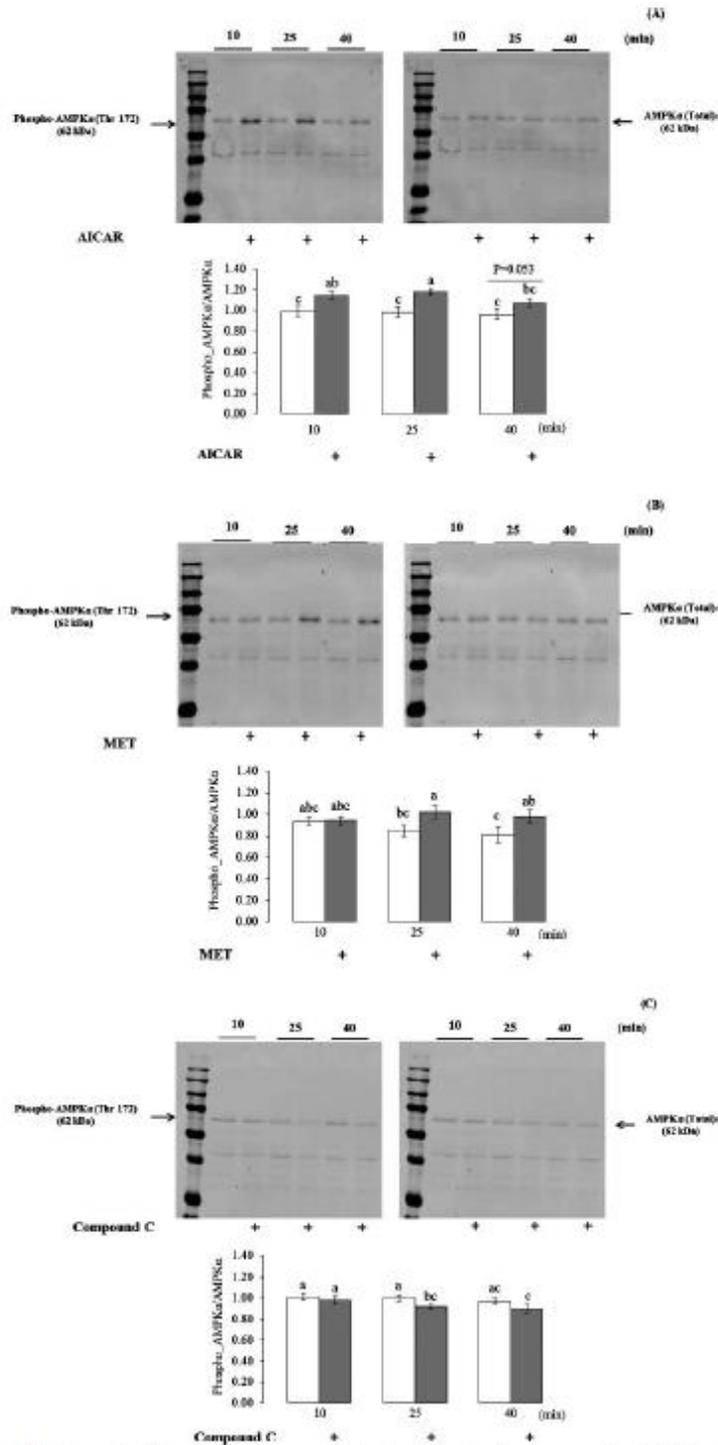


FIG. 4. Modulator effects on AMPK phosphorylation in chicken sperm. After incubation in the presence of an AMPK activator (2 mM AICAR [A] and 1 mM MET [B] [black]) or water (AICAR and MET control [white]) or an AMPK inhibitor (5 $\mu$ M CC [C] [black]) or DMSO (CC control [white]), sperm lysates were prepared and resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with anti-phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  and anti-AMPK $\alpha$  antibody. Bands for phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  were detected at 62 kDa (left lanes). Total AMPK $\alpha$  was used as loading control (62 kDa [right lanes]), and the phosphorylated AMPK $\alpha$  (Thr<sup>172</sup>)-to-total AMPK $\alpha$  protein ratio is shown at the bottom. Values are means  $\pm$  SEM from four different experiments. Different letters in each incubation time indicate significant differences between control and treatment at  $P < 0.05$ . There was no significant time effect in most cases, except with CC treatment, which showed a negative time effect ( $P < 0.05$ ).

AMPK IN CHICKEN SPERM FUNCTIONS

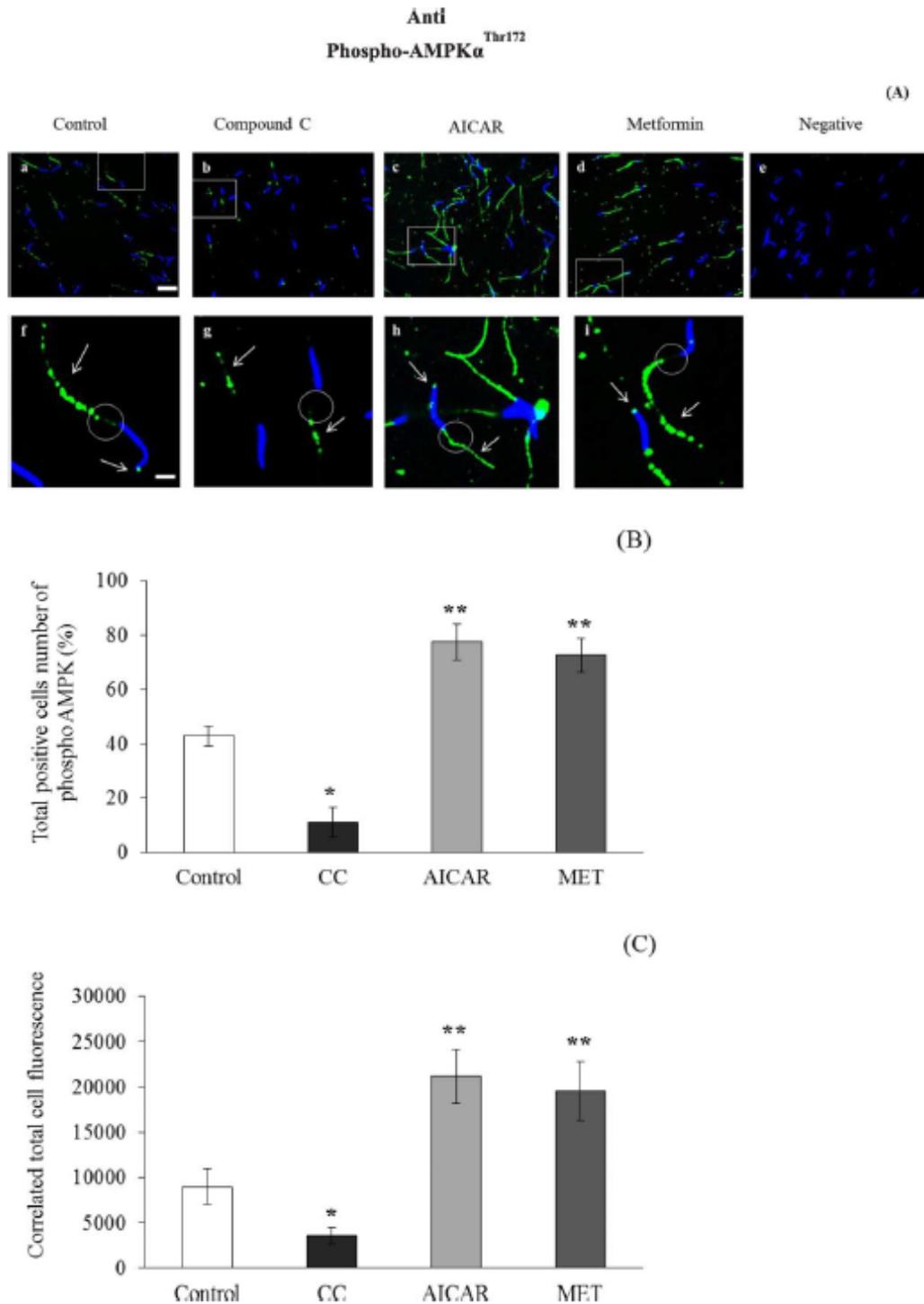


FIG. 5. Modulator effects on the AMPK localization in chicken sperm. Sperm cells were incubated with AMPK activators (2 mM AICAR and 1 mM MET) and AMPK inhibitor (5  $\mu$ M CC) at 35°C for 25 min and then treated with antibodies to phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  and with secondary antibody conjugated to biotin (see *Materials and Methods*). **A**) Immunofluorescence staining of phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK (green) was conducted in chicken sperm. Nuclei were stained with DAPI (blue). A higher magnification of the square is shown in the bottom panels. White arrows and circles mark the regions containing phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK. Localization of phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK is shown in the untreated control (**A.a** and **A.f**), in CC (**A.b** and **A.g**), in AICAR (**A.c** and **A.h**), and in MET (**A.d** and **A.i**). For negative control, primary antibody was not added (**A.e**). Bars = 120  $\mu$ M for top panels and 10  $\mu$ M for bottom panels. **B**)

TABLE 1. Effect of AICAR treatment on motility parameters and viability of chicken sperm.\*

Motility parameters	10 min		25 min		40 min	
	Control	AICAR	Control	AICAR	Control	AICAR
Motile (%)	64.2 ± 3.0 <sup>b</sup>	76.1 ± 2.3 <sup>a</sup>	42.0 ± 5.9 <sup>d</sup>	57.9 ± 4.0 <sup>bc</sup>	39.4 ± 5.4 <sup>d</sup>	51.7 ± 5.2 <sup>cd</sup>
Rapid (%)	39.9 ± 2.5 <sup>b</sup>	47.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	19.9 ± 4.2 <sup>d</sup>	34.0 ± 2.9 <sup>bc</sup>	17.5 ± 4.3 <sup>d</sup>	28.1 ± 5.2 <sup>cd</sup>
Progressive (%)	23.6 ± 2.5 <sup>b</sup>	30.3 ± 2.5 <sup>a</sup>	11.1 ± 3.2 <sup>d</sup>	21.9 ± 2.0 <sup>bc</sup>	9.8 ± 3.1 <sup>d</sup>	16.8 ± 3.5 <sup>cd</sup>
VAP (µm/sec)	61.3 ± 2.1 <sup>bc</sup>	70.4 ± 3.9 <sup>a</sup>	57.3 ± 2.1 <sup>c</sup>	70.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	60.3 ± 4.5 <sup>bc</sup>	67.8 ± 3.6 <sup>ab</sup>
VSL (µm/sec)	49.1 ± 2.4 <sup>bc</sup>	55.7 ± 3.8 <sup>a</sup>	46.5 ± 2.8 <sup>c</sup>	59.0 ± 2.7 <sup>a</sup>	49.1 ± 4.5 <sup>bc</sup>	56.0 ± 3.5 <sup>ab</sup>
VCL (µm/sec)	112.2 ± 2.4 <sup>ab</sup>	117.2 ± 2.6 <sup>a</sup>	105.2 ± 3.1 <sup>c</sup>	116.6 ± 1.7 <sup>a</sup>	105.6 ± 4.4 <sup>bc</sup>	114.2 ± 4.0 <sup>ab</sup>
STR (%)	75.1 ± 1.4 <sup>b</sup>	77.5 ± 0.7 <sup>ab</sup>	75.7 ± 1.4 <sup>b</sup>	79.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	75.7 ± 1.8 <sup>ab</sup>	77.0 ± 1.0 <sup>ab</sup>
LIN (%)	41.9 ± 1.5 <sup>bc</sup>	45.2 ± 1.6 <sup>ab</sup>	39.7 ± 1.5 <sup>c</sup>	47.7 ± 1.7 <sup>a</sup>	43.0 ± 2.3 <sup>abc</sup>	45.6 ± 1.5 <sup>ab</sup>
Viability (%)	76.9 ± 2.7 <sup>ab</sup>	81.1 ± 2.0 <sup>a</sup>	72.9 ± 2.0 <sup>bc</sup>	80.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	70.1 ± 1.1 <sup>c</sup>	77.2 ± 1.7 <sup>a</sup>

\* Values are means ± SEM from 10 different experiments.

<sup>a-d</sup> Different superscript letters within a row indicate statistically significant differences between control and treatment at each time (*P* < 0.05) or between incubation times (*P* < 0.01).

TABLE 2. Effect of MET treatment on motility parameters and viability of chicken sperm.\*

Motility parameters	10 min		25 min		40 min	
	Control	MET	Control	MET	Control	MET
Motile (%)	68.5 ± 3.9 <sup>ab</sup>	77.4 ± 3.7 <sup>a</sup>	48.1 ± 4.7 <sup>c</sup>	65.4 ± 4.7 <sup>b</sup>	46.5 ± 3.9 <sup>c</sup>	68.2 ± 3.3 <sup>b</sup>
Rapid (%)	47.7 ± 3.9 <sup>a</sup>	48.8 ± 4.1 <sup>a</sup>	26.6 ± 3.3 <sup>b</sup>	44.3 ± 4.3 <sup>a</sup>	29.3 ± 4.8 <sup>b</sup>	46.2 ± 3.4 <sup>a</sup>
Progressive (%)	29.8 ± 4.4 <sup>a</sup>	32.4 ± 3.3 <sup>a</sup>	15.6 ± 2.6 <sup>b</sup>	30.0 ± 3.4 <sup>a</sup>	13.4 ± 1.4 <sup>b</sup>	31.8 ± 2.9 <sup>a</sup>
VAP (µm/sec)	66.7 ± 3.6 <sup>bc</sup>	71.7 ± 3.2 <sup>ab</sup>	64.6 ± 2.7 <sup>c</sup>	71.8 ± 2.4 <sup>ab</sup>	62.1 ± 2.3 <sup>c</sup>	77.5 ± 2.4 <sup>a</sup>
VSL (µm/sec)	55.4 ± 3.9 <sup>bc</sup>	59.1 ± 2.9 <sup>abc</sup>	53.2 ± 3.0 <sup>c</sup>	60.2 ± 2.1 <sup>ab</sup>	51.1 ± 2.7 <sup>c</sup>	66.2 ± 2.9 <sup>a</sup>
VCL (µm/sec)	115.2 ± 2.7 <sup>bc</sup>	119.5 ± 2.8 <sup>ab</sup>	112.0 ± 2.6 <sup>cd</sup>	120.3 ± 2.9 <sup>ab</sup>	106.9 ± 2.2 <sup>d</sup>	121.6 ± 2.2 <sup>a</sup>
STR (%)	78.9 ± 1.5 <sup>bc</sup>	77.8 ± 0.8 <sup>abc</sup>	76.7 ± 1.0 <sup>c</sup>	79.9 ± 0.7 <sup>ab</sup>	77.3 ± 1.4 <sup>c</sup>	81.1 ± 1.2 <sup>a</sup>
LIN (%)	45.7 ± 2.2 <sup>bc</sup>	48.1 ± 2.5 <sup>abc</sup>	43.8 ± 1.4 <sup>c</sup>	48.0 ± 1.1 <sup>b</sup>	45.0 ± 1.7 <sup>bc</sup>	51.7 ± 1.4 <sup>a</sup>
Viability (%)	77.2 ± 1.9 <sup>ab</sup>	80.1 ± 1.5 <sup>a</sup>	72.6 ± 2.0 <sup>bc</sup>	79.1 ± 1.4 <sup>a</sup>	71.3 ± 0.8 <sup>c</sup>	76.9 ± 0.7 <sup>a</sup>

\* Values are means ± SEM from 10 different experiments.

<sup>a-d</sup> Different superscript letters within a row indicate statistically significant differences between control and treatment at each time (*P* < 0.05) or between incubation times (*P* < 0.01).

TABLE 3. Effect of CC treatment on motility parameters and viability of chicken sperm.\*

Motility parameters	10 min		25 min		40 min	
	Control	CC	Control	CC	Control	CC
Motile (%)	67.7 ± 4.4 <sup>a</sup>	58.4 ± 5.3 <sup>a</sup>	44.1 ± 3.6 <sup>b</sup>	33.6 ± 4.1 <sup>cd</sup>	38.5 ± 2.6 <sup>bc</sup>	28.3 ± 2.3 <sup>d</sup>
Rapid (%)	35.9 ± 4.1 <sup>a</sup>	31.4 ± 3.6 <sup>a</sup>	17.8 ± 2.3 <sup>b</sup>	11.8 ± 1.6 <sup>c</sup>	15.3 ± 1.3 <sup>b</sup>	11.1 ± 0.9 <sup>c</sup>
Progressive (%)	23.7 ± 3.8 <sup>a</sup>	19.4 ± 2.5 <sup>a</sup>	8.8 ± 1.3 <sup>b</sup>	5.8 ± 0.9 <sup>c</sup>	8.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.8 <sup>c</sup>
VAP (µm/sec)	56.8 ± 3.4 <sup>ab</sup>	58.0 ± 3.4 <sup>ab</sup>	58.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	51.0 ± 2.3 <sup>b</sup>	58.5 ± 1.9 <sup>a</sup>	52.4 ± 1.6 <sup>b</sup>
VSL (µm/sec)	45.1 ± 3.5 <sup>abc</sup>	46.8 ± 3.6 <sup>ab</sup>	41.2 ± 2.1 <sup>bc</sup>	38.5 ± 2.1 <sup>c</sup>	49.0 ± 1.4 <sup>a</sup>	43.9 ± 1.4 <sup>b</sup>
VCL (µm/sec)	105.4 ± 4.0 <sup>ab</sup>	106.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	102.6 ± 3.7 <sup>ab</sup>	100.1 ± 2.9 <sup>bc</sup>	103.0 ± 2.3 <sup>ab</sup>	96.4 ± 2.2 <sup>c</sup>
STR (%)	75.4 ± 1.7 <sup>ab</sup>	76.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	74.6 ± 1.0 <sup>ab</sup>	71.1 ± 1.1 <sup>c</sup>	76.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	73.4 ± 1.5 <sup>bc</sup>
LIN (%)	41.5 ± 2.6 <sup>ab</sup>	42.0 ± 2.0 <sup>ab</sup>	40.1 ± 1.3 <sup>b</sup>	36.6 ± 1.2 <sup>c</sup>	43.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	41.1 ± 0.6 <sup>b</sup>
Viability (%)	79.6 ± 2.2 <sup>a</sup>	79.7 ± 1.7 <sup>a</sup>	74.9 ± 1.3 <sup>ab</sup>	74.8 ± 2.3 <sup>ab</sup>	73.6 ± 1.5 <sup>bc</sup>	70.3 ± 2.3 <sup>c</sup>

\* Values are means ± SEM from 10 different experiments.

<sup>a-d</sup> Different superscript letters within a row indicate statistically significant differences between control and treatment at each time (*P* < 0.05) or between incubation times (*P* < 0.01).

*Effect of CC on AICAR-Induced AMPK Phosphorylation and Sperm Quality*

Taking into account the respective mechanisms of action of AICAR and CC, we studied the effect of adding CC at 15 min

after AICAR addition to chicken sperm in order to assess the stability of phosphorylated AMPK in sperm. In the presence of CC, a marked drop in AICAR-induced AMPK phosphorylation as well as in AICAR-induced increase in viability, mobility, AR, and ATP concentration were observed (Fig. 7).

Phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPKα expressing cells percentage: percentages of sperm cells with regions expressing phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPKα are stained green. The experiment was performed four times; values (%) are means ± SEM (\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.001). C) Quantification of fluorescence of phospho-AMPK immunostaining. Quantification of fluorescence intensity in immunofluorescence data was measured using ImageJ software, and CTCF values are shown as histograms. Data are means ± SEM; the experiment was performed four times (\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.001).

## AMPK IN CHICKEN SPERM FUNCTIONS

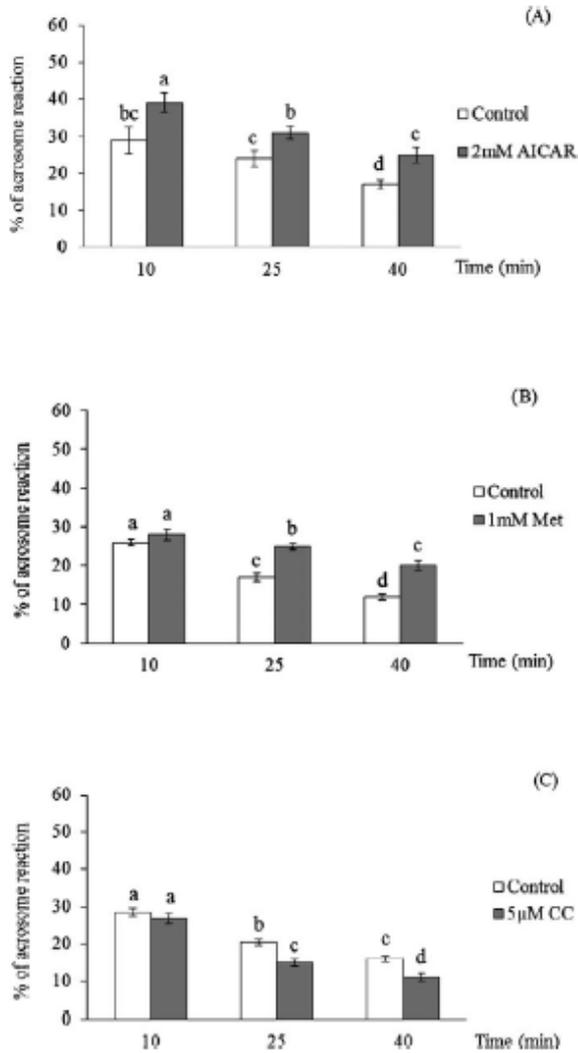


FIG. 6. Effects of AMPK modulators (AICAR, MET, and CC) on the percentage of sperm acrosome reaction. Sperm were incubated at 35°C in the presence of an AMPK activator (2 mM AICAR [A] and 1 mM MET [B] [black]) or water (AICAR and MET control [white]) or an AMPK inhibitor (5 μM CC [C] [black]) or DMSO (CC control [white]). Acrosome-reacted sperm were detected by FITC-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA). The experiment was performed 10 times; values (%) are means ± SEM. Different letters in each incubation time indicate significant differences between control and treatment at  $P < 0.05$ . There was a significant time effect ( $P < 0.01$ ).

### Modulator Effects on Sperm Energetic Metabolism (Lactate Production and ATP Concentration)

Lactate production increased strongly between 10 and 40 min of incubation. Addition of the AMPK activator AICAR or MET in sperm led to a significant increase in the sperm lactate production at 25 and at 40 min of incubation (25% to 35% increase) (Fig. 8, A and B). Addition of the AMPK inhibitor CC significantly inhibited the lactate production at 25 min (mean decrease, ~29%) and at 40 min (mean decrease, ~27%) (Fig. 8C).

AICAR significantly increased the ATP concentration at 25 and 40 min of incubation (mean increase, ~30%) (Fig. 9A), but the activator MET did not affect it (Fig. 9B). The inhibitor CC significantly decreased ATP concentration at 25 and 40 min (Fig. 9C).

## DISCUSSION

AMPK is a sensor protein of cell energy status and is, thus, a key enzyme in regulating lipid, glucose, and energy balances. In mammalian tissues, AMPK activates metabolic pathways, producing ATP, and simultaneously inhibits ATP-consuming anabolic pathways [7]. In reproductive tissues, AMPK has been shown in rodent testis [11]. AMPK catalytic  $\alpha$  has also been found in mice Leydig and Sertoli cells and sperm [22]. The presence of AMPK catalytic  $\alpha$  subunit in boar-ejaculated sperm and the inhibitory effect of the AMPK inhibitor CC on boar sperm motility have also been shown [35].

In the present study, using immunofluorescence and Western blotting, we demonstrated for the first time the presence of AMPK $\alpha$  and phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  in chicken sperm. We also showed for the first time that appropriate doses of the AMPK activators AICAR and MET increased chicken sperm motility, acrosome reaction, viability, and sperm energetic metabolism, whereas CC reduces sperm functions.

The presence of the AMPK $\alpha$  protein in the acrosome, midpiece, and flagellum is in agreement with its possible function in sperm motility and acrosome reaction process. Phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  is found mainly in the flagellum and acrosome and with a lower intensity in the midpiece. Strong signals in the flagellum and acrosome and low signals in the midpiece suggest local actions that do not involve mitochondria activation as initial steps. Interestingly, these results are different from those obtained with boar sperm as phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  was not found in the flagellum of boar sperm ejaculate [47].

The suggestion of “local” action of AMPK in chicken sperm flagella and acrosomes is supported by the strong increase in phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK in the flagellum after MET and AICAR. This would be connected with a localization of ATP synthesis and regulation not restricted to the midpiece with the support of mitochondrial respiration but also present in other sperm compartments with ATP synthesis through local anaerobic glycolysis [48, 49]. Indeed, glycolytic enzymes have previously been found in the sperm tails of birds and mammals [50, 51], and the anaerobic glycolysis is known to be efficient in chicken sperm [52].

Moreover, the protein phosphorylation stimulation observed with MET and AICAR was different. Phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK was immunolocalized in the acrosome and flagellum but not in the midpiece (which contains the mitochondria) when MET was present. With AICAR, phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK was found in the acrosome and flagellum as well as in the midpiece. The presence of phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK in the midpiece was accompanied by a clear increase in ATP concentration when AICAR was used, whereas the ATP concentration was not significantly affected following MET treatment. Western blot analysis confirmed the AICAR and MET stimulation of AMPK $\alpha$  phosphorylation, but this occurred faster with AICAR than with MET (less than 10 min vs. 25 min, respectively). These differences in activation kinetics by AICAR and MET were also observed for sperm functions.

All these results are consistent with the view that AICAR directly and rapidly activates AMPK, whereas MET indirectly activates AMPK by blocking mitochondrial respiratory chains [15], explaining the duration of the reaction and the absence of

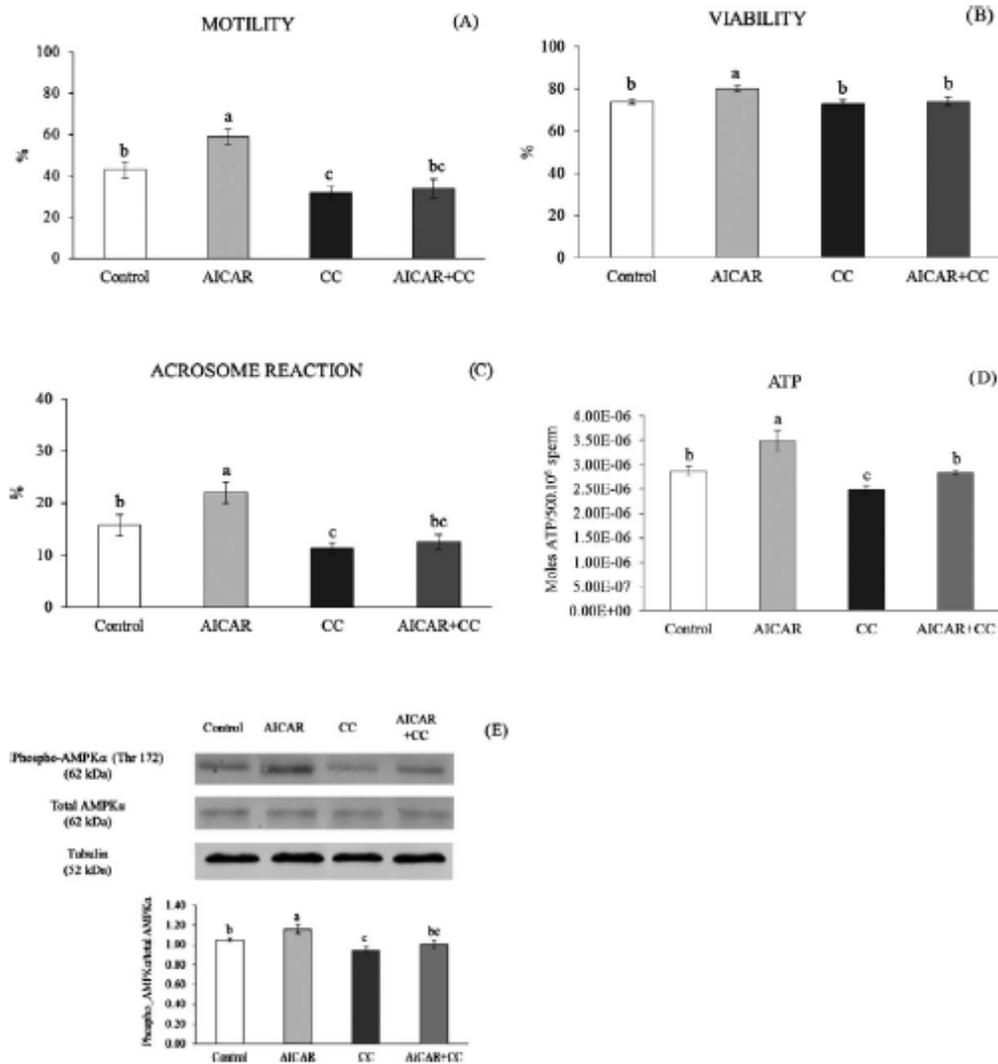


FIG. 7. Effect of CC on AICAR induced AMPK phosphorylation and sperm quality. Sperm motility (A), viability (B), acrosome reaction (C), ATP concentration (D), and AMPK phosphorylation (E) induced by AMPK activation are shown. Sperm were incubated with AICAR for 15 min before 5  $\mu$ M CC was added, and incubated for an additional 25 min. For negative control, sperm were incubated in water and DMSO. For positive control, sperm were incubated with AICAR for 40 min and with CC for 25 min. The experiment was performed 10 times for motility, viability, and AR; 6 times for ATP concentration; and 4 times for Western blotting. Values (%) are means  $\pm$  SEM. Different superscript letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK in the midpiece of MET-treated sperm. A decrease in ATP levels would be expected if this indirect activation by MET were made in the absence of energetic substrate, but ATP levels did not significantly decrease much, probably because the incubation medium BPSE buffer contains glucose, which is metabolized in glycolysis pathway to produce ATP.

However, other mechanisms should not be neglected, such as a possible MET action through a different signaling pathway such as LKB1/AMPK [53], as suggested in mice sperm [54, 55]. Unlike MET, AICAR is rapidly metabolized to an AMP analog (ZMP), the accumulation of which leads to AMPK activation by mimicking the effects of AMP [25, 26], much

probably explaining here the rapidity of the stimulating effect of AICAR on sperm functions (less than 10 min).

In the presence of CC, inhibition of AMPK phosphorylation was clearly seen using Western blotting, and phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  was mainly immunolocalized in the flagellum, followed by the midpiece, accompanying a reduction of ATP. Moreover, AMPK dephosphorylation was observed when CC was added after AICAR stimulation. CC has been used primarily as an inhibitor of AMPK phosphorylation [31]. It is a high-affinity ligand that competes with AMP and ATP for binding to AMPK [15–32] and ZMP, the active AICAR metabolite, which also binds at the AMP-binding site to activate the kinase [26]. Compound C has also been reported to

AMPK IN CHICKEN SPERM FUNCTIONS

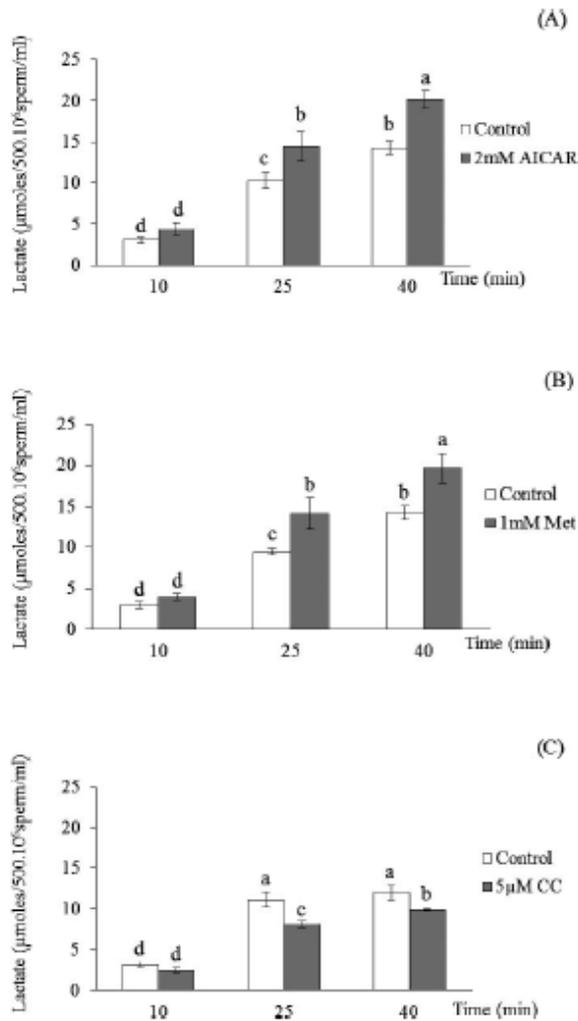


FIG. 8. Effects of the AMPK inhibitor CC and activators AICAR and MET on lactate concentration. Sperm were incubated at 35°C in the presence of an AMPK activator (2 mM AICAR [A] and 1 mM MET [B] [black]) or water (AICAR and MET control [white]) or an AMPK inhibitor (5 µM CC [C] [black]) or DMSO (CC control [white]). The experiments were repeated four times; values (%) are means ± SEM. Different letters in each incubation time indicate significant differences between control and treatment at  $P < 0.05$ . There was a significant increase in lactate production with time ( $P < 0.001$ ).

inhibit the activity of AICAR by blocking the uptake of AICAR into the cells [33]. Whatever the mechanism(s) involved, CC-induced inhibition of AMPK phosphorylation reveals a drop in phospho-AMPK, indicating that Ser/Thr phosphatases continuously dephosphorylate AMPK in chicken sperm. AMPK is already known to be dephosphorylated by PP2A or PP2C [56–58], and PP2A has been shown to be active in chicken sperm [59], supporting this hypothesis. Taken together, these results show that CC could directly inhibit AMPK, and the decrease in AMPK phosphorylation observed here is in accordance with efficient dephosphatase activity in chicken sperm.

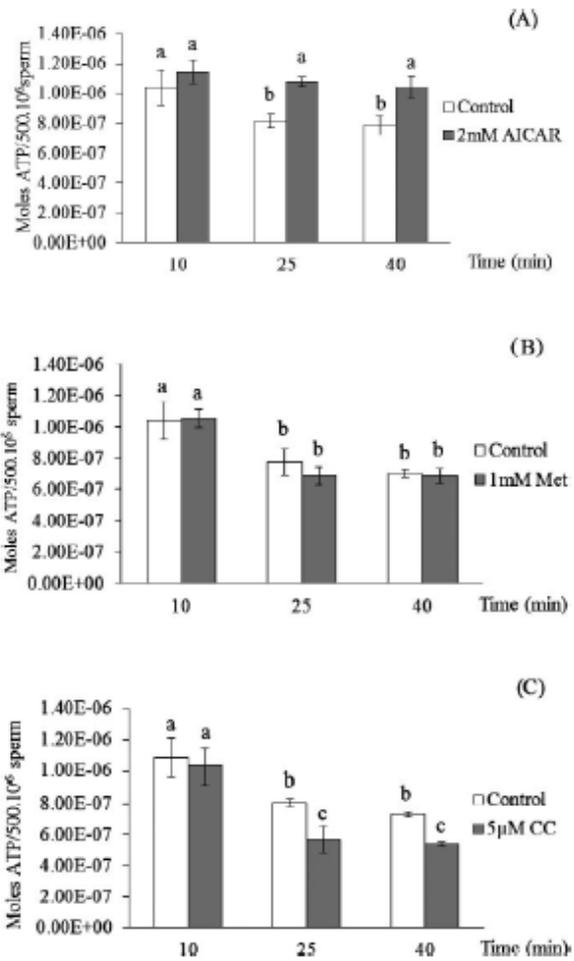


FIG. 9. Effects of the AMPK inhibitor CC and activators AICAR and MET on sperm ATP concentration. Sperm were incubated at 35°C in the presence of an AMPK activator (2 mM AICAR [A] and 1 mM MET [B] [black]) or water (AICAR and MET control [white]) or an AMPK inhibitor (5 µM CC [C] [black]) or DMSO (CC control [white]). Experiments were repeated four times; values (%) are means ± SEM. Different letters in each incubation time indicate significant differences between control and treatment at  $P < 0.05$ . There was a significant time effect ( $P < 0.01$ ).

However, total AMPK $\alpha$  and phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  levels decreased after only 25 min of incubation instead of after 10 min as would be expected for a direct inhibition. We suggest that the low concentration of CC (5 µM CC, thus 200- to 400-fold less than MET and AICAR; see Supplemental Figs. S7–S9) used here to avoid toxic effects of higher doses of its solvent DMSO and of CC itself, limits the study of the direct effect of the inhibitor. Considering the actual state of the art, we thus suggest that CC directly acts on AMPK phosphorylation in chicken sperm, but the conditions of experimentations ensuring the maintenance of sperm viability do not permit a rapid action due to the obligation of using very low concentrations of the inhibitor.

Regarding lactate production, both AICAR and MET increased lactate contents of sperm, whereas CC decreased it. Sperm are known to metabolize different actors of the

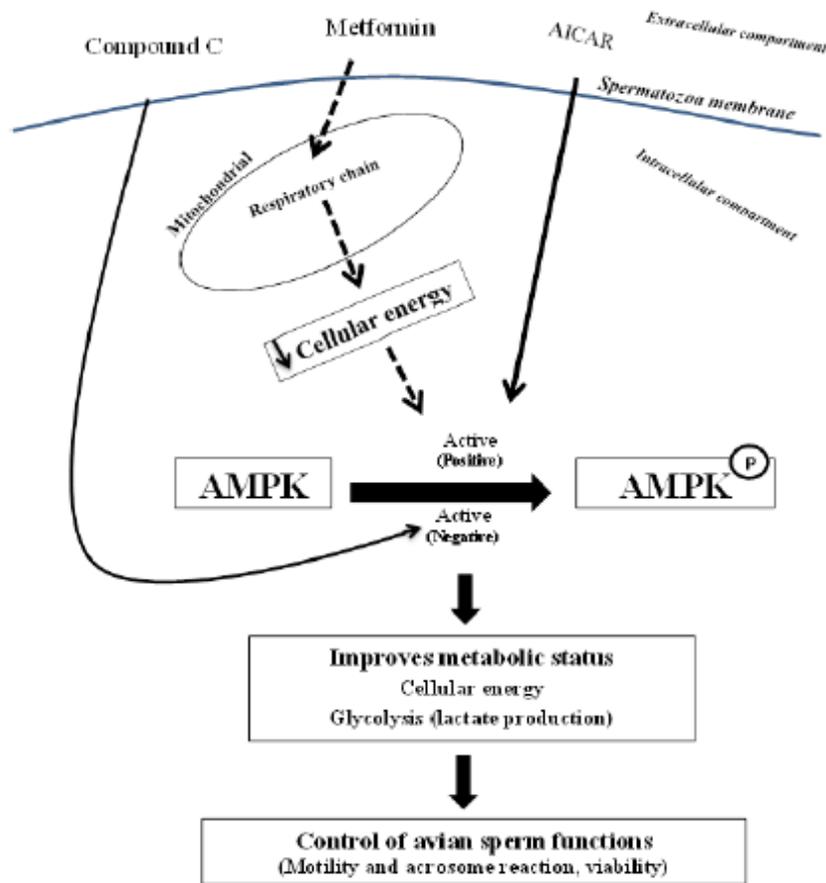


FIG. 10. Schematic summary of AMPK activity regulation in avian sperm. Diagram shows elements of potential mechanisms of AMPK modulators (CC, AICAR, and MET) in chicken sperm. They all activate AMPK, which leads to metabolic improvements, leading to the control of sperm functions. Solid arrows show more established relationships among stimuli, signals, improved metabolic status, and control of avian sperm functions. Solid black arrows indicate AMPK activation; dashed black arrows show AMPK inhibition. Big black arrows indicate AMPK phosphorylation.

glycolysis pathway [60]. Lactate is one end-product of glycolysis, and AMPK activation would then improve the metabolism status through glucose uptake and/or glycolysis, inducing increased ATP concentration and lactate production as in other cell models (granulosa cells, rat skeletal muscle) [21, 27].

Regarding the different motility parameters: following and enlarging on previous studies of the effect of MET and CC on mammalian sperm [24–35], we found that AICAR and MET increased many chicken sperm motility parameters. In agreement with our observation of AMPK phosphorylation, AICAR increased some of them (% motile, % rapid, % progressive, VAP in  $\mu\text{m}/\text{sec}$ , and VSL  $[\mu\text{m}/\text{sec}]$ ) in less than 10 min, faster than MET that was not effective before 25 min. AMPK inhibition by CC significantly reduced many motility parameters (% motile, % rapid, VAP, VCL) in a time-dependent way (statistically significant after 25min, the time also needed for the activation by MET). In addition, CC also inhibited the stimulatory effects of AICAR on sperm motility. In brief, our results strongly suggest that the AMPK pathway has a role in the stimulation of chicken sperm motility.

We also show that AMPK plays a role in chicken sperm acrosome reaction. The acrosome reaction occurs by fusion of the sperm head cytoplasmic membrane and the underlying outer acrosomal membrane, so that the acrosome content is released [61]. In most mammalian species, acrosome reaction occurs only in capacitated sperm [62, 63] and capacitation requires specific environments and different substrates. Lactate is one of the known substrates required for capacitation and acrosome reaction [64]. However, in chicken sperm, the acrosome reaction can be induced very rapidly in vitro [65] without previous capacitation [66]. Unlike that in mammals, the present study indicates that the inhibition of AMPK with CC significantly decreases chicken sperm acrosome reaction and reduces its stimulation by AICAR, whereas the activators AICAR and MET stimulate it. The actions of MET and CC were slower (after 25 min) than the AICAR action that increased sperm acrosome reaction as quickly as motility (in 10 min). AMPK activity, thus, seems necessary for optimal chicken sperm acrosome reaction.

AICAR and MET also increased viability at 25 and 40 min compared to controls, which showed a viability decrease at 40 min. Compound C alone did not affect sperm viability at the

concentration and time chosen for the main experiments but reduced the increase of viability by AICAR. Thus, it seems that in addition to their motility and acrosome reaction stimulation, the direct (AICAR) or indirect (MET) activations of AMPK slow down the decrease of viability induced by *in vitro* incubation.

Regulation of acrosome reaction and motility by AMPK seems to respond to the same kinetics, as if common central actors of these two different sperm functions are in action when AMPK is activated. We propose a scheme (Fig. 10) whereby MET could mainly activate AMPK pathways indirectly by inhibiting complex I of the mitochondrial respiratory chain, whereas AICAR (ZMF) could directly and rapidly activate AMPK. Compound C would mainly act through a direct inhibition of AMPK phosphorylation. Our data strongly suggest that AMPK phosphorylation is a central action regulating the improvement of metabolic functions and ATP production needed to ensure high energy consuming process such as sperm motility and acrosome reaction.

At this stage of the discussion, we must explain why our study was carried out at 35°C despite the fact that hen body temperature is close to 41°C. Chicken semen incubated *in vitro* exhibits very low acrosome reaction at 40°C–41°C (less than 10% at 10 min in our working conditions) and a decrease in viability that is much more rapid (30% loss after 25 min) than at 35°C. In addition, sperm become immotile as the *in vitro* temperature is raised to 40°C–41°C but may regain their motility when the temperature is decreased to 30°C; but the conservation of motility capacity is lower at 41°C than at lower temperatures [41, 42, 67–70]. Thus, a 41°C temperature would possibly be optimal for the conservation of sperm interacting with hen oviductal cells but certainly not for diluted free-swimming sperm. We thus decided to observe the AMPK regulation in sperm incubated *in vitro* at the temperature where the motility and the percentage of AR are optimal, but not too far from the chicken body temperature, that is, 35°C.

Taken together, the results presented here show that AMPK signaling pathway is positively involved in the motility and in the capacity of chicken sperm to undergo the acrosome reaction. AMPK modulators penetrate cells to modify ATP energy as well as sperm functions much faster in chicken than in boar sperm, which needed 60 min [71]; and the rapidity of the action is higher with the more direct AMPK activator (AICAR, less than 10 min). This leads us to assume that some signaling pathways differ between mammals and birds. Unlike mammals, bird sperm acquire part of their motility and fertilizing capacities immediately after leaving the testis [4, 5] and can reside for a very long time in the female genital tract (3 weeks for chicken) before acrosome reaction and fertilization occur [60]. Moreover, the signaling pathways positively involved in chicken sperm acrosome reaction occurs *in vitro* in less than 5 min [39]. Thus, signaling pathways can be activated very rapidly in chicken sperm and we suggest that these highly differentiated cells with an “inactive genome” would be a model to study “non genomic” basic and rapid involvement of signaling pathways in different metabolic functions.

In conclusion, we identified for the first time the presence and potential roles of AMPK in chicken sperm. We have shown that AMPK is expressed in the acrosome, midpiece, and flagellum and that AMPK phosphorylation occurs at Thr<sup>172</sup>, mainly in the flagellum and acrosome. The use of AMPK activation/inhibition by pharmacological modulators (AICAR, MET, and CC) showed that AMPK is significantly and quickly involved in bird sperm motility and acrosome reaction, which is essential to the fertilization process. This emphasizes the role of energetic sensors in the complex process of fertilization.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Yves Combarous (CNRS), Francois Seigneurin, Michèle Magistrini, Marina Govoroun, and Nicolas Guyot (INRA) for discussions and the team members who took care of the animals, especially Frédéric Mercierand, Philippe Didier, and Harold Rigoreau for their help with animal breeding and collection of chicken semen.

## REFERENCES

- Blesbois E, Brillard JP. Specific features of *in vivo* and *in vitro* sperm storage in birds. *Animal* 2007; 1:1472–1481.
- Stepinska U, Bakst MR. Fertilization. In: Jamieson BGM (ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds*. Enfield, NH: Science Publishers; 2007; 553–587.
- Blesbois E. Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation. *J Poultry Sci* 2012; 49: 141–149.
- Ashizawa K, Sano R. Effects of temperature on the immobilization and the initiation of motility of sperm in the male reproductive tract of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1990; 96:297–301.
- Howarth B Jr. Fertilizing ability of cock sperm from the testis epididymis and vas deferens following intravaginal insemination. *Biol Reprod* 1983; 28:586–590.
- Munro S. The effect of testis hormone on the preservation of sperm life in the vas deferens of the fowl. *J Exp Biol* 1937; 15:186–196.
- Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 2001; 23:1112–1119.
- Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 2003; 546: 113–120.
- Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 2004; 117:5479–5487.
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept. *J Physiol* 2006; 574:7–15.
- Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J* 2000; 346:659–669.
- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlatterer U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 2003; 13: 2004–2008.
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2005; 2:21–33.
- Momcilovic M, Hong SP, Carlson M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase *in vitro*. *J Biol Chem* 2006; 281:25336–25343.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; 108:1167–1174.
- Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2000; 348:607–614.
- Sanz P. AMP-activated protein kinase: structure and regulation. *Curr Protein Pept Sci* 2008; 9:478–492.
- Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 2009; 89:1025–1078.
- Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S, Dupont J. Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biol Reprod* 2007; 76:368–378.
- Tosca L, Solnais P, Ferre P, Foufelle F, Dupont J. Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 2006; 75:342–351.
- Richardson MC, Ingamells S, Simonis CD, Cameron IT, Sreekumar R, Vijendren A, Sellahewa L, Coakley S, Byrne CD. Stimulation of lactate production in human granulosa cells by metformin and potential involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:670–677.
- Tartarin P, Guibert E, Toure A, Ouiste C, Leclerc J, Sanz N, Briere S, Dacheux JL, Delaunoy B, McNeilly JR, McNeilly AS, Brillard JP, et al.

- Inactivation of AMPK $\alpha$ 1 induces asthenozoospermia and alters sperm morphology. *Endocrinology* 2012; 153:3468–3481.
23. Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, Guillory V, Froment P. Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse sperm. *Cryobiology* 2014; 68:262–268.
  24. Hurtado de Llera A, Martín-Hidalgo D, Gil MC, García-Marin LJ, Bragado MJ. The AMPK activator metformin inhibits one of the main functions of boar sperm motility. *FEBS J* 2012; 279:52–576.
  25. Sullivan JE, Brocklehurst KJ, Marley AE, Carey F, Carling D, Beri RK. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 1994; 353:33–36.
  26. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 1995; 229:558–565.
  27. Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol* 1977; 273:E1107–E1112.
  28. Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 2000; 49:896–903.
  29. Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Meroni SB. The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribose, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol* 2007; 39:279–288.
  30. Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P, Foulfelle F, Dupont J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* 2005; 146:4500–4513.
  31. Handa N, Takagi T, Saijo S, Kishishita S, Takaya D, Toyama M, Terada T, Shiroutzu M, Suzuki A, Lee S, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, et al. Structural basis for compound C inhibition of the human AMP-activated protein kinase  $\alpha$ 2 subunit kinase domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2001; 67:480–487.
  32. Accordi B, Galla L, Milani G, Curtarello M, Serafin V, Lissandron V, Viola G, te Kronnie G, De Maria R, Petricoin EF 3rd, Liotta LA, Indraccolo S et al. AMPK inhibition enhances apoptosis in MLL-rearranged pediatric B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 2013; 27:1019–1027.
  33. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. Protein kinase inhibitors block the stimulation of the AMP-activated protein kinase by 5-amino-4-imidazole-carboxamide riboside. *FEBS Lett* 2002; 531:189–192.
  34. Lamontagne J, Pepin E, Peyot ML, Joly E, Rudeman NB, Poirout V, Madiraju SR, Nolan CJ, Pœnki M: Pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration of the pancreatic  $\beta$ -cell at submaximal glucose concentrations. *Endocrinology* 2009; 150: 3465–3474.
  35. Hurtado de Llera A, Martín-Hidalgo D, Gil MC, García-Marin LJ, Bragado MJ. AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar sperm and regulates motility. *PLoS One* 2012; 7:e38840.
  36. Peron A, Gomez J, Mignon-Grasteau S, Sellier N, Besnard J, Derouet M, Juin H, Carre B. Effects of wheat quality on digestion differ between the D+ and D- chicken lines selected for divergent digestion capacity. *Poultsci* 2006; 85:462–469.
  37. Burrows HJ. An operation for the correction of Madelung's deformity and similar conditions; (Section of Orthopaedics). *Proc R Soc Med* 1937; 30: 565–572.
  38. Lemoine M, Grasseau I, Billard JP, Blesbois E. A reappraisal of the factors involved in *in vitro* initiation of the acrosome reaction in chicken sperm. *Reproduction* 2008; 136:391–399.
  39. Lemoine M, Dupont J, Guillory V, Tesseraud S, Blesbois E. Potential involvement of several signalling pathways in initiation of the chicken acrosome reaction. *Biol Reprod* 2009; 81:657–665.
  40. Sexton TJ. A new poultry semen extender. 1. Effects of extension on the fertility of chicken semen. *Poult Sci* 1977; 56:1443–1446.
  41. Munro SS. Fowl sperm immobilization by a temperature-media interaction and its biological significance. *Q. JI exp.Physiol* 1938; 27:281–287.
  42. Ashizawa K, Nishiyama H. Effects of temperature on the vigour of motility, oxygen consumption and duration of motility of fowl sperm under aerobic conditions. *Jpn Poult Sci* 1978; 15:264–266.
  43. Lake PE, Ravie O, McAdam J. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: Application to breeding programmes. *Br Poult Sci* 1981; 22: 71–77.
  44. Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Milon-Richard MM. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* 2008; 69:252–261.
  45. Horrocks AJ, Stewart S, Jackson L, Wishart GJ. Induction of acrosomal exocytosis in chicken sperm by inner perivitelline-derived N-linked glycans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278:84–89.
  46. Gutmann I, Wahlefeld AW. L-(+)-lactate: determination with lactate dehydrogenase and NAD. In *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press, Inc.;1974; 3:1464–1468.
  47. Hurtado de Llera A, Martín-Hidalgo D, Rodríguez-Gil JE, Gil MC, García-Marin LJ, Bragado MJ. AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of plasma membrane organization in boar sperm. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1828:2143–2151.
  48. Takei GL, Miyashiro D, Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm. *Exp Biol* 2014; 217:1876–1886.
  49. Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays a major role for ATP supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 2004; 71:540–547.
  50. Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian sperm. *Microsc Res Tech* 2003; 61:103–115.
  51. Cao W, Gerton GL, Moss SB. Proteomic profiling of accessory structures from the mouse sperm flagellum. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5:801–810.
  52. Wishart GJ. Metabolism of fowl and turkey sperm at low temperatures. *J Reprod Fertil* 1984; 70:145–149.
  53. Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, and Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest* 2010; 120:2355–2369.
  54. Towler MC, Fogarty S, Hawley SA, Pan DA, Martin DM, Morrice NA, McCarthy A, Galardo MN, Meroni SB, Cigorraga SB, Ashworth A, Sakamoto K, et al. A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *Biochem. J* 2008; 416:1–14.
  55. Denison FC, Smith LB, Muckett PJ, O'Hara L, Carling D, Woods A. LKB1 is an essential regulator of sperm release during spermiation in the mammalian testis. *PLoS ONE* 2011; 6:e28306.
  56. Wang MY, Unger RH. Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:216–221.
  57. Wu Y, Song P, Xu J, Zhang M, Zou MH. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2007; 282:9777–9788.
  58. Park S, Scheffler TL, Rossie SS, Geraad DE. AMPK activity is regulated by calcium-mediated protein phosphatase 2A activity. *Cell Calcium* 2013; 53:217–223.
  59. Ashizawa K, Wishart GJ, Katayama S, Takano D, Rarasinghe AR, Nanami K, Tsuzuki Y. Regulation of acrosome reaction of fowl sperm: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or -type 2A. *Reproduction* 2006; 131:1017–1024.
  60. Frenkel G, Peterson RN, Freund M. Changes in the metabolism of guinea pig sperm from different segments of the epididymis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 143:1231–1236.
  61. Okamura F, Nishiyama H. The passage of sperm through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*. *Cell Tissue Res* 1978; 188: 497–508.
  62. Yanagimachi R. Fertility of mammalian sperm: its development and relativity. *Zygote* 1994; 2:371–372.
  63. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. Intracellular events and signalling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci* 2000; 5:E110–E123.
  64. Rogers BJ, Yanagimachi R. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 1976; 13:568–575.
  65. Horrocks AJ, Stewart S, Jackson L, Wishart GJ. Induction of acrosomal exocytosis in chicken sperm by inner perivitelline-derived N-linked glycans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278:84–89.
  66. Lemoine M, Mignon-Grasteau S, Grasseau I, Magistrini M, Blesbois E. Capacity of chicken sperm to undergo the acrosome reaction after *in vitro* storage. *Theriogenology* 2011; 75:122–130.
  67. Takeda A. Studies on reversible inactivation of cock sperm by temperature. I. Effects of several factors on reversible inactivation. *Jpn Poult Sci* 1982; 19:26–36.
  68. Wishart GJ, Ashizawa K. Regulation of motility of fowl sperm by calcium and cAMP. *J Reprod Fertil* 1987; 80:607–611.
  69. Thomson MF, Wishart GJ. Elucidation of the mechanism responsible for the temperature-dependent reversible inactivation of the motility of fowl sperm. *Br Poult Sci* 1989; 30:687–692.
  70. Clarke RN, Sexton TJ, Ottinger MA. Effects of holding temperature and

#### AMPK IN CHICKEN SPERM FUNCTIONS

storage time on respiratory rate, motility, and fertility of chicken and turkey semen. *Poult Sci* 1982; 61:1912-1917.

71. Hurtado de Llera A, Martín-Hidalgo D, Gil MC, García-Marín LJ,

Bragado MJ. The calcium/CaMKKalpha/beta and the cAMP/PKA pathways are essential upstream regulators of AMPK activity in boar sperm. *Biol Reprod* 2014; 90:29.

## Résumé des résultats et conclusion de l'article :

LAMPK totale a été observée dans la région de l'acrosome et dans la pièce intermédiaire, ainsi que dans l'ensemble du flagelle, mais la phospho-AMPK-Thr172 a été localisée principalement dans le flagelle et la région de l'acrosome, et à une intensité beaucoup plus faible dans la pièce intermédiaire. Contrairement à ce qui est observé chez les mammifères, la phospho-AMPK-Thr172 n'a pas été localisée dans le flagelle. L'action "locale" de l'AMPK dans le flagelle et l'acrosome est fortement augmentée en présence de Metformine ou AICAR et diminuée par le Compound C.

Nous avons démontré que la phosphorylation de l'AMPK dans les spermatozoïdes était stimulée en présence de Metformine ou d'AICAR. En présence de Metformine, phospho-AMPK a été localisée fortement dans l'acrosome et le flagelle mais pas dans la pièce intermédiaire, alors qu'avec l'AICAR, la phospho-AMPK a été trouvée dans l'acrosome, le flagelle et la pièce intermédiaire. La présence de phospho-AMPK dans la pièce intermédiaire est accompagnée d'une nette augmentation de la concentration de l'ATP quand AICAR a été utilisé, et cela n'a pas été observée avec Metformine and CC. L'analyse par Western blot a confirmé la stimulation de la phosphorylation de l'AMPK par la Metformine et l'AICAR. En présence de CC, l'inhibition de la phosphorylation de l'AMPK a été clairement observée par western blot et la phospho-AMPK $\alpha$  a été localisée dans le flagelle mais pas dans l'acrosome et la pièce intermédiaire. Cela a été indiquée une réduction de l'ATP par CC.

Nous avons aussi démontré que l'activation de l'AMPK a amélioré le métabolisme énergétique des spermatozoïdes, comme cela s'était produit dans d'autres modèles cellulaires (cellules de la granulosa de rat, muscle squelettique). La Metformine et l'AICAR ont notamment stimulé la production de lactate, qui est un produit final de la glycolyse anaérobie. Nos résultats ont aussi montré que la voie de signalisation de l'AMPK est positivement impliquée dans la motilité et la capacité à la réaction acrosomique des spermatozoïdes. La Metformine et l'AICAR ont stimulé la motilité, la réaction acrosomique et la viabilité (9%); tandis que le Compound C a eu une influence négative sur tous les paramètres utilisés pour évaluer la qualité des spermatozoïdes.

Plus précisément, la voie de signalisation de l'AMPK a été activée très rapidement dans les spermatozoïdes de coq par rapport à ce qui a été observé chez les mammifères. L'AICAR a agi directement (et donc plus rapidement : 10 minutes) sur l'activation de

l'AMPK, alors que la Metformine a agi indirectement (et donc plus lentement : 25 minutes) sur l'activation de l'AMPK, en bloquant la chaîne respiratoire mitochondriale. Le Compound C a aussi inhibé l'activation de l'AMPK après 25 minutes, mais nous ne sommes pas certains qu'il ait agi directement ou indirectement sur l'activation de l'AMPK parce que la concentration de Compound C que nous avons utilisé était très faible (200-400 fois moins que Metformine et AICAR) afin d'éviter qu'elle ne devienne toxique pour les spermatozoïdes et qu'elle n'affecte leur viabilité.

En conclusion : nous avons identifié pour la première fois le rôle de l'AMPK dans le sperme de coq. Nous avons montré que l'AMPK est exprimé dans l'acrosome, la pièce intermédiaire et le flagelle et la phosphorylation de l'AMPK est présentée principalement dans le flagelle et acrosome. Des signaux forts sur le flagelle et l'acrosome et basse sur la pièce intermédiaire suggèrent que les actions initiales de l'AMPK n'ont pas impliquées dans les mitochondries. L'utilisation de l'AMPK activation / inhibition par des modulateurs pharmacologiques (AICAR, Metformine, et CC) a montré que l'AMPK est significativement et rapidement impliqué dans la motilité et la réaction de l'acrosome, qui est essentielle pour le processus de fécondation.

## **Chapitre II**

**L'AMPK limite la peroxydation, la production de radicaux libres de l'oxygène, stimule les antioxydantes et joue un rôle dans la régulation des fonctions des spermatozoïdes cryopréservés**

## **Chapitre II : L'AMPK limite la peroxydation, la production de radicaux libres de l'oxygène, stimule les enzymes antioxydantes et joue un rôle dans la régulation des fonctions des spermatozoïdes cryopréservés**

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 nécessaires à la fécondation, telles que la mobilité et la capacité à accomplir la réaction acrosomique.

Les membranes des spermatozoïdes aviaires sont riches en acides gras polyinsaturés et peuvent facilement subir une peroxydation lipidique (LPO) en présence de radicaux libres de l'oxygène (ROS) au cours du processus de cryopréservation, ce qui peut provoquer un dysfonctionnement cellulaire, affecter l'intégrité de la membrane, et conduire *in fine* à une diminution du pouvoir fécondant du spermatozoïde. De plus, les enzymes de défenses antioxydantes, superoxyde dismutase (SOD): glutathion peroxydase (GPx): glutathion réductase (GR) et catalase (CAT): qui sont les principales enzymes antioxydantes naturellement présentes dans le sperme pour éviter la peroxydation des lipides, peuvent être diminuées après congélation/décongélation.

Le but de cette étude était d'examiner le rôle de l'AMPK sur la peroxydation, les principales enzymes antioxydantes ainsi que sur leurs fonctions après congélation/décongélation. Les spermatozoïdes ont été dilués dans des milieux supplémentés ou non avec un activateur de l'AMPK (AICAR ou Metformine) ou un inhibiteur (Compound C): puis cryopréservés. La phosphorylation de l'AMPK, l'activité des principales enzymes antioxydantes des mitochondries, la peroxydation, et les indicateurs énergétiques des fonctions des spermatozoïdes (motilité et la réaction acrosomique, production de lactate, de citrate et d'ATP) ont également été évaluées avant et après cryoconservation.

Ce travail est présenté sous forme d'article : The 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is involved in the augmentation of antioxidant defenses in cryopreserved chicken sperm » en révision mineure dans PLOS one, 2015.

# **The 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is involved in the augmentation of antioxidant defenses in cryopreserved chicken sperm**

Thi Mong Diep Nguyen<sup>1,2</sup>, François Seigneurin<sup>3</sup>, Pascal Froment<sup>1</sup>, Yves Combarous<sup>1</sup>,  
Elisabeth Blesbois<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INRA-CNRS, Unité Mixte de Recherche de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France.

<sup>2</sup> Université François Rabelais, Tours, France.

<sup>3</sup>SYSAAF, F-37380 Nouzilly, France.

Short Title: AMPK on frozen-thawed chicken sperm functions

\* Corresponding author: Dr Elisabeth Blesbois, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA-UMR85, CNRS-UMR7237, F. Rabelais University, IFCE, 37380 Nouzilly, France.

Phone : +33 247427822; fax : +33 247427778

Email: [Elisabeth.Blesbois@tours.inra.fr](mailto:Elisabeth.Blesbois@tours.inra.fr)

## Abstract

Semen cryopreservation is a unique tool for the management of animal genetic diversity. However, the freeze-thaw process causes biochemical and physical alterations which make difficult the restoration of sperm energy-dependent functions needed for fertilization. 5'-AMP activated protein kinase (AMPK) is a key sensor and regulator of intracellular energy metabolism. Mitochondria functions are known to be severely affected during sperm cryopreservation with deleterious oxidative and peroxidative effects leading to cell integrity and functions damages. The aim of this study was thus to examine the role of AMPK on the peroxidation/antioxidant enzymes defense system in frozen-thawed sperm and its consequences on sperm functions. Chicken semen was diluted in media supplemented with or without AMPK activators (AICAR or Metformin (MET)) or inhibitor (Compound C) and then cryopreserved.

AMPK $\alpha$  phosphorylation, antioxidant enzymes activities, mitochondrial potential, ATP, citrate, viability, acrosome reaction ability (AR) and various motility parameters, were negatively affected by the freeze-thaw process while reactive oxygen species (ROS) production, lipid peroxidation (LPO) and lactate concentration were dramatically increased. AICAR partially restored superoxide dismutase (SOD): Glutathione Peroxidase (GPx) and Glutathione Reductase (GR): increased ATP, citrate, and lactate concentration and subsequently decreased the ROS and LPO (malondialdehyde) in frozen-thawed semen. Motility parameters were increased (i.e. + 23% for motility, + 34% for rapid sperm) as well as AR (+ 100%). MET had similar effects as AICAR except that catalase activity was restored and that ATP and mitochondrial potential were further decreased. Compound C showed effects opposite to AICAR on SOD, ROS, LPO and AR and motility parameters. Taken together, our results strongly suggest that, upon freeze-thaw process, AMPK stimulated intracellular anti-oxidative defense enzymes through ATP regulation, thus reducing ROS and lipid peroxidation, and consequently partially restoring several essential sperm functions and leading to a better quality of cryopreserved sperm.

Keywords: chicken sperm, semen cryopreservation, antioxidant enzymes, reactive oxygen species, lipid peroxidation, acrosome reaction, sperm motility, signaling pathways, 5'-AMP activated protein kinase (AMPK).

## Introduction

Semen cryopreservation is a key tool to manage the conservation of animals genetic diversity. This process is highly successful in many mammalian species, but is still difficult in birds due to their specific adaptive reproductive process that enhances their need for a highly efficient energetic supply and maintenance of sperm functions [1-3].

Semen cryopreservation leads to the death of a significant proportion of sperm in all species (40-60% in the chicken): and to the alteration of many functions of the surviving sperm. Different aspects of the energetic metabolism have been reported to be affected by sperm cryopreservation with consequences on motility regulation, sperm membrane integrity and ATP content in mammals [4, 5] as well as in birds [6].

AMPK is a key sensor and regulating kinase of energetic metabolism. Its numerous roles include regulation of glucose, lipid, and protein metabolisms. AMPK is a heterotrimeric protein consisting of a catalytic  $\alpha$ -subunit and two regulatory subunits,  $\beta$  and  $\gamma$ , with different species and tissue-specific isoforms. Phosphorylation of a specific threonine residue (Thr172) of the  $\alpha$ -subunit is crucial for AMPK activity that switches cells from an anabolic to a catabolic state, shutting down the ATP-consuming synthetic pathways and restoring energy balance [7-9]. Recently, AMPK activation has been reported to increase the expression of antioxidant enzymes in monocytes macrophages [10], restore glutathione (GSH) depletion and reduce reactive oxygen species (ROS) levels in rat diabetic fibrosis, kidney tissues and humans [11-13], suppress ROS production in bovine endothelial cells [14] and increase anti-inflammatory reactions in mice leucocytes [15]. However, the AMPK antioxidants stimulating effect on mature sperm properties or their cryopreservation have never been reported.

Because sperm membranes are enriched in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in mammalian [16] and bird species [17], sperm are very susceptible to lipid peroxidation (LPO) with subsequent alterations of structure and functions [18, 19]. Superoxide dismutase (SOD): glutathione peroxidase (GPx): glutathione reductase (GR) and catalase (CAT) are the major antioxidant enzymes naturally present in mammalian and bird semen to protect sperm from lipid peroxidation and to maintain its integrity against ROS [20-22]. Freeze-thaw process have been shown to induce significant reduction in human sperm SOD [23] and in bovine sperm antioxidant defenses [24] with increases in superoxide anions ( $O_2^{\bullet-}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) concentrations as well as inhibitions of both ATP production and sperm movement,

particularly forward progression [25]. Reductions in SOD, GPx, Catalase activities, and increases in ROS and LPO have been shown after chicken sperm cryopreservation [26], but these observations have never been connected to AMPK regulation. The aim of this study was to examine the role of AMPK on the peroxidation/antioxidant defense enzymes system of frozen-thawed sperm and its effects on sperm functions. Chicken semen was diluted in media supplemented or not with AMPK activators (AICAR or MET) or inhibitor (Compound C) and then cryopreserved. AMPK phosphorylation, antioxidant enzymes activities, peroxidation, mitochondrial, energetic indicators, and sperm functions (motility and ability to perform acrosome reaction) were also evaluated before and after cryopreservation.

## Materials and methods

### Chemicals and reagents

All chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA) unless otherwise noted. Compound C (CC) also named Dorsomorphin: 6-[4-(2-Piperidin-1-yl-ethoxy)-phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine, AICAR: 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-d-ribofuranoside (AICAR): and Metformin (MET): 1,1-dimethylbiguanide hydrochloride were obtained from Calbiochem (Billerica, MA). A stock solution of CC was prepared in dimethylsulphoxide (DMSO) and stock solutions of MET and AICAR were prepared in deionized water. Complete mini EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets were from Roche diagnostics (Mannheim, Germany). Tris/glycine buffer (10X): Tris/glycine/SDS buffer (10X): and Precision Plus Protein™ All Blue Standards (Catalog #161-0373) were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA) and anti-AMPKα from Millipore (Billerica, MA): anti-phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPKα and anti-rabbit IgG (H+L) (DyLight™ 680 Conjugate) antibodies from Cell Signaling technology, Inc (Danvers, MA). SYBR-14/PI (LIVE/DEAD sperm viability kit) and JC1 were purchased from Molecular Probes (Saint Aubin, France). The LPO-586 kit was from Oxis Research (Burlingame, CA, US).

### Animals

All experiments were carried out in accordance with the legislation governing the ethical treatment of animals and approved by the Ethics Committee (“Comité d’Éthique en Expérimentation Animale du Val de Loire”, Tours, France, N° 19).

The males were 50-65 week-old adult chickens of the meat type D+/- lines [27]. All the animals were housed in individual battery cages under a 14L/10D photoperiod and fed with a standard diet of 12.5 MJ/day.

### Semen collection

Semen was routinely collected twice a week by the abdominal massage method [28]. Using this technique does not harm the animals: they are simply caught by hand and free to go after the abdominal massage, without suffering any injury. Sperm concentration was determined by light absorption of semen at 530nm with a photometer (IMV, L’Aigle, France). The semen from fifteen different males were gently mixed together after collection and split into four samples further divided according to the number of treatments. Fresh sperm were diluted in

Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) [29] to get a final sperm concentration of  $1 \times 10^9$  cells/ml before further use. BPSE buffer contains 2mM potassium citrate, 45mM sodium glutamate, 1.7mM magnesium chloride, 5mM  $K_2HPO_4$ , 4.7mM  $KH_2PO_4$ , 16mM TES, 32mM sodium acetate and 27.8mM glucose; pH 7.3 and osmolality 350 mOsmol/kg.

## **Sperm cryopreservation**

The semen for freezing was diluted 1:1 with Lake PC [30] (composition: 5.6mM magnesium acetate, 113.5mM sodium glutamate, 50.9mM potassium acetate, 44.4mM D-fructose, 3g polyvinylpyrrolidone; adjusted to 1L with distilled water; adjusted to pH 7.1 with NaOH and osmolality 340mOsmol/kg) in the presence or absence of 5 $\mu$ M CC, or 2mM AICAR, or 1mM MET. At the same time, a second solution of Lake PC with 11% of glycerol cryoprotectant was prepared. They were both cooled separately at 4°C for 10min and then mixed together and equilibrated for another 10min at 4°C [31]. After equilibration, the semen was transferred to 0.5ml plastic freezing straws (IMV, L'Aigle, France) which were sealed and finally frozen from +4 to -35°C at -7°C/min and from -35 to -140°C at -60°C/min using a programmable Minidigitcool 1400 freezer (IMV, L'Aigle, France). The straws were then plunged into liquid nitrogen (-196°C). Six cryopreservations (each cryopreservation including four different samples/treatment) were done.

## **Thawing Procedures**

Sperm was thawed for 4min in a water bath adjusted to 4°C. After thawing, the straws were quickly opened and semen transferred to a glass beaker. Semen was progressively diluted (6 times 2min) with Lake Centri buffer [32] (composition: 5.6mM magnesium acetate, 113.5mM sodium glutamate, 13mM potassium acetate, 44.4mM D-fructose, 62.2mM sodium acetate; adjusted to 1L with distilled water; pH 7.1 and osmolality 350mOsmol/kg) at 4°C to final dilution of 1:19. Glycerol was removed by centrifugation (15min at 700G, 4°C) [31]. After removal of the supernatants, the resulting pellets were resuspended in 100ml of Lake 7.1 [33] (composition: 5.6mM magnesium acetate, 4.2mM tripotassium citrate, 89.9mM sodium glutamate, 44.4mM glucose, 143mM Bes (N, N-bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethanesulfonic acid): 4% NaOH, adjusted to 1L with distilled water; pH 7.1 and osmolality 370mOsmol/kg). Concentration of sperm was estimated at a wavelength of 530nm. Concentrations were close to  $1 \times 10^9$  cells/ml.

## **Sperm viability assessment**

SYBR-14/PI was used to assess sperm viability [34] before freezing and after thawing. Aliquots from each sample were adjusted to a final concentration of  $1 \times 10^9$  cells/ml. Then, sperm were diluted in Lake 7.1 buffer down to  $20 \times 10^6$  cells/ml and  $5 \mu\text{l}$  SYBR-14 was added before the solution was incubated for 10min in darkness at  $4^\circ\text{C}$ . Afterwards,  $2 \mu\text{l}$  of propidium iodide (PI) was added and the incubation was continued for 5min in the dark at  $4^\circ\text{C}$ . After incubation, sperm viability was assessed by fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan 2; Zeiss Gruppe, Jena, Germany): living cells appeared green and dead ones red. A total of 300 sperm per slide were counted (two slides/sample = 1 replicate) and a total of six replicates/treatment examined. All preparations were analyzed by the same observer.

### **Analysis of sperm motility by computer-assisted sperm analysis (CASA) system**

The sperm motility parameters were evaluated by the computer-assisted sperm analysis (CASA) system with an HTM-IVOS (Hamilton-Thorn Motility Analyzer, IVOS) [35]. In this experiment, the parameters measured were percentage of motile sperm (%): curvilinear velocity (VCL, in  $\mu\text{m/s}$ ): path velocity (VAP, in  $\mu\text{m/s}$ ): progressive velocity (VSL, in  $\mu\text{m/s}$ ): straightness coefficient (STR, in %) ( $\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} * 100$ ): linearity (LIN, in %) ( $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} * 100$ ). Following these parameters, percentage of motile sperm was defined as the percentage of spermatozoa showing a  $\text{VAP} > 5 \mu\text{m/s}$ , progressive cells were defined as sperm having  $\text{VAP} > 50 \mu\text{m/s}$  and  $\text{STR} > 75\%$ , rapid cells were defined as having  $\text{VAP} > 50 \mu\text{m/s}$ , slow cells were defined as having  $\text{VAP} < 50 \mu\text{m/s}$ , and static cells (sperm not moving at all) were defined as having  $\text{VAP} \leq 5 \mu\text{m/s}$ .

### **Acrosome reaction assessment with FITC-PNA**

The acrosome reaction (AR) completion was detected by FITC-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) binding [36]. Sperm were incubated at  $41^\circ\text{C}$  with  $50 \mu\text{l}$  of the inner perivitelline layer (IPVL) and  $500 \mu\text{l}$  of NaCl-TES (TES: N-Tris-[hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethanesulfonic acid) containing  $5 \text{mM Ca}^{2+}$  for 5min. The samples were then centrifuged at 400g for 5min and the pellets resuspended in  $100 \mu\text{l}$  NaCl-TES. FITC-PNA was then added ( $1 \text{mg/ml}$ ) and the sperm were incubated for 10min in the dark at  $4^\circ\text{C}$ , then washed in  $440 \mu\text{l}$  of NaCl-TES and centrifuged at 400g for 5min. The pellets were resuspended in  $200 \mu\text{l}$  NaCl-TES for analysis. The sperm that have completed their AR were observed under fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan 2; Zeiss Gruppe, Jena, Germany). A minimum of 100 sperm were

counted for each sample (two slides/sample = 1 replicate) and a total of six replicates/treatment examined. Sperm having completed their AR were characterized by the green fluorescence of the acrosomal region [37, 38]. All preparations were analyzed by the same observer.

## **Assessment of sperm mitochondrial membrane potential**

The activity of mitochondria within the sperm midpiece was determined using the mitochondrial probe 5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Sperm were combined with 2 $\mu$ M JC-1 and incubated for 20min at 37°C. They were examined using standard immunofluorescence technique. Sperm mitochondria with bright orange fluorescence at the midpiece region were considered to be positive (high membrane potential) for mitochondrial activity, whereas those exhibiting a green fluorescence were categorized as having low mitochondrial membrane potential. The percentage of orange stained cells was recorded and considered as the population of sperm with a high mitochondrial membrane potential. A total of 300 sperm per slide were counted (two slides/sample = 1 replicate) under a fluorescence microscope (Zeiss Axioplan 2; Zeiss Gruppe, Jena, Germany) and a total of six replicates/treatment examined. All preparations were analyzed by the same observer. Results are expressed as the average of the percentage of orange stained sperm  $\pm$  SEM.

## **Adenosine triphosphate (ATP) concentration measurement**

After incubation of sperm with or without AMPK modulators, ATP concentration in sperm was measured using the luciferin/luciferase reactions with Cell-Titer-Glo Assay (Promega, Madison, WI, USA). Standards were prepared from ATP standard (F203A, Promega) using serial dilutions to obtain concentrations of  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-11}$  and  $1 \times 10^{-12}$ M. Briefly, the assay buffer and substrate were equilibrated to room temperature, and the buffer was transferred to the substrate and gently mixed with it to obtain a homogeneous solution. After a 30min equilibration of the cell plate to room temperature, addition of 100 $\mu$ l sample and 100 $\mu$ l luciferin/luciferase reagent was carried out in 96-well plates, the content was mixed for 2min and incubation was continued for 10min at room temperature. The luminescence at integration time 1000 (ms) was read using an Ascent Luminoskan Luminometer (Thermo) with Lake 7.1 [33] as a blank for each experiment.

## **Determination of ROS production**

A modified colorimetric Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma–Aldrich) test was used to evaluate sperm ROS production [39, 40]. After having been washed in phosphate buffer (pH 7.0): sperm were resuspended in 200µl of phosphate buffer and incubated with an equal volume of NBT reagent (1mg/ml) at 37°C for 45min. Following incubation, the samples were washed and centrifuged twice at 500g for 10min in phosphate buffer to remove all residual NBT solution, leaving only a cell pellet containing formazan. For quantification, the intracellular formazan was solubilized in 60µl of 2M KOH and DMSO and the absorbance at 630nm was determined. A standard curve was prepared by adding KOH and DMSO to known amounts of NBT. ROS production was expressed as µg of formazan/2.10<sup>8</sup> sperm.

### **Determination of lipid peroxidation (LPO)**

The level of LPO in sperm was determined using commercial kit LPO-586 (Oxis Research, Burlingame, CA, US). The method is based on the reaction of a chromogenic reagent, N-methyl-2-phenylindole (R1) with malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals at 45°C. The colorimetric reaction in 200µl of the supernatant was produced by the addition of 650µl of 10.3mM N-methyl-2-phenyl-indole diluted to a 3:1 acetonitrile:methanol mixture. The reaction was started by the addition of 150µl of methanesulfonic acid. The mixture was strongly vortexed and incubated at 45°C for 1h and then centrifuged at 3000rpm for 10min. The absorbance in the supernatant was read at 586nm (Bio-Rad spectrophotometer; Hercules, CA, USA). The absorbance values were compared to a standard curve in the concentration range of 0.5 to 4µM of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (10mM stock) to calculate the malonyldialdehyde and 4-hydroxyalkanal contents in the samples.

### **Determination of superoxide dismutases (SOD)**

SOD are a group of metalloenzymes that detoxify ROS through the conversion of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and molecular oxygen. Total SOD activity was assessed by a spectrophotometric method based on the inhibition of a superoxide-induced epinephrine oxidation [41]. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> serves as chain propagation species for the autoxidation of epinephrine to adrenochrome. Since SOD competes with this reaction, it slows down adrenochrome formation. After having been washed in phosphate buffer (pH 7.0): 200µl of semen sample were centrifuged at 800g at 4°C for 10min, the supernatants were then collected and 0.05M carbonate buffer (pH 10.2) containing 0.1mM EDTA followed by 30mM epinephrine in 0.05% v/v acetic acid were added. The change in SOD activity was measured at 480nm for 4min. SOD production was expressed as U/2.10<sup>8</sup> sperm. For control, samples were replaced by carbonate buffer, pH 10.2.

## **Determination of catalase activity (CAT)**

CAT activity was evaluated by the method of Goth (1986) [42], which is based on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation by the action of CAT contained in the examined samples. The reaction mixture consisted of 50mM potassium phosphate (pH 7.0): 2µl of 95% ethanol, and 200µl of semen sample incubated at 4°C for 30min. Then 2µl of 1% Triton 100 were added and incubation was performed at 4°C for 10min. The reaction was initiated by the addition of 30mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and absorbance changes were measured at 405nm. The CAT activity was expressed as U/2.10<sup>8</sup> sperm.

## **Determination of glutathione peroxidase activity (GPx)**

The GPx activity was determined using the method described by Lawrence and Burk [43]. GPx catalyzes the reaction between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and reduces glutathione (GSH) to form oxidized glutathione (GSSG) and water utilizing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). The oxidation of NADPH to NADP<sup>+</sup> was accompanied by a decrease in absorbance at 340nm providing a spectrophotometric means for monitoring GPx activity. The GPx activity in sperm was expressed as mU/2.10<sup>8</sup> sperm using the extinction coefficient of NADPH as 6.22. 200µl of semen sample were added with 0.8ml of 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0): 1mM EDTA, 1mM sodium azide, 0.2mM NADPH, 100µl of oxidized glutathione reductase, 1mM GSH, and 0.25mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and was incubated at 30°C for 5min.

## **Determination of Glutathione Reductase (GR)**

Glutathione reductase (GR) catalyses the reduction of oxidized glutathione (GSSG) by NADPH to GSH. The activity of GR in sperm was measured by the method of Pinto and Bartley (1969) [44]. 200µl of semen sample were added with 0.5ml of 0.25M potassium phosphate buffer (pH 7.0): 1ml of 25mM EDTA, 0.1ml of 1mM NADPH, and 1ml of distilled water. The reaction was initiated by the addition of 50mM of GSSG. The activity was expressed as mU/2.10<sup>8</sup> sperm by using the extinction coefficient of NADPH as 6.22. The solution was incubated at 30°C for 5min and then read at 340nm on a spectrophotometer.

## **Lactate concentration measurement**

Sperm were disrupted by ultrasonic treatment in 0.9% NaCl and centrifuged at 14000g for 10 min. The supernatant was recovered and used to measure lactate concentration by enzymatic

method measuring the NADH formed consequently to lactate oxidation by LDH as described by Gutmann and Wahlefeld [45] by spectrophotometry at 340nm. We used BPSE as a blank and a standard curve with increasing concentration of L(+) lactic acid was done before measurement of test samples.

## **Citrate concentration measurement**

The level of citrate in sperm was determined using commercial kit MAK057 (Sigma-aldrich, St Louis, MO, USA). Sperm was diluted in the citrate assay buffer and then centrifuged at 15000g for 10min to remove insoluble material. The colorimetric reaction of the supernatant was produced by the subsequent addition of 44 $\mu$ l Citrate buffer assay and 2 $\mu$ l of Citrate probe. Their action was started by the addition of 2 $\mu$ l of citrate enzyme mix and 2 $\mu$ l Citrate developer. The reaction mixture was vortexed and incubated at room temperature for 30min, protected from light. The absorbance in the supernatant was read at 570nm by spectrophotometer (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). The absorbance values were compared to a standard curve in the concentration range of 0, 2, 4, 6, 8, and 10 $\mu$ l of the 1mM citrate standard, generating 0 (blank): 2, 4, 6, 8, and 10nmole/well standards.

## **Western–Blotting**

For western-blotting experiments, total proteins were extracted from frozen chicken sperm after thawing in lysis buffer (10mM Tris, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 100mM sodium fluoride, 4mM sodium pyrophosphate, 2mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% NP40 IGEPAL containing a protease inhibitor cocktail with EDTA). Cell lysates were centrifuged at 12000g for 30min at 4°C and protein concentration in each supernatant was determined by a colorimetric assay (Bio-Rad DC Protein Assay; Bio-Rad, Hercules, CA). The proteins were then separated by 10% SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and transferred onto nitrocellulose membrane (Whatman Protran (Dassel, Germany)). Afterwards, the membranes were incubated in anti-AMPK $\alpha$  and anti-phospho-Thr172-AMPK $\alpha$  (62kDa) diluted in 5% BSA in TBS-Tween 0.1% (final dilution 1:1000) as primary antibodies overnight at 4°C. Finally, the membranes were further incubated for one hour in anti-rabbit IgG (H+L) (DyLight™ 680 Conjugate) secondary antibody (final dilution 1:2000). Bands were visualized by Infrared Fluorescence using the Odyssey Imaging System (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA) and quantified by Odyssey infrared imaging system software (Application software, version 1.2). AMPK $\alpha$  was used as loading controls.

## **Statistical analysis**

Differences between treatments were analyzed by 1-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison using GraphPad Prism version 5.0d for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA). The minimum level of significance retained was  $P < 0.05$ .

## **Results**

### **AMPK phosphorylation and modulation by its activators and inhibitor in frozen/thawed sperm**

Western blot analyses using antibodies against phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  and total AMPK $\alpha$  (as control) were performed on chicken sperm incubated in the absence or presence of 2mM AICAR, 1mM MET, or 5 $\mu$ M CC during freezing and thawing (Fig 1).

The AMPK phosphorylation was decreased by 30% after the freeze-thaw process. The decrease was higher in the presence of CC (35% decrease) but was only of 15.5% with AICAR and 18.6% with MET compared to fresh semen.

### **Modulation of Reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation (LPO) in frozen-thawed sperm by AICAR, MET or CC**

The freeze-thaw process strongly increased malondialdehyde (MDA) (+200%; Fig 2A) resulting from breakdown of fatty acids and taken as LPO index as well as ROS levels (+130%; Fig 2B). AMPK activators introduced before cryopreservation significantly lowered ROS levels of cryopreserved sperm: -32% for AICAR and -44% for MET compared to the control frozen-thawed without activator (Fig 2B). A decrease in MDA level was also observed with AICAR (-23%) and MET (-32%) compared to the control frozen-thawed without activator (Fig 2A). In contrast, CC increased both ROS (+18%) and MDA (+22%) levels after thawing relative to the control frozen-thawed without inhibitor.

### **Activity of antioxidant enzymes in fresh and frozen thawed sperm**

The antioxidant enzymes activity decreased greatly after cryopreservation with the exception of CAT (P<0.05, Table 1). The CAT activity was singular in frozen-thawed semen as MET significantly increased CAT activity while CAT activity remained statistically unchanged in the presence of AICAR or CC after thawing.

The decreases in SOD, GPx and GR activities following cryopreservation were greatly attenuated in the presence of an activator, AICAR or MET, in the freezing medium. These AMPK activators led to almost full restoration of the initial levels of GPx and GR activities

and to partial restoration of SOD ( $P < 0.05$ ). The presence of CC decreased SOD activity but did not affect GSH and GPx activities measured after thawing (Table 1).

## **Sperm metabolism indices**

### **Mitochondrial membrane potential and ATP**

Cryopreservation induced a 68% loss of mitochondrial potential as measured with the JC1 dye and 70% decrease of ATP content (Fig 3). The presence of MET in the freezing medium led to a 36% decrease of mitochondrial potential compared to control whereas AICAR or CC had no effect. AICAR significantly increased the ATP concentration of the cryopreserved sperm but MET and CC significantly decreased it (Fig 4).

### **Lactate production**

Lactate level in frozen-thawed sperm significantly increased compared to fresh sperm (+200%; Fig 5). Moreover, addition of an AMPK activator before freezing led to an additional significant increase in lactate level (+68% with AICAR and +57% with MET relative to the control without activator). In contrast, addition of AMPK inhibitor CC significantly inhibited the lactate level by 30% after thawing relative to the control frozen-thawed without inhibitor (Fig 5).

### **Citrate production**

The citrate level in frozen-thawed sperm dramatically decreased compared to fresh sperm (-79%; Fig 6). Moreover, addition of AMPK activator before freezing-thawing sperm led to significant increases in citrate levels (+85% with AICAR and +30% with MET compared to the frozen-thawed control). In contrast, addition of CC further lowered the citrate level (-44%) after thawing (Fig 6).

## **Sperm biological functions (motility parameters, acrosome reaction and viability)**

The values presented in Table 2 show a detrimental effect of the cryopreservation process on sperm motility parameters, acrosome reaction and viability. Freezing and thawing led to significant decreases of sperm motility (-37%): VAP, and VSL. The percentage of sperm able to undergo a successful acrosome reaction was dramatically reduced after cryopreservation (-74%). Sperm viability was decreased from 86% (before cryopreservation) to 54% (after cryopreservation and thawing).

### **Effects of AMPK modulators on sperm motility parameters after thawing**

The addition of an activator, either AICAR or MET, significantly increased cryopreserved sperm motility parameters: up to 30% of motile, 86% of progressive and 51% of rapid cells with AICAR and up to 23% of motile, 68% of progressive and 49% of rapid cells with MET (Table 2). Conversely, treatment of chicken sperm with CC significantly decreased motile (-21%) and rapid cells (-20%): but did not significantly affect the percentage of progressive sperm (Table 2). The VAP values were also positively affected by the presence of the AMPK activators but not by the CC inhibitor and the other motility parameters (VSL, VCL, STR, and LIN) did not change in the presence of AMPK modulators compared to control after thawing (Table 2).

### **Effects of AMPK modulators on the ability of cryopreserved sperm to undergo the acrosome reaction**

AR was severely affected by cryopreservation, but partially restored in the presence of AICAR (+43%) or MET (+32%) relative to control frozen-thawed sperm. In contrast, it was even more decreased (-32% relative to control frozen-thawed sperm) in the presence of CC ( $P < 0.05$ , Table 2).

### **Effects of AMPK modulators on cryopreserved sperm viability**

The sperm viability rates were not affected in presence of AICAR or CC (mean 53-56%). In contrast MET significantly increased sperm viability by 8% compared to the control ( $P < 0.05$ , Table 2).

## Discussion

The present study is the first showing a positive effect of AMPK activators on the capacity of mature sperm to restore their biological functions after cryopreservation. It is also the first evaluating the role of AMPK on the quality of bird cryopreserved semen. Our data indicate that AMPK activation plays a key role by contributing to restore antioxidant enzymes system, removing ROS, limiting lipid peroxidation (LPO): and thus allowing an increase in motility, acrosome reaction and viability as well as numerous other parameters of sperm metabolism and functions.

Cryopreservation is well-known for its deleterious effects on most cells and especially for sperm that are highly differentiated cells with inactive genome. Facing such stressful conditions, sperm require energy and defense or reparation systems to preserve their essential functions. The cellular defense mechanisms such as the anti-oxidant enzymes are expected to be highly solicited and the metabolic functions need to adapt. AMPK signaling was thus expected to play an important role. In our study on chicken sperm freezing, we show that a/ the capacity of stimulation of regulating kinases such as AMPK is affected after cryopreservation (Fig 1): b/ the ROS and LPO productions dramatically increase (Fig 2): c/ the ability of sperm to activate the aerobic metabolic pathways involving mitochondrial functions are severely decreased (Figs 3 and 6): and d/ the ATP production is dramatically altered after cryopreservation (Fig 4). Through the strong increase in lactate production induced by cryopreservation (Fig 5): our results clearly suggest that the anaerobic glycolysis pathway is much more solicited after cryopreservation for maintaining basal ATP production. This pathway would be much less efficient than the aerobic pathway and many glycolysis enzymes would be limiting [46]. Finally, the intracellular antioxidant enzymes acting in parallel with oxidative phosphorylations are also altered (Table 1). Part of our results in chicken sperm confirm previous studies in other species on ROS [19] and MDA productions as well as CAT, GPx and SOD levels [26], mitochondrial potential [47] or ATP [6], but most of them are original whatever the species and piece together numerous data from mammals and birds.

Because AMPK is a key kinase involved in stressful conditions, our hypothesis was that its stimulation by different activators would increase motility of cryopreserved sperm as suggested by a previous study on epididymal mouse sperm [48], as well as AR and different metabolic functions. AR was studied with particular attention as it has been previously shown

that chicken sperm cryopreserved in 11% glycerol, as it is the case in the present work, lose most of their AR ability immediately after their initial contact with glycerol [49].

Our observation that the direct (AICAR) and the indirect (MET) AMPK activators increase AMPK phosphorylation together with motility parameters and AR capability of cryopreserved sperm and that the AMPK inhibitor (CC) promotes the opposite effects confirms our hypothesis. These results differed from those obtained with stallion sperm where AMPK modulators (AICAR, MET and CC) did not affect sperm viability and motility after cryopreservation [50]. However, in addition to the use of highly different doses of MET and CC in the two studies, the work on stallion sperm of Cordova *et al.* 2014 [50] used a very specific hypo-metabolic medium of sperm storage with restricted access to energetic substrate that greatly limits the potential comparisons with our study. In another study (Martin-Hidalgo *Det al.* 2013 [51]): a lack of effect of CC was observed in boar sperm stored *in vitro* but the conditions of liquid storage and the much higher CC concentration used in this study do not permit efficient comparisons with our results. More surprisingly, but in accordance with a previous study on epididymal mice sperm [48], MET showed a low but significant positive effect on sperm viability. This is not directly linked to AMPK regulation since AICAR did not exhibit the same effect.

In order to explain the positive action of AMPK stimulation on frozen sperm functions, we investigated the effects of AMPK activators/inhibitor on ROS and LPO formation. Free radicals are known as regulatory mediators in signaling processes, as well as in cell proliferation, differentiation, and migration [52]. However, at high concentrations, free radicals are hazardous for living organisms and damage all major cellular constituents through oxidative stress by the excessive production of ROS [53]. Previous studies have provided evidence that AICAR suppresses ROS production in endothelial cells through AMPK activation [14] and CC showed an opposite effect [54]. Similarly, MET was shown to exert an anti-inflammatory effect on non-alcoholic steato-hepatosis mice through both AMPK-dependent and AMPK-independent pathways [55] by impeding depletion in GPx, SOD, and catalase, and by decreasing ROS and MDA [56]. These findings support the idea that MET and AICAR promote antioxidative responses through AMPK phosphorylation whereas CC promotes a pro-oxidative effect through inhibition of AMPK phosphorylation. Our results on cryopreserved chicken sperm support the same hypothesis since ROS and MDA were reduced by AICAR and MET but increased by CC. However, MET could also directly reduce ROS production via inhibition of complex I. Indeed, the inhibition of complex I by MET is

known to reduce the number of electrons entering the electron transport chain, thus blocking NADH oxidation by complex I [57, 58], and therefore reducing ROS production by both complex I and III [59].

The reduction of the sperm antioxidant enzyme activities due to cryopreservation largely abolished their ability to maintain semen quality in our study. SOD, GPx, GR, and CAT are the major enzymes involved in the removal and detoxification of ROS and have been described as functioning as defense mechanisms against LPO in semen of human and numerous animal species [21, 22]. SOD is considered as the main element of initial antioxidative defense in the semen [60]. SOD catalyzes dismutation of the superoxide anion into molecular oxygen and hydrogen peroxide which, in turn, is removed by GPx and catalase [61]:  $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . GPx catalyzes the reduction reaction, not only of  $H_2O_2$ , but also of organic peroxides, especially lipid peroxides with reduced glutathione (GSH):  $2GPx + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ . Glutathione disulfide (GSSG): which is formed in this reaction, is deleterious to cells by affecting their redox potential, but it is reduced into GSH by glutathione reductase (GR) via oxidation of NADPH:  $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow NADP^+ + 2GSH$ . CAT detoxifies hydrogen peroxide into oxygen and water and has no electron donor requirement:  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ . Avian semen contains two SOD forms (mitochondrial Mn-SOD and cytoplasmic Cu, Zn-SOD). Mn-SOD is the main form in avian sperm (57% of total SOD in chicken). By contrast, Cu, Zn-SOD is the only form present in seminal plasma [62]. GPx is mainly present in its Se-dependent form in chicken (77.7% of total) [62]. Recently, CAT activity was detected in chicken semen [26] but the present study is the first reporting GR activity in chicken sperm.

We have shown that the addition of MET or AICAR to sperm before cryopreservation significantly increased GR, GPx, and SOD activities in frozen-thawed sperm and decreased at the same time LPO and ROS, and that semen quality was improved. In contrast, CC addition decreased SOD activity and increased LPO and ROS with negative effects on sperm quality. Thus, our data indicate that treatment with AMPK activators (MET or AICAR) prevented oxidative burst by increasing the activity of the anti-oxidative enzymes involved in frozen thawed chicken sperm metabolism. Loss of antioxidant enzymes after cryopreservation has been reported to be, at least partly, due to altered membrane integrity of unviable sperm [23]. However, in our study, the increase in anti-oxidant enzymes after cryopreservation could mainly be related to a recovery of the living cells enzymes activity since the stimulation is equivalent with AICAR and MET despite a small positive effect of MET (but not AICAR) on

the percentage of viable sperm. On the other hand, MET (and not AICAR): stimulated CAT activity through an unknown mechanism, probably unrelated to AMPK as found for other cell types [63]. Previous studies have shown that AMPK activation could directly reduce ROS production by restoring Mn-SOD levels in endothelial progenitor cells [64]. In this study, we suggest that AICAR and MET increase the antioxidant enzymes SOD, GR, and GPx activities through AMPK activation. However, the precise mechanism of the antioxidant effect of AMPK activation is not completely understood. Quite recently, Canto *C et al.* 2009 have reported that MET or AICAR activation of AMPK in muscle triggers an increase in the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio, which activates Sirtuin 1 (SIRT1) [65]. AMPK also induces the phosphorylation of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator (PGC-1 $\alpha$ ) and primes it for subsequent deacetylation by SIRT1. PGC-1 $\alpha$  and SIRT1 are present in mitochondria and have a role in regulation of mitochondrial biogenesis [66]. We thus suggest that the impact of AMPK on SIRT1 and on PGC-1 $\alpha$  could then modulate the mitochondrial function, increasing the mitochondrial antioxidant enzymes MnSOD, GPx, GR and decreasing ROS.

The AMPK inhibitor CC also acts directly on AMPK phosphorylation, and has been shown to abolish the effects of hypoxic preconditioning in rat embryonic-heart derived H9c2 cell by decreasing SOD activity and increasing ROS and MDA levels [67]. In our study, the inhibitory effect of CC on AMPK related functions was not complete since CC affected all expected functions with the exception of GPx and GR. Since CC had to be diluted in DMSO that is toxic to sperm, only CC concentrations far lower than those of AICAR and MET could be studied. Therefore, AMPK might not have been completely inhibited by the low CC level used. Overall, our results suggest that AMPK activation in frozen thawed chicken sperm could, at least partially, restore sperm antioxidative activities.

In order to explain the role of AMPK in energy balance and subsequent changes in frozen sperm functions, we investigated the effects of AMPK activators/inhibitors on different metabolic indicators such as mitochondrial activity, ATP, lactate, and citrate levels. Mitochondria are major cell sources of oxidative energy through their production of ATP via the electron transport chain (ETC). The ETC itself is made up of subunits that are encoded by the mitochondrial DNA (except complex II) [68]. The mitochondrial potential was shown to be severely affected by cryopreservation in our study as well as ATP production. However, the relationship between ATP level and mitochondrial activity was not clear as ATP production was modulated after cryopreservation by AMPK activators and inhibitor but not

the mitochondrial potential that was still very low whatever the treatment. Mitochondria are key organelles for the success of aerobic metabolism that are severely affected by the freeze-thaw process. Consequently, the anaerobic glycolysis would be much more solicited after cryopreservation for maintaining basal ATP production as shown by the large increase in lactate production and the opposite decrease in citrate level after cryopreservation. Moreover, AICAR and MET increased both lactate and citrate production after cryopreservation while CC inhibited them. AMPK activation would thus improve the metabolism status through glucose uptake and/or stimulating glycolysis, inducing increased ATP concentration and the production of the lactate end product of glycolysis [69, 70]. But AMP (and AICAR) may also act directly on glycolysis, leading to the suggestion of two routes of action: 1) AMPK-dependent mechanism: the AMPK activation indirectly stimulates the 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1): an allosteric enzyme that occupies the key regulatory position for glycolysis [71], by phosphorylating and activating 6-phosphofructo-2-kinase, the enzyme that synthesizes fructose 2,6-bisphosphate, a potent PFK-1 stimulator [72]; 2) Direct AMP effects: AICAR increases ZMP, which mimics AMP [73], the latter being an activator of PFK1. This may also help to explain some of the metformin effects since Metformin is known to increase AMP in hepatocytes [74].

Citrate is a key TCA cycle intermediate formed by addition of oxaloacetate to the acetyl group of acetyl-CoA to provide ATP for the electron transport chains [74]. The fact that citrate production can still be modified by the AMPK activators/inhibitor after cryopreservation indicates that frozen-thawed sperm still retain a small potential for TCA cycle mobilization despite mitochondrial damages.

Thus, midpiece damages caused by freezing and thawing procedures would lead to significant reduction in TCA cycle/oxidative phosphorylation activity and to large losses of ATP. In reaction, with a major role in regulating cellular energy balance, AMPK stimulates anaerobic glycolysis and the TCA cycle to synthesize ATP. The MET action would be singular since it might stimulate the activation of TCA cycle to produce ATP but not the electron transport chain since MET inhibits Complex I. Thus, we suggest that in conditions of oxidative stress caused by cryopreservation, when oxidative phosphorylation is impaired, the contribution of glycolysis to the synthesis of ATP is required to maintain cell functions and viability.

In conclusion, the results of the present paper demonstrate that chicken sperm cryopreservation in the presence of AMPK activators not only improves the post-thaw motility and AR of healthy sperm by restoring ATP level and antioxidant system (SOD, GPx,

and GR): but also reduces oxidative stress and lipid peroxidation. This is the first assessment of the effects of MET, AICAR, or CC on frozen-thawed chicken sperm through their influence on AMPK activity to reduce the causes of cryopreservation damages in avian sperm. Such data will most certainly be helpful to develop and improve semen handling and storage techniques in the near future.

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the French National Science Infrastructure CRB-Anim, by the French National Institute of Agronomic Research (INRA) and by the Vietnam Education Ministry. We also thank Isabelle Grasseau, Sabine Alves, and Aurore Th  lie (INRA) for help concerning methodology, Nicolas Marcoux for help regarding the english, and the staff of the INRA experimental unit PEAT for the animal breeding and participation to semen collections.

## **Authors Contributions**

Conceived and designed the experiments: TMDN EB. Performed the experiments: TMDN. Assisted with frozen/thawed semen: FS. Analyzed the data: TMDN EB. Wrote and drafted the paper: TMDN. Edited manuscript: EB PF and YC.

## References

1. Blesbois E, Brillard JP (2007) Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal* 1: 1472-1481.
2. Blesbois E (2011) Freezing Avian Semen. *Avian Biology Research* 4: 44-50.
3. Blesbois E (2012) Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation. *Journal of Poultry Science* 49: 141-149.
4. Miki K (2007) Energy metabolism and sperm function. *Soc ReprodFertilSuppl* 65: 309-325.
5. Tchir J, Acker JP (2010) Mitochondria and membrane cryoinjury in micropatterned cells: effects of cell-cell interactions. *Cryobiology* 61: 100-107.
6. Long JA (2006) Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poult Sci* 85: 232–236.
7. Winder WW (2001) Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J ApplPhysiol* 91: 1017–1028.
8. Rubin LJ, Magliola L, Feng X, Jones AW, Hale CC (2005) Metabolic activation of AMP kinase in vascular smooth muscle. *J ApplPhysiol* 98: 296–306.
9. Towler MC, Hardie DG (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 100: 328–41.
10. Buldak L, Labuzek K, Buldak RJ, Kozłowski M, Machnik G, et al. (2013) Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol Rep* 66: 418-429.
11. Park CS, Bang BR, Kwon HS, Moon KA, Kim TB, et al. (2012) Metformin reduces airway inflammation and remodeling via activation of AMP-activated protein kinase. *BiochemPharmacol* 84: 1660-1670.
12. Alhaider AA, Korashy HM, Sayed-Ahmed MM, Mobark M, Kfoury H, et al. (2011) Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. *ChemBiol Interact* 192: 233-242.
13. Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, Noshad S, Mousavizadeh M, et al. (2013) Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *ClinNutr* 32: 179-185.

14. Kim JE, Kim YW, Lee IK, Kim JY, Kang YJ, et al. (2008) AMP-activated protein kinase activation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) inhibits palmitate-induced endothelial cell apoptosis through reactive oxygen species suppression. *J PharmacolSci* 106: 394–403.
15. Gaskin FS, Kamada K, Yusof M, Durante W, Gross G, et al. (2009) AICAR preconditioning prevents postischemic leukocyte rolling and adhesion: role of K (ATP) channels and hemeoxygenase. *Microcirculation* 16: 167-176.
16. Dandekar SP, Nadkarni GD, Kulkarni VS, Punekar S (2002) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *Journal of Postgraduate Medicine* 48:186–189.
17. Blesbois E, Hermier D (2003) Specificity of fatty acids in domestic birds spermatozoa. In *Phospholipids and Male Fertility*. Ed. S De Vriese. Champaign IL: American Oil Chemist's Society Press 7: 73–85.
18. Chatterjee S, Gagnon C (2001) Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *MolReprod Dev* 59: 451-458.
19. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D (1995) Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J ReprodFertil* 103: 17-26.
20. Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, et al. (2004) Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62: 690–701.
21. Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, Irvine DS (1996) Superoxide dismutase in human sperm suspensions: Relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *FreeRadicBiol Med* 21: 495–504.
22. Surai PF, Blesbois E, Grasseau I, Chalah T, Brillard JP, et al. (1998) Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comp BiochemPhysiol B BiochemMolBiol* 120: 527–533.
23. Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT (1994) Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl* 15: 255-265.
24. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C (2000) Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *MolReprod Dev* 55: 282–288.
25. Aitken RJ (1995) Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *ReprodFertil Dev* 7: 659-668.

26. Partyka A, Lukaszewicz E, Nizanski W (2012) Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* 77: 1497-1504.
27. Peron A, Gomez J, Mignon-Grasteau S, Sellier N, Besnard J, et al. (2006) Effects of wheat quality on digestion differ between the D+ and D- chicken lines selected for divergent digestion capacity. *PoultSci* 85: 462-469.
28. Burrows WH, Quinn JP (1937) The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science* 16: 19-24.
29. Sexton TJ (1977) A new poultry semen extender. 1. Effects of extension on the fertility of chicken semen. *PoultSci* 56: 1443-1446.
30. Lake PE (1968) Observations on freezing fowl spermatozoa in liquid nitrogen. VI Cong. *IntReprodAnimInsemArtif* 2: 1633-1635.
31. Seigneurin F, Blesbois E (1995) Effects of freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Theriogenology* 43: 1351-1358.
32. Lake PE, Stewart JM (1978) Preservation of fowl semen in liquid nitrogen- an improved method. *Br PoultSci* 19: 187-194.
33. Lake PE, Ravie O, Adam J MC (1981) Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application to breeding programmes. *Br PoultSci* 22: 71-77.
34. Chalah T, Brillard JP (1998) Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology* 50: 487-493.
35. Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, et al. (2008) Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* 69: 252-261.
36. Horrocks AJ, Stewart S, Jackson L, Wishart GJ (2000) Induction of acrosomal exocytosis in chicken spermatozoa by inner perivitelline-derived N-linked glycans. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 84-89.
37. Lemoine M, Grasseau I, Brillard JP, Blesbois E (2008) A reappraisal of the factors involved in in vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction* 136: 391-399.
38. Lemoine M, Dupont J, Guillory V, Tesseraud S, Blesbois E (2009) Potential involvement of several signalling pathways in initiation of the chicken acrosome reaction. *BiolReprod* 81: 657-665.

39. Esfandiari N, Sharma RK, Saleh RA, Thomas AJ, Agarwal A (2003) Utility of the nitrobluetetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J Androl* 24: 862-870.
40. Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C (2006) A quantitative nitrobluetetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem* 27: 31-44.
41. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J BiolChem* 247: 3170-3175.
42. Goth L (1986) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *ClinicaChimicaActa* 196: 143-151.
43. Lawrence RA, Burk RF (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *BiochemBiophys Res Commun* 425: 503-509.
44. Pinto RE, Bartley W (1969) The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J* 112: 109-115.
45. Gutmann I, Wahlefeld AW (1974) L-(+)-lactate:determination with lactate dehydrogenase and NAD. In *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, Inc, New York, NY 3:1464-1468.
46. Froman DP, Feltmann AJ, Pendarvis K, Cooksey AM, Burgess SC, et al. (2011) Physiology and endocrinology symposium: a proteome-based model for sperm mobility phenotype. *J AnimSci* 89:1330-1337.
47. Partyka A, Nizanski W, Lukaszewicz E (2010) Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology* 74: 1019-1027.
48. Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, Guillory V, Froment P (2014) Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology* 68: 262-268.
49. Mocé E, Grasseau I, Blesbois E (2010) Cryoprotectant and freezing process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *AnimReprodSci* 122: 359–366.
50. Cordova A, Strobel P, Vallejo A, Valenzuela P, Ulloa O, et al. (2014) Use of hypometabolic TRIS extenders and high cooling rate refrigeration for cryopreservation of stallion sperm: presence and sensitivity of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cryobiology* 69: 473-481.
51. Martin-Hidalgo D, Hurtado de Llera A, Yeste M, Cruz Gil M, Bragado MJ, et al. (2013) Adenosine monophosphate-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of

- the quality of extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 80: 285-294.
52. Choi SL, Kim SJ, Lee KT, Kim J, Mu J, et al. (2001) The regulation of AMP activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *BiochemBiophys Res Commun* 287: 92–97.
  53. Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
  54. Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A, et al. (2005) Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism* 54: 829-834.
  55. Kita Y, Takamura T, Misu H, Ota T, Kurita S, et al. (2012) Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 7: e43056.
  56. Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, Kozłowski M, Machnik G, et al. (2014) Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol Rep* 66: 418-429.
  57. Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417: 1–13.
  58. Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, Dominiczak MH, Stepieński JK, et al. (2010) Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes. *BiochemBiophys Res Commun* 393: 268-273.
  59. Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A, et al. (2005) Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism* 54: 829-834.
  60. Surai PF, Fujihara N, Speake BK, Brillard JP, Wishart GJ, et al. (2001) Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. *Asian-Aust. J. Anim. Sci* 14: 1024–1050.
  61. De Lamirande E, Gagnon C (1993) A positive role for superoxide anions in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl* 16: 21–25.
  62. Surai PF, Cerolini S, Wishart GJ, Speake BK, Noble RC, et al. (1998) Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Poult Avian Biol Rev* 9: 11–23.

63. Dai J, Liu M, Ai Q, Lin L, Wud K, et al. (2014) Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. *Chemico-Biological Interactions* 216: 34–42.
64. Wang XR, Zhang MW, Chen DD, Zhang Y, Chen AF (2011) AMP-activated protein kinase rescues the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via manganese superoxide dismutase induction in type 1 diabetes. *Am J PhysiolEndocrinolMetab* 300: E1135-1145.
65. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, et al. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-1060.
66. Aquilano K, Vigilanza P, Baldelli S, Pagliei B, Rotilio G, et al. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *J BiolChem* 285: 21590-21599.
67. Hu L, Zhou L, Wu X, Liu C, Fan Y, et al. (2014) Hypoxic preconditioning protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury through AMPK/eNOS/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway. *Int J ClinExpPathol* 7: 7378–7388.
68. Hüttemann M, Lee I, Samavati L, Yu H, Doan JW (2007) Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *BiochimBiophysActa* 1773:1701-1720.
69. Richardson MC, Ingamells S, Simonis CD, Cameron IT, Sreekumar R, et al. (2009) Stimulation of lactate production in human granulosa cells by metformin and potential involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase. *J ClinEndocrinolMetab* 94: 670-677.
70. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, et al. (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *CurrBiol* 10: 1247-1255.
71. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, et al. (2013) Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* 494: 256-260.
72. Weber G, Singhal RL, Stamm NB, Lea MA, Fisher EA (1966) Synchronous behavior pattern of key glycolytic enzymes: glucokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase. *Adv Enzyme Regul* 4: 59-81.
73. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 229: 558-565.

74. Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW (1997) AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol* 273: 1107-1112.

## Figure Legends

### **Fig 1. Modulators effects on AMPK phosphorylation in frozen-thawed chicken sperm**

Sperm lysates were prepared and resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with anti-phospho-Thr172-AMPK $\alpha$  and anti-AMPK $\alpha$  antibody. Bands for phospho-Thr<sup>172</sup>-AMPK $\alpha$  were detected at 62kDa (top lanes). Total AMPK $\alpha$  was used as loading control (62kDa) (bottom lanes) and the phosphorylated protein AMPK $\alpha$  (Thr172)/total AMPK $\alpha$  ratio is shown at the bottom. Cryopreserved sperm were treated in the presence of an AMPK activator (2mM AICAR (in light gray) or 1mM MET (in diagonals)) or an AMPK inhibitor (5 $\mu$ M CC (in dark gray)) or Control (Ctrl, in white); Fresh semen (checkered pattern). Values represent means  $\pm$  SEM from 6 different experiments (4 samples/experiment). Different superscripts indicate significant differences between Ctrl and treatments (AICAR, MET or CC) in frozen-thawed semen (<sup>a,b,c</sup>, P<0.05). Asterisks indicate statistically significant differences between fresh and frozen-thawed semen (\*, p<0.05).

### **Fig 2. Effect of AMPK inhibitor CC and activators AICAR and MET on ROS and lipid peroxidation (MDA) in frozen-thawed chicken sperm**

Sperm were treated in the presence of an AMPK activator (2mM AICAR (in light gray) or 1mM MET (in diagonals)) or an AMPK inhibitor (5 $\mu$ M CC (in dark gray)) or Control (Ctrl, in white); Fresh semen (checkered pattern). **(A)** Lipid peroxidation (malondialdehyde): **(B)** Reactive oxygen species (ROS). Values represent means  $\pm$  SEM from 6 different experiments (4 samples/experiment). Different superscripts indicate significant differences between Ctrl and treatments (AICAR, MET or CC) in frozen-thawed semen (<sup>a,b,c</sup>, P<0.01). Asterisks indicate statistically significant differences between fresh and frozen-thawed semen (\*, p<0.001).

### **Fig 3. Effect of AMPK inhibitor CC and activators AICAR and MET in mitochondrial membrane potential of frozen-thawed sperm**

Sperm were treated in the presence of an AMPK activator (2mM AICAR (in light gray) or 1mM MET (in diagonals)) or an AMPK inhibitor (5 $\mu$ M CC (in dark gray)) or Control (Ctrl, in white); Fresh semen (checkered pattern). Values represent means  $\pm$  SEM from 6 different experiments (4 samples/experiment). Different superscripts indicate significant differences between Ctrl and treatments (AICAR, MET or CC) in frozen-thawed semen (<sup>a,b</sup>, P<0.05).

Asterisks indicate statistically significant differences between fresh and frozen-thawed semen (\*,  $p < 0.001$ ).

**Fig 4. Effect of AMPK inhibitor CC and activators AICAR and MET on ATP concentration in frozen-thawed sperm**

Sperm were treated in the presence of an AMPK activator (2mM AICAR (in light gray) or 1mM MET (in diagonals)) or an AMPK inhibitor (5 $\mu$ M CC (in dark gray)) or Control (Ctrl, in white); Fresh semen (checkered pattern). Values represent means  $\pm$  SEM from 6 different experiments (4 samples/experiment). Different superscripts indicate significant differences between Ctrl and treatments (AICAR, MET or CC) in frozen-thawed semen (<sup>a,b,c</sup>,  $P < 0.05$ ). Asterisks indicate statistically significant differences between fresh and frozen-thawed semen (\*,  $p < 0.001$ ).

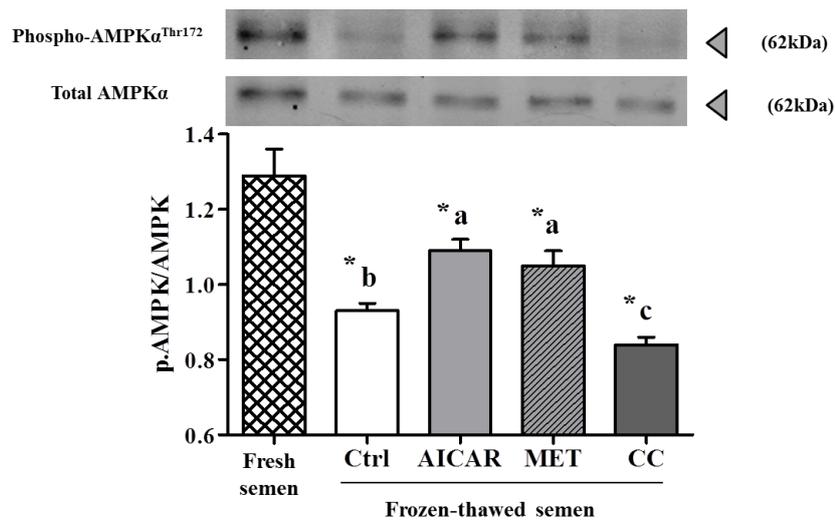
**Fig 5. Effect of AMPK modulators (AICAR, MET and CC) on frozen-thawed sperm lactate production**

Sperm were treated in the presence of an AMPK activator (2mM AICAR (in light gray) or 1mM MET (in diagonals)) or an AMPK inhibitor (5 $\mu$ M CC (in dark gray)) or Control (Ctrl, in white); Fresh semen (checkered pattern). Values represent means  $\pm$  SEM from 6 different experiments (4 samples/experiment). Different superscripts indicate significant differences between Ctrl and treatments (AICAR, MET or CC) in frozen-thawed semen (<sup>a,b,c</sup>,  $P < 0.01$ ). Asterisks indicate statistically significant differences between fresh and frozen-thawed semen (\*,  $p < 0.001$ ).

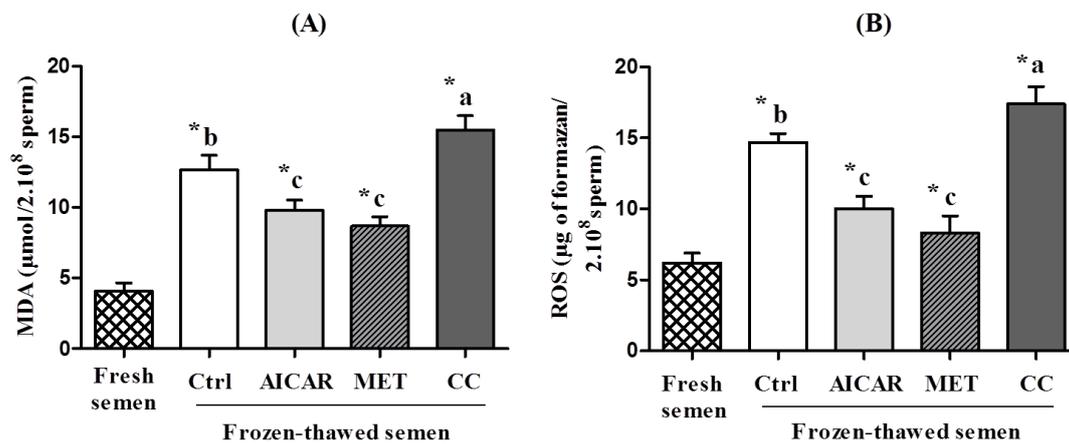
**Fig 6. Effect of AMPK modulators (AICAR, MET and CC) on frozen-thawed sperm citrate level**

Sperm were treated in the presence of an AMPK activator (2mM AICAR (in light gray) or 1mM MET (in diagonals)) or an AMPK inhibitor (5 $\mu$ M CC (in dark gray)) or Control (Ctrl, in white); Fresh semen (checkered pattern). Values represent means  $\pm$  SEM from 6 different experiments (4 samples/experiment). Different superscripts indicate significant differences between Ctrl and treatments (AICAR, MET or CC) in frozen-thawed semen (<sup>a,b,c,d</sup>,  $P < 0.05$ ). Asterisks indicate statistically significant differences between fresh and frozen-thawed semen (\*,  $p < 0.001$ ).

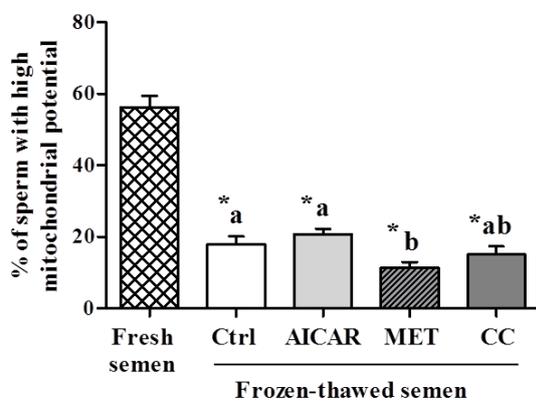
**Fig 1**



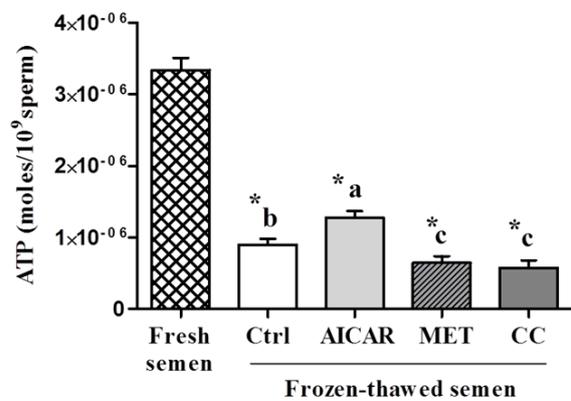
**Fig 2**

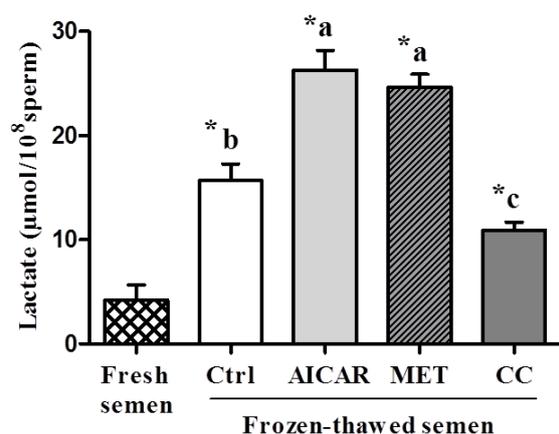
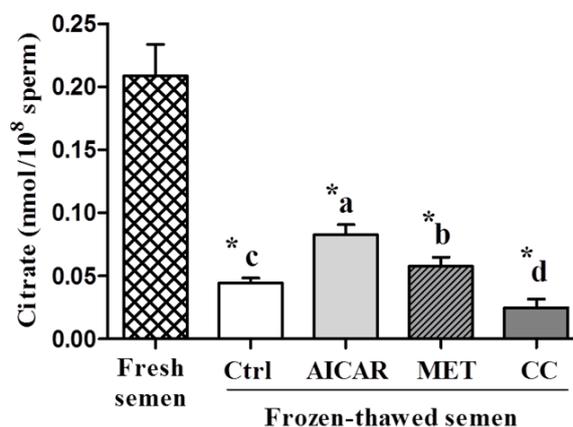


**Fig 3**



**Fig 4**



**Fig 5****Fig 6****Table 1. Antioxidant enzymes activity of fresh and frozen-thawed chicken semen.**

Activity of antioxidant enzymes	Fresh semen	Frozen thawed semen			
		Ctrl	AICAR	MET	CC
SOD [U/2.10 <sup>8</sup> sperm]	26.6±2.5	9.7±0.8 <sup>b*</sup>	16.0±1.6 <sup>a*</sup>	19.2±1.2 <sup>a*</sup>	6.2±1.3 <sup>c*</sup>
CAT [U/2.10 <sup>8</sup> sperm]	6.2±0.6	5.1±0.5 <sup>b</sup>	5.2±0.5 <sup>b</sup>	7.7±0.6 <sup>a</sup>	4.9±0.6 <sup>b</sup>
GPx [mU/2.10 <sup>8</sup> sperm]	7.1±0.9	3.3±0.2 <sup>b*</sup>	5.9±0.9 <sup>a</sup>	5.2±1.1 <sup>a</sup>	3.3±0.2 <sup>b*</sup>
GR [mU /2.10 <sup>8</sup> sperm]	6.5±0.5	4.5±0.1 <sup>b*</sup>	5.4±0.2 <sup>a*</sup>	5.6±0.3 <sup>a</sup>	4.5±0.2 <sup>b*</sup>

Values represent means ± SEM from 6 different experiments (4 samples/experiment).

Different superscripts in lines indicate significant differences between control (Ctrl) and treatments in frozen-thawed semen (P<0.05). Asterisks in lines indicate statistically significant differences between fresh and frozen-thawed semen (\*, p<0.05).

**Table 2. Effect of AICAR, MET or CC treatment on fresh sperm and following cryopreservation.** Sperm were treated with 2mM AICAR, 1mM MET or 5µM CC. The sperm motility parameters were evaluated by the computer-assisted sperm analysis (CASA) system. Sperm viability was assessed using SYBR-14/PI. Acrosome reaction was assessed using a FITC-PNA staining.

Motility parameters	Fresh semen	Frozen/thawed semen			
		Ctrl	AICAR	MET	CC
<b>Motile sperm (%)</b>	76.2 ± 3.0	47.8 ± 2.5 <sup>b*</sup>	62.2 ± 1.4 <sup>a*</sup>	58.8 ± 1.6 <sup>a*</sup>	37.6 ± 2.5 <sup>c*</sup>
<b>Rapid sperm (%)</b>	43.6 ± 3.0	23.5 ± 2.7 <sup>b*</sup>	35.5 ± 4.4 <sup>a*</sup>	35.0 ± 4.2 <sup>a*</sup>	18.8 ± 1.4 <sup>c*</sup>
<b>Progressive (%)</b>	26.4 ± 1.2	12.0 ± 1.1 <sup>b*</sup>	22.3 ± 3.1 <sup>a</sup>	20.2 ± 2.9 <sup>a*</sup>	10.0 ± 0.9 <sup>b*</sup>
<b>VAP (µm/s)</b>	65.8±1.9	54.7±1.9 <sup>b*</sup>	61,1±2.9 <sup>a</sup>	62.5±3.6 <sup>a</sup>	53,0±2.2 <sup>b*</sup>
<b>VSL (µm/s)</b>	53.0±1.4	43.6±2.2 <sup>a*</sup>	49.7±3.6 <sup>a</sup>	50.0±4.7 <sup>a</sup>	41.8±2,1 <sup>a*</sup>
<b>VCL (µm/s)</b>	104.1±3.3	101.1±2.5 <sup>ab</sup>	104.7±3.1 <sup>ab</sup>	105.1±2.7 <sup>a</sup>	98,1±2.4 <sup>b</sup>
<b>STR (µm/s)</b>	74.4±0.6	75.0±1.6 <sup>a</sup>	75.6±2.6 <sup>a</sup>	74.8±1.4 <sup>a</sup>	74.8±0,5 <sup>a</sup>
<b>LIN (µm/s)</b>	45.2±0.7	43.3±2.0 <sup>a</sup>	44.5±2.5 <sup>a</sup>	44.0±2.4 <sup>a</sup>	42,0±1,4 <sup>a*</sup>
<b>AR (%)</b>	36.7 ± 1.0	9.4 ± 0.5 <sup>b*</sup>	13.4 ± 0.7 <sup>a*</sup>	12.4 ± 0.7 <sup>a*</sup>	6.4 ± 0.4 <sup>c*</sup>
<b>Viable sperm (%)</b>	86.2 ± 3.8	53.8 ± 0.9 <sup>b*</sup>	56.2 ± 1.5 <sup>ab*</sup>	57.8 ± 1.3 <sup>a*</sup>	53.6 ± 1.5 <sup>b*</sup>

Values represent means ± SEM from 6 different experiments (4 samples/experiment).

Different superscripts in lines indicate significant differences between control (Ctrl) and treatments in frozen-thawed semen (P<0.05). Asterisks in lines indicate statistically significant differences between fresh and frozen-thawed semen (\*, p<0.05).

## Résumé des résultats et conclusion de l'article :

Nos résultats ont montré que la stimulation de l'AMPK peut améliorer les systèmes antioxydants des spermatozoïdes subissant le processus de congélation/décongélation, et diminuer la peroxydation lipidique (LPO) et les radicaux libres de l'oxygène (ROS).

L'AICAR et la Metformine, ont stimulé les activités de SOD, GPx, et GR après cryopréservation de la semence. La Metformine a stimulé l'activité de la catalase mais pas l'AICAR. L'inhibiteur Compound C a diminué la SOD mais n'a pas eu d'effet sur la GPx, la GR ou la catalase. L'AICAR et la Metformine ont diminué les ROS et la LPO alors que le Compound C les a augmentés.

Les niveaux de lactate et de citrate dans le sperme congelé-décongelé en présence d'AICAR ou de Metformine ont enregistré une augmentation significative par rapport au témoin, tandis que le Compound C a diminué les deux. En outre, l'AICAR a stimulé la production d'ATP alors que la Metformine et le Compound C ne l'ont pas affecté. Enfin, aucun des modulateurs de l'AMPK n'a affecté le potentiel membranaire mitochondrial.

Les fonctions des spermatozoïdes durant le processus de congélation/décongélation ont été sensibles à la présence de modulateurs de l'AMPK. L'AICAR et la Metformine ont stimulé ainsi la mobilité du sperme congelé-décongelé. Le taux de réaction acrosomique du sperme congelé-décongelé a été augmenté significativement en présence d'AICAR ou de Metformine. Le Compound C a diminué également la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes congelés-décongelés. La Metformine a stimulé également la viabilité, mais l'AICAR et le Compound C n'ont pas eu d'effet sur elle.

En conclusion : Nos résultats ont montré que le sperme de coq cryoconservé en présence d'activateurs de l'AMPK présente une meilleure restauration après décongélation de ses fonctions cellulaires, de l'activité de ses enzymes antioxydantes mitochondriales et une diminution de la production de ROS et de LPO. Le statut métabolique des spermatozoïdes cryopréservés sollicite fortement la glycolyse anaérobie (en comparaison des spermatozoïdes non conservés) et la différence d'action des activateurs de l'AMPK testés pourrait bien indiquer que la phosphorylation oxydative est très altérée par le processus de cryopréservation, encourageant la sollicitation des voies métaboliques anaérobies, qui, si elles sont stimulables et fonctionnelles (ce qui semble le cas ici) permettent aux cellules d'accomplir mieux leur fonction. De plus, nous pensons que l'AMPK n'agit pas directement

dans la stimulation des enzymes antioxydantes, mais par l'intermédiaire d'autres facteurs, notamment des combinaisons de stimulation de la biogenèse mitochondriale, comme cela a été montré dans certains types cellulaires somatiques, mais ces voies restent à identifier clairement dans les gamètes.

Il s'agit de la première évaluation des effets de modulateurs de l'AMPK sur le sperme de coq congelé/décongelé 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. Dans cette optique, une étude « *in vivo* » par administration de Metformine et AICAR à doses « physiologiques » sera prochainement effectuée afin d'évaluer la fertilité ultérieure des reproducteurs

**Chapitre III**

**Implication des Calmodulin-dependent protein  
Kinase Kinases (CaMKKs) dans la régulation de la  
stimulation de l'AMPK et des fonctions des  
spermatozoïdes**

### **Chapitre III : Implication des Calmodulin-dependent protein Kinase Kinases (CaMKKs) dans la régulation de la stimulation de l'AMPK et des fonctions des spermatozoïdes**

Dans les spermatozoïdes, la concentration des ions calcium [ $Ca^{2+}$ ]i module la motilité (Ashizawa et al, 1994): la réaction acrosomique (Lemoine et al, 2009) et, chez les mammifères, joue un rôle essentiel durant la capacitation et l'hyperactivation (Breitbart, 2002 ; Ho et al, 2003 ; Harper et al, 2004). Tous ces événements  $Ca^{2+}$ -dépendants doivent être étroitement modulés afin d'être initiés au moment opportun et permettre au spermatozoïde d'atteindre et de féconder l'ovule. Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'AMPK est un senseur important du métabolisme énergétique et joue un rôle dans les fonctions biologiques des spermatozoïdes. Dans les cellules somatiques, une de ses kinases activatrices est la CaMKK, qui est elle-même activée suite à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Nous avons donc cherché à savoir si la CaMKK et un de ses substrats, la CaMKI impliquées dans l'activation de l'AMPK dans les cellules somatiques, le sont également dans les spermatozoïdes de coq.

Aucune de ces kinases n'ayant été caractérisée dans les spermatozoïdes de mammifères ou d'oiseaux, nous avons d'abord recherché la présence de CaMKKs ( $\alpha$  &  $\beta$ ) et de CaMKI dans les spermatozoïdes de coq. La régulation de la phosphorylation de l'AMPK et de CaMKI par CaMKKs a ensuite été évaluée après incubation des spermatozoïdes avec du calcium et un inhibiteur spécifique de CaMKKs (STO 609). Nous avons également approché la voie d'entrée de calcium extracellulaire pour l'activation de l'AMPK et de CaMKI par CaMKKs en utilisant des inhibiteurs de canaux calciques transmembranaires de type L, R et SOCs. Etant donné que l'activation de l'AMPK et de CaMKI par CaMKKs régule également les fonctions des spermatozoïdes, nous avons complété notre étude par des analyses de la mobilité et de la réaction acrosomique des spermatozoïdes suite à l'inhibition des CaMKKs et de canaux calciques.

Ce travail est présenté sous forme d'article : «  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) effect on AMP-activated Protein Kinase (AMPK) regulation of chicken sperm functions » Il a été soumis pour publication dans Plos One.

# **Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases (CaMKKs) effects on AMP-activated Protein Kinase (AMPK) regulation of chicken sperm functions**

Thi Mong Diep Nguyen<sup>1,2,3,4</sup>, Yves Combarous<sup>1,2,3,4</sup>, Christophe Praud<sup>5</sup>, Anne Duittoz<sup>1,2,3,4</sup>,

Elisabeth Blesbois<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

<sup>2</sup>CNRS, UMR7247, F-37380 Nouzilly, France

<sup>3</sup>Université François Rabelais de Tours, F-37000 Tours, France

<sup>4</sup>IFCE, F-37380 Nouzilly, France

<sup>5</sup>INRA, Unité de Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France.

Running title: AMPK activation by CaMKKs in chicken sperm.

\* Corresponding author: Dr Elisabeth Blesbois, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA-UMR85, CNRS-UMR7237, F. Rabelais University, IFCE, 37380 Nouzilly, France.

Phone : +33 247427822; fax : +33 247427778

Email: [Elisabeth.Blesbois@tours.inra.fr](mailto:Elisabeth.Blesbois@tours.inra.fr)

## Abstract

Sperm require high levels of energy to ensure motility and acrosome reaction (AR) accomplishment. The AMP-activated protein kinase (AMPK) has been demonstrated to be strongly involved in the control of these properties. We address here the question of the potential role of calcium mobilization on AMPK activation and function in chicken sperm through the Calcium-calmodulin kinase kinases (CaMKKs) mediated pathway. The presence of CaMKKs and their substrate CaMKI was evaluated by western-blotting and indirect immunofluorescence. Sperm were incubated in presence or absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , or of CaMKKs inhibitor (STO-609). Phosphorylation of AMPK and CaMKI and sperm functions were evaluated.

We demonstrate here the presence of both CaMKKs ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and CaMKI in chicken sperm. CaMKK $\alpha$  and CaMKI were localized in the acrosome, the midpiece, and at much lower levels in the flagellum, whereas CaMKK $\beta$  was mostly localized in the flagellum and much less in the midpiece and the acrosome. The presence of extracellular calcium induced an increase in kinases phosphorylation and sperm activity. STO-609 reduced AMPK phosphorylation in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  but not when it was absent. CaMKI was phosphorylated quicker in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  than in its absence. STO-609 efficiently inhibited sperm motility and AR, both in the presence and absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Our results show for the first time the presence of CaMKKs ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and its substrate, CaMKI in different subcellular compartments in germ cells, as well as the changes in the AMPK regulation pathway, sperm motility and AR related to  $\text{Ca}^{2+}$  entry in sperm through the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKKs/CaMKI pathways. The  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKKs/AMPK pathway is activated only under conditions of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry in the cells.

**Keywords:** chicken sperm, acrosome reaction, motility, signaling pathways, Calmodulin (CaM): Calmodulin-dependent protein kinase kinases (CaMKKs): Calmodulin-dependent protein kinase (CaMKI): 5'-AMP activated protein kinase (AMPK): STO-609,  $\text{Ca}^{2+}$ .

## Introduction

Biological sperm functions such as motility and ability to undergo acrosome reaction (AR) are central to male fertility. These functions are highly dependent on energetic metabolism which is itself largely controlled by 5'-AMP activated protein kinase (AMPK) signaling. The activity of this kinase is regulated by calcium through signaling pathways [1-2] that are not yet determined in chicken sperm. Bird fertilization exhibits numerous specificities comprising oviparity, complex internal fertilization and long term sperm storage in specific oviductal storage tubules, making it a unique model in fertilization studies [3-4] and precious for the sake of comparison with other vertebrate species. Chicken sperm also shows very rapid signaling reactions that make them unique for metabolic signal transduction studies and was chosen as model for the present studies [5-6].

The PKA, PKB and PKC signaling pathways have previously been shown to be involved in chicken motility regulation [7-8] and PKA, PI3K and ERK2 have proved to be key proteins for chicken sperm AR [5]. We have recently demonstrated the involvement of AMPK in chicken sperm regulation of motility and acrosome reaction [6]. Nevertheless, relationships between sperm functions regulation by AMPK and calcium signaling remained to be explored.

The calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinases (CaMKKs) were initially identified as novel members of the protein serine/threonine kinases CaMK family, with 2 forms, CaMKK $\alpha$  and CaMKK $\beta$  (also named CaMKK1 or CaMKK2, respectively): both expressed in the nervous system, in endothelial cells of many areas of the brain, in hematopoietic cells, and at lower levels in testis, spleen, lung, liver and muscle [9-14]. In other tissues, such as kidney, intestine, and heart, the evidence for expression remains less clear [11-12, 14]. Upon interaction with calcium-bound calmodulin (Ca<sup>2+</sup>-CaM): CaMKKs activate two calmodulin-dependent protein kinases: CaMKI through phosphorylation at Thr177 and CaMKIV through phosphorylation at Thr196 [15-17]. CaMKKs can also phosphorylate and activate PKB/Akt [18] and AMPK [1-2]. CaMKK $\beta$  was identified as being an AMPK kinase which phosphorylates AMPK Thr172 in response to an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> [1-2]. CaMKK ( $\alpha$  and  $\beta$ ) inhibition causes a drop in AMPK phosphorylation in boar sperm [19]. However, the full characterization of the mechanisms involved in the regulation of AMPK phosphorylation and activity in sperm, including those involving CaMKKs, remains to be explored.

Calcium signaling pathways are essential in regulating cellular processes such as muscle contraction, neurotransmitter release, cellular metabolism, gene expression, and cell proliferation [20-21]. In sperm,  $\text{Ca}^{2+}$  plays a prominent role during fertilization in all animal species. In mammals, extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is required for epididymal acquisition of sperm motility in mice, rats, pigs, hamsters and bovines [22-26], and is known to regulate both activated and hyperactivated motility [27-29]. Calcium controls flagellar motility through the regulation of dynein-driven microtubule sliding and modulation of the sperm tail waveform [30-31]. It also plays a central role in the acrosome reaction in invertebrates such as echinoderms and in superior vertebrates such as birds [32] and mammals [33-34].

The  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex regulates the activity of multiple enzymes, including adenylate cyclases [35], phosphatases [36], and protein kinases [19]. The CaMKs are among the signaling proteins regulated by  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, and are present in most mammalian tissues: thymus, bone marrow, ovary and testis [37], and are abundant in the brain. CaMKII has been immunolocalized in the acrosomal region and the flagellum of demembrated bovine sperm and has been shown to stimulate hyperactivation [38] and, more widely, to regulate motility [39]. CaM plays a role in mouse sperm capacitation [40]. In fowl sperm, it has been suggested that the increase in intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  and CaM is necessary for the maintenance of sperm motility [41] and Lemoine *et al.* 2009 have shown that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is essential for the initiation of chicken acrosome reaction [32]. However, the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKKs/AMPK pathways and their effects on sperm functions remain to be clearly identified.

The aim of this study was to examine the mechanisms involved in the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKKs/CaMKI signaling pathways upstream of AMPK activation in chicken sperm. We studied the immunolocalization of CaMKKs ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and their downstream kinase CaMKI, the effects of CaMKKs inhibitor (STO 609) and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on AMPK and CaMKI phosphorylation. We also suggested the involvement of  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKKs/AMPK and  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKKs/CaMKI signaling pathways in the regulation of chicken sperm functions.

# Materials and Methods

## Chemicals and reagents

All chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA) unless otherwise noted. Complete mini EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets were from Roche diagnostics (Mannheim, Germany). Tris/glycine buffer (10X): Tris/glycine/SDS buffer (10X): and Precision Plus Protein™ All Blue Standards (Catalog #161-0373) were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA) and anti-AMPK $\alpha$  from Millipore (Billerica, MA): anti-phospho-Thr172-AMPK $\alpha$ , and anti-rabbit IgG (H+L) (DyLight™ 680 Conjugate) from Cell Signaling Technology, Inc (Danvers, MA). Anti- CaMKK $\beta$  was obtained from Abgent INC (San Diego, CA): anti-CaMKI, anti-phospho-Thr177-CaMKI from Novus Europe (Cambridge, UK). PI/Sybr-14 (LIVE/DEAD sperm viability kit).

## Animals and semen collection

All experiments were carried out in accordance with the legislation governing the ethical treatment of animals and approved by the Ethics Committee (“Comité d’Ethique en Expérimentation Animale du Val de Loire”, Tours, France, N° 19).

The animals were 22-55 week-old adult chickens of the D+/- line [42]. The semen was collected by dorso-abdominal massage [43]. Using this technique does not harm the animals: they are simply caught by hand and free to go after the abdominal massage, without suffering any injury. The semen from the four males were then mixed together and centrifuged for 10 min at 600g at 20°C [3, 32]. Sperm pellets were resuspended in Lake 7.1 [44] (0.8g magnesium acetate, 1.28g tripotassium citrate, 15.2g sodium glutamate, 6g glucose, 30.5g Bes (N, N-bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethanesulfonic acid): 58 ml NaOH, and adjusted to 1L with distilled water at pH (7.1) to give a final sperm concentration of  $500 \times 10^6$  cells/ml as measured by optical density absorption with a spectrophotometer (IMV, L’Aigle, France) at 530nm.

## Sperm incubation with modulators of AMPK

Sperm samples were incubated in Lake 7.1 buffer throughout the present work. The Lake 7.1 medium not supplemented with CaCl<sub>2</sub> was called “-Ca<sup>2+</sup>”, the Lake 7.1 medium containing maximum amounts of CaCl<sub>2</sub> (5mM) was called “+Ca<sup>2+</sup>”. All these media had similar osmolalities (400-410 mOsm) and pH (7.1).

Sperm samples were incubated at 35°C in the presence or absence of 5mM Ca<sup>2+</sup> with or without different doses of STO-609 (1, 10 and 50µM). Sperm quality (viability, motility parameters, and acrosome reaction) was measured at different times (5, 15, and 30 min). When necessary, a control with the final concentration of the solvent (0.1% DMSO) was included.

## **Sperm viability assessment**

SYBR-14/PI was used to assess sperm viability [45]. Sperm were diluted in Lake 7.1 buffer down to 20 x 10<sup>6</sup> cells/ml, 5µl Sybr-14 was added and then the solution was incubated for 10 min in darkness at 4°C. Afterwards, 2µl of propidium iodide (PI) were added and the incubation was continued for 5 min in the dark at 4°C. After incubation, sperm cell viability was assessed by fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan 2; Zeiss Gruppe, Jena, Germany): living cells appeared green and dead ones red. A total of 300 sperm per slide were counted (two slides/sample = 1 replicate) and a total of six replicates/treatment were examined. All preparations were analyzed by the same observer.

## **Analysis of sperm motility by computer-assisted sperm analysis (CASA) system**

The sperm motility parameters were evaluated by the computer-assisted sperm analysis (CASA) system with a HTM-IVOS (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA) [46]. In this experiment, the parameters measured were: percentage of motile sperm (%): curvilinear velocity (VCL, in µm/s): path velocity (VAP, in µm/s): progressive velocity (VSL, in µm/s): straightness (STR, in %) (STR=VSL/VAP\*100): linearity (LIN, in %) (LIN=VSL/VCL\*100). Following these parameters, percentage of motile sperm was defined as the percentage of spermatozoa showing a VAP > 5µm/s or VSL > 10µm/s, progressive cells were defined as sperm having VAP > 50µm/s and STR > 75%, rapid cells were defined as having VAP > 50µm/s, or VSL > 30µm/s, slow cells were defined as having VAP < 50µm/s, or VSL < 30µm/s, and static cells (sperm not moving at all) were defined as having VAP ≤ 5µm/s, or VSL ≤ 10µm/s.

## **Acrosome reaction (AR) assessment with FITC-PNA**

The completion of the acrosome reaction was detected by FITC-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) binding [47]. Sperm (500 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were incubated at 41°C with 50µl of

the hen inner perivitelline layer (IPVL) and 500µl of NaCl-TES (TES: N-Tris-[hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethanesulfonic acid) containing 5mM Ca<sup>2+</sup> for 5 min. The samples were then centrifuged at 400g for 5 min and the pellets resuspended in 100µl NaCl-TES. FITC-PNA was then added (1mg/ml) and the sperm were incubated for 10 min in the dark at 4°C, then washed in 440µl of NaCl-TES and centrifuged at 400g for 5 min. The pellets were resuspended in 200µl NaCl-TES for analysis. The sperm having completed their acrosome reaction were identified and counted under fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan 2; Zeiss Gruppe, Jena, Germany). A minimum of 100 sperm were counted for each sample (two slides/sample = 1 replicate) and a total of six replicates/treatment examined. Acrosome reaction was characterized by the green fluorescence of the acrosomal region [5, 32]. All preparations were analyzed by the same observer.

## **Western – Blotting**

For western-blotting experiments, total proteins were extracted from chicken sperm in lysis buffer (10mM Tris, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 100mM sodium fluoride, 4mM sodium pyrophosphate, 2mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% NP40 containing a protease inhibitor cocktail with EDTA). Cell lysates were centrifuged at 12000g for 30 min at 4°C and the protein concentration in each supernatant was determined by a colorimetric assay (Bio-Rad DC Protein Assay; Bio-Rad, Hercules, CA). The proteins were then separated by 10% SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and transferred onto nitrocellulose membrane (Whatman Protran, Dassel, Germany). Afterwards, the membranes were incubated in anti-CaMKKα (50kDa): anti-CaMKKβ (65kDa) or anti-AMPKα (62kDa): anti-phospho-Thr172-AMPKα (62kDa) or anti-CaMKI (41kDa): anti-phospho-Thr177-CaMKI (41kDa) diluted in 5% BSA in TBS-Tween 0.1% (final dilution 1:1000) as primary antibodies overnight at 4°C. Finally, the membranes were further incubated for one hour in anti-rabbit IgG (H+L) (DyLight™ 680 Conjugate) (final dilution 1:2000). The band intensity was analyzed using Odyssey Software, version 1.2 (LICOR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA). AMPKα or CaMKI were used as loading controls.

## **Immunocytochemistry**

CaMKKα, CaMKKβ and CaMKI were localized in chicken sperm by immunocytochemistry. Sperm (500 x 10<sup>6</sup>/ml) were fixed in paraformaldehyde (4%) for 4 min, spread onto a poly-L-lysine slide and then air-dried at room temperature. Afterwards, sperm were washed in PBS (3 x 3 min) and then permeabilized for 10 min with 0.35% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in

PBS. Non-specific binding was blocked with PBS supplemented with 10% goat serum (Sigma–Aldrich) for 30 min at room temperature. Samples were then incubated overnight at 4°C with anti-CaMKK $\alpha$ , anti-CaMKK $\beta$ , or anti-CaMKI, diluted 1:100 in PBS-1% goat serum, rinsed (3 x 3 min) with PBS and then incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (Southern biotech, USA) (1:200 in PBS-1% goat serum) for 1 hour at 4°C. After 3 rinses with PBS, sperm cells were incubated with Cy2 conjugated-Streptavidin (Southern biotech) (1:200 in PBS) for 45 min at room temperature in the dark, rinsed (3 x 3 min) with PBS and incubated with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma–Aldrich) (0.05 $\mu$ g/ml) for 10 min. The presence of CaMKK $\alpha$ , CaMKK $\beta$  and CaMKI in sperm was examined by fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan 2, Zeiss Gruppe, Jena, Germany). Negative controls were performed by omitting primary antibodies.

## **Statistical analyses**

The data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the GraphPad InStat program (GraphPad Software, San Diego, CA). The significance of the difference between treatments was calculated by Student's t-test or analysis of variance (ANOVA). The level of significance was at  $P < 0.05$ .

## Results

### Identification and localization of CaMKKs and its substrate CaMKI in chicken sperm

The presence of CaMKKs ( $\alpha$  and  $\beta$ ) was assessed by western-blotting and indirect immunofluorescence using specific primary antibodies against CaMKK $\alpha$  and CaMKK $\beta$  respectively. Proteins of the predicted size of CaMKK $\alpha$  (~50 kDa) (Fig 1A1) and CaMKK $\beta$  (~65 kDa) (Fig 1B1) were detected by western-blotting in chicken sperm as well as in positive controls (chicken skeletal muscle and testis). These bands were absent in negative controls (data not shown). CaMKK $\alpha$  was localized by immunofluorescence in the acrosomal region and the midpiece, and at a much lower intensity in the entire flagellum (Fig 1A4) whereas CaMKK $\beta$  was mainly localized in the flagellum and the acrosome region, and at a much lower intensity in the midpiece (Fig 1B4).

A band of approximately 41 kDa was detected using the anti-CaMKI antibody, showing the presence of CaMKI in chicken sperm (Fig 2.A1). CaMKI was detected by immunofluorescence in the acrosomal region and the midpiece, as well as in the entire flagellum (Fig 2.A4).

Collectively, the results in Figs 1 and 2 demonstrate that CaMKK $\alpha$  and CaMKK  $\beta$  and their substrate CaMKI are all present in chicken sperm.

### Effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> on chicken sperm functions (motility, viability and AR) and AMPK phosphorylation, and CaMKI phosphorylation - Role of CaMKKs

#### a. Sperm functions (motility, viability and AR)

The percentages of motile and viable cells were determined in sperm incubated for up to 1 hour in media containing increasing concentrations of extracellular Ca<sup>2+</sup> (0.5, 2.5, 5 and 10mM). The maximum percentage of motile sperm was observed with 5mM Ca<sup>2+</sup> (Fig 3): whatever the incubation time (mean increase from 23% to 92%, from 5 to 60 min). With 10mM Ca<sup>2+</sup>, after a rapid increase (of 19%) at 5 min, the percentage of motile sperm then decreased (Fig 3A). The percentage of viable sperm was not affected by Ca<sup>2+</sup> concentrations up to 5mM, but was significantly decreased by 10mM Ca<sup>2+</sup> after 15 and 30 min compared to

the control without  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 3B). A significant decrease of viability was always observed after 1 hour of incubation. The 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was the most efficient to preserve viability, and thus was retained for the further experiments.

The AR percentage rapidly increased in the presence of 5mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 4; mean increases 38% at 5 min, 52% at 15 min, 35% at 30 min). As for viability and motility, monotonous significant decline in the percentage of AR was observed throughout the 60 min incubation and after 60 min the beneficial effect of  $\text{Ca}^{2+}$  was not visible anymore.

### **b. Role of CaMKKs in $\text{Ca}^{2+}$ -dependent AMPK phosphorylation in sperm**

To assess the role of  $\text{Ca}^{2+}$  and CaMKKs in the regulation of AMPK, sperm were incubated with or without extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and in the presence or absence of the CaMKK inhibitor STO-609.

In the absence of STO-609, the phosphorylation of AMPK was increased by 35 % in response to extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  presence (Fig. 5A).

In order to rule out a possible direct action of STO-609 on AMPK, we tested whether 10 $\mu\text{M}$  of the inhibitor could inhibit the stimulatory action of AICAR on AMPK phosphorylation. The data (Fig 5B) show that this was not the case.

The involvement of  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKKs on AMPK phosphorylation was analyzed next with increasing doses of the CaMKK inhibitor STO-609, with or without 5mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . STO-609 inhibited in a dose-dependent fashion AMPK phosphorylation only in the presence of 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 6A). Moreover, the kinetics of STO-609 inhibition of AMPK phosphorylation in the presence of 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  was very rapid (5 min) and lasted for over 60 min (Fig 6B).

### **c. Phosphorylation of CaMKI in chicken sperm**

To further characterize  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in sperm, we then analyzed the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent CaMKI phosphorylation. As shown in Fig 7, CaMKI phosphorylation was increased by 23 % in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and this effect was reversed by pre-treatment with STO-609 which showed an additional decrease in CaMKI phosphorylation at a level significantly lower than the initial level without extracellular calcium ( $P < 0.05$ ).

In order to test the involvement of CaMKI downstream of CaMKKs in the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent AMPK phosphorylation, we studied CaMKI phosphorylation at Thr177 in the presence or absence of 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  and/or of the CaMKK inhibitor 10 $\mu\text{M}$  STO-609. Results reported in Fig

8 show a dose-dependent effect of STO-609 on CaMKI phosphorylation after only 5 min of incubation in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , showing that CaMKKs inhibition decreases CaMKI phosphorylation. After 15 min, STO-609 inhibited CaMKI phosphorylation in the presence as well as in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , suggesting a secondary involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  intracellular store in CaMKK catalysis of CaMKI phosphorylation.

## **Effects of the CaMKKs inhibitor STO-609 on sperm quality**

To test whether AMPK phosphorylation by CaMKKs affects sperm biological parameters, sperm were incubated for 60 min with or without  $\text{Ca}^{2+}$  in the presence of various concentrations of the CaMKK inhibitor STO-609 (1 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$  and 50 $\mu\text{M}$ ). Over the whole 1-50  $\mu\text{M}$  range, STO-609 decreased the motility rate and the AR in a dose-dependent manner at 10 $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ , both in the presence and absence of  $\text{Ca}^{2+}$  but the initial motility and AR levels were even higher in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Tables 1 and 2). The highest STO-609 dose 50  $\mu\text{M}$  totally eliminated the acrosome reaction after 30 min of incubation ( $P < 0.05$ ) (Table 2) and decreased the viable sperm by 17% after 15 min of incubation whatever  $\text{Ca}^{2+}$  was present in the medium or not (Table 3). Conversely, the use of 1 $\mu\text{M}$  and 10 $\mu\text{M}$  STO-609 did not affect the percentage of viable sperm (Table 3). Thus, the most informative STO-609 concentration for studying CaMKK role on sperm quality (viability, motility parameters, and acrosome reaction) was 10 $\mu\text{M}$  which was chosen for the following studies.

### **a. Sperm motility**

10 $\mu\text{M}$  STO-609 reduced most sperm motility parameters (% motile, % rapid cells,  $\mu\text{m/s}$  VAP,  $\mu\text{m/s}$  VSL,  $\mu\text{m/s}$  VCL, % STR, and % LIN) in both the presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Table 4).

In the presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , 10 $\mu\text{M}$  STO-609 significantly decreased motile, rapid and progressive cells after only 5 min of incubation compared to the control, while the other parameters, VAP, VSL, VCL, LIN and STR, were significantly decreased compared to the control after 60 min of incubation. There was about 28% reduction of the percentage of motile sperm in the medium without 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  at 5 min and 62% at 60 min, and 16% reduction of the percentage of motile sperm in the medium with 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  at 5 min and 38% at 60 min. Moreover, the motility parameters were even higher in the presence than in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **b. Sperm acrosome reaction**

The addition of 10 $\mu$ M STO-609 significantly decreased the rate of acrosome reaction in a time-dependent manner, and acrosome reaction was dramatically reduced after 60 min of incubation in the presence or absence of calcium in the medium (Tables 2 and 4). In the absence of calcium, STO-609 promoted a significant decrease of the acrosome reaction rate of ~ 23% and ~ 59% after 5 min and 60 min respectively, and in the presence of 5 $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, the respective decreases after 5 min and 60 min were ~15% and ~60% (Table 4). Thus the STO-609 effects were similar in the presence or absence of Ca<sup>2+</sup>, but the initial level of AR was higher in its presence (P<0.05).

### **c. Sperm viability**

After a 5 min incubation in 10 $\mu$ M STO-609, the percentage of sperm viability as assessed with SYBR14/PI was not affected. However, 60 min of incubation in 10 $\mu$ M STO-609 significantly decreased sperm viability by 9% in both the absence and presence of calcium in the medium compared to their respective controls. After 60 min of incubation, the rate of viable cells decreased by 20% for the controls and by 26% with 10 $\mu$ M STO-609 in both media compared to the measurements taken after 5 min (Tables 3 and 4). The 10 $\mu$ M STO-609 effect was again the same whether Ca<sup>2+</sup> was present or not.

## Discussion

Calcium plays fundamental and diversified roles in cell metabolism. The sperm are highly motile cells with a silent genome [3-4] but they are very reactive in engaging in motility and fertilization. Using chicken sperm as a model, the present study describes the involvement of actors of the calcium-dependent signaling pathways involved in AMPK regulation and activation of sperm functions.

For the first time in germ cells, we localized CaMKK $\alpha$  and CaMKK $\beta$  and showed that CaMKK $\beta$  and phospho-AMPK [6] were localized in the same subcellular compartments: mainly in the acrosome and flagellum. The CaMKK downstream substrate CaMKI was also identified for the first time in germ cells and showed the same subcellular distribution as the other CaMKK form, CaMKK $\alpha$ : mainly in the acrosome and midpiece. The presence of extracellular Ca<sup>2+</sup> in the sperm medium increase by 29% AMPK phosphorylation and 22% CaMKI phosphorylation and sperm functions as expected in case of activation of the Ca<sup>2+</sup>/CaMKKs/CaMKI pathway while the inhibition of this pathway through STO-609 returned to the basal levels observed in absence of Ca<sup>2+</sup>. AMPK is a central actor in energy homeostasis regulation having a key role in activation of sperm function [6]. Activation of AMPK can be induced by phosphorylation through the action of CaMKKs. Here we identified CaMKK $\alpha$  and CaMKK $\beta$  in chicken sperm using western-blotting and we further localized them by immunohistochemistry. CaMKKs are serine threonine kinases that are activated when bound to Ca<sup>2+</sup>/CaM complexes and are thus members of the CaM kinase family [15]. CaMKKs ( $\alpha$  and  $\beta$ ) are upstream of AMPK, especially CaMKK $\beta$  that can directly phosphorylate AMPK-Thr172 [1-2]. More recently, CaMK isoforms (CaMKII) have been localized in the flagella of bovine [38] and mouse sperm [39] but CaMKII is not known to be a CaMKK substrate. Neither CaMKK ( $\alpha$  and  $\beta$ ) nor their CaMKI substrates have ever been localized in sperm before the present study. The localization in the same subcellular compartments of CaMKK $\beta$  and phospho-AMPK supports the view that CaMKK $\beta$  directly phosphorylates AMPK in chicken sperm, as previously shown in other cell types [1-2]. On the other hand, CaMKK $\alpha$  exhibited a quite different subcellular localization (in the acrosome and midpiece): very similar to that of CaMKI. These findings suggest different roles for CaMKKs ( $\alpha$  and  $\beta$ ): each of them acting mainly with different preferential substrates: CaMKK $\beta$  > AMPK and CaMKK $\alpha$  > CaMKI (>AMPK).

Experiments with the presence/absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and/or of the selective CaMKK inhibitor STO-609 provided further evidence that  $\text{Ca}^{2+}$ / CaMKK signaling is effective in the stimulation of AMPK and CaMKI phosphorylations. Both CaMKI and AMPK phosphorylations were stimulated in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations corresponding to normal physiological levels in chicken oviducts [49]. The AMPK activation by CaMKKs in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was close to that which had been previously observed with boar sperm [19]. In the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , the phospho-Thr172-AMPK was not affected by STO-609 even at the highest concentration of 50 $\mu\text{M}$ , showing the dependence of CaMKKs towards extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  for AMPK phosphorylation. STO-609 is a selective inhibitor of both CaMKK $\alpha$  and CaMKK  $\beta$  [56], but it could inhibit other kinases such as AMPK itself when used at high concentrations *in vitro* [1-2, 18]. Such action was ruled out here since AICAR-induced phosphorylation of AMPK was not affected by STO-609. Altogether, we conclude that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -induced AMPK activation in chicken sperm is mediated through CaMKKs.

CaMKK-dependent AMPK activation was found to be very rapid in chicken sperm, in less than 5 min of incubation at 35°C. This is consistent with our previous results showing fast AMPK activation by AICAR in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  [6]. These actions are much faster than in boar sperm and might be related to the fact that chicken sperm are very rapid for all signaling pathways studied up to now, possibly due to lack of the so called “capacitation” process observed in many mammals [19]. Mammalian sperm reside in the female genital tract for a few hours/days between ejaculation and fertilization, in utero-tubal sperm “reservoirs” [50] and need to go through the process of capacitation, which usually lasts several hours, before being able to fertilize the oocyte. Sperm capacitation includes a cascade of biochemical changes that must occur before sperm can effectively interact with an oocyte, such as PKA dependent protein tyrosine phosphorylation, cholesterol efflux, actin polymerization, an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and changes in sperm motility [51]. Binding to the oocyte zona pellucida induces the sperm cell to undergo the acrosomal reaction and to penetrate the oocyte [52]. Unlike mammalian sperm, chicken sperm acquire their motility and part of their fertilization ability as soon as they leave the testis [53-54] whereas they do not show motility hyperactivation before acrosome reaction [32]. Birds’ sperm reside for a very long time in the female genital tract (up to 3 weeks for chicken) before acrosome reaction and fertilization occur [55]. They do not show capacitation or sperm hyperactivation before the acrosome reaction that occurs in less than 5 min *in vitro* [32]. The signaling pathways involved in

acrosome reaction and in motility of chicken sperm are also activated *in vitro* in less than 5 min [5-6]. We thus suggest that these highly differentiated cells with an “inactive genome” could be a model to study “non-genomic” rapid signaling on different metabolic functions.

Furthermore, we show that CaMKI phosphorylation was increased upon extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stimulation, and that this effect was inhibited when the cells were pre-treated with STO-609. This strongly suggests that CaMKKs catalyzed CaMKI phosphorylation. Interestingly, the STO 609-dependent decrease of CaMKI phosphorylation was observed even in the absence of extracellular calcium, albeit more slowly (15 min instead of 5 min). This suggests that CaMKI can be activated in chicken sperm in response to the release of internal stores of cellular  $\text{Ca}^{2+}$ . The sensitivity of CaMKK $\beta$  to STO-609 being 5-fold higher than that of the CaMKK $\alpha$  [57], it might be that the slower CaMKI phosphorylation in the absence of extracellular calcium is mediated through CaMKK $\alpha$  activation by  $\text{Ca}^{2+}$  internal stores, whereas the faster CaMKI phosphorylation in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is mediated through CaMKK $\beta$  activation.

We also demonstrate here for the first time that appropriate doses of the CaMKK inhibitor, STO-609, decreased chicken sperm motility and acrosome reaction without affecting sperm viability. STO-609 rapidly decreased several sperm motility parameters (% motile, % rapid, % progressive) and acrosome reaction after 5 min of incubation in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in parallel with decreased AMPK and CaMKI phosphorylation, suggesting that CaMKKs affect chicken sperm motility and acrosome reaction through AMPK and CaMKI activation. STO-609 also quickly (after 5 min) decreased chicken sperm functions in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . However, in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , the decrease of CaMKI phosphorylation was only observed after 15 min of incubation, indicating the involvement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in CaMKI phosphorylation through CaMKKs, but the decrease was slower than in presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . It can thus be hypothesized that the direct  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKKs/AMPK and indirect  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKKs/CaMKI/AMPK signaling pathways are rapidly involved together in chicken sperm functions in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . In its absence, the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKKs/CaMKI signaling pathways could be involved in chicken sperm motility, and AR in another way which is independent of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry before 15 minutes. Alternatively, the levels obtained without extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  could also take other routes that do not pass through  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMK/CaMKKs signaling pathway since the decrease of sperm functions observed after 5 min of incubation in the presence of STO-609 was equivalent in the presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$  but reached a

basal level lower than in the  $\text{Ca}^{2+}$  presence. Both CaMKI and AMPK can be briefly phosphorylated by CaMKKs, suggesting direct and/or indirect AMPK activation through its Thr172 phosphorylation. However, the possibility that the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex directly affects sperm functions cannot be ruled out. Indeed CaM is present in both the principal piece and the acrosome of mouse sperm [39] and is involved in various  $\text{Ca}^{2+}$  dependent sperm functions in other species [58-60], but through still undefined pathways. Moreover,  $\text{Ca}^{2+}$  is known as a regulator of the predominant flagellar adenylate cyclase variant, soluble adenylyl cyclase (sAC) [61-63], but independently of CaM in mammals [64].

All our results suggest the action of new actors in the regulation of sperm functions that are activated in the presence of extracellular calcium and are summarized in Fig 9. The increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels from extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry in the sperm activates the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKKs/AMPK signaling pathways with further stimulating effects on sperm motility and AR. In the absence of extracellular calcium, the CaMKK pathway is less solicited to phosphorylate AMPK and other ways of action are opened. In all cases, the signaling pathways are quicker with extracellular calcium AMPK pathway (5 min) than with stimulation by intracellular calcium CaMKI pathway (15 min). Taken together, our study brings new information that highlight the complex relationships between calcium signaling pathways and energetic metabolism needed to ensure germ cell functions.

Conclusion: This study provides the first evidence of the localization and action of CaMKK  $\alpha$  and  $\beta$  and CaMKI on extracellular calcium dependent AMPK regulation in sperm cells. We have also shown a new signaling pathway,  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKKs/CaMKI, involved in birds' sperm functions which can be activated with extracellular calcium. These results improve our knowledge of signal transduction in highly reactive cells with silent genomes.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the French National Science Infrastructure CRB-Anim, by the French National Institute of Agronomic Research (INRA) and by the Vietnam Education Ministry. We also thank Isabelle Grasseau, Sabine Alves, Aurore Th  lie (INRA) and Dani  le Klett (CNRS) for help regarding the methodology and discussions, and the staff of the INRA experimental unit PEAT for the animal breeding and participation in semen collections.

## References

1. Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, et al. (2005) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2: 21-33.
2. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, et al. (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2: 9-19.
3. Blesbois E, Brillard JP (2007) Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal* 1: 1472-1481.
4. Blesbois E (2012) Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation. *Journal of Poultry Science*, 49: 141-149.
5. Lemoine M, Dupont J, Guillory V, Tesseraud S, Blesbois E (2009) Potential involvement of several signaling pathways in initiation of the chicken acrosome reaction. *Biol Reprod* 81: 657-665.
6. Nguyen TMD, Alves S, Grasseau I, Metayer-Coustard S, Praud C, et al. (2014) Central role of 5'-AMP-activated protein kinase in chicken sperm functions. *Biol Reprod* 91: 121.
7. Ashizawa K, Wishart GJ, Katayama S, Takano D, Ranasinghe AR, et al. (2006) Regulation of acrosome reaction of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or -type 2A. *Reproduction* 131: 1017-1024.
8. Ashizawa K, Wishart GJ, Ranasinghe AR, Katayama S, Tsuzuki Y (2004) Protein phosphatase-type 2B is involved in the regulation of the acrosome reaction but not in the temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa. *Reproduction* 128: 783-787.
9. Means AR (2008) The Year in Basic Science: calmodulin kinase cascades. *Mol Endocrinol* 22: 2759-2765.
10. Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, et al. (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425: 917-925.
11. Anderson KA, Means RL, Huang QH, Kemp BE, Goldstein EG, et al. (1998) Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *J Biol Chem* 273: 31880-31889.

12. Ohmstede CA, Jensen KF, Sahyoun NE (1989) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase enriched in cerebellar granule cells. Identification of a novel neuronal calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 264: 5866-5875.
13. Ferey JL, Brault JJ, Smith CA, Witczak CA (2014) Constitutive activation of CaMKK $\alpha$  signaling is sufficient but not necessary for mTORC1 activation and growth in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307: E686-694.
14. Anderson KA, Lin F, Ribar TJ, Stevens RD, Muehlbauer MJ, et al. (2012) Deletion of CaMKK2 from the liver lowers blood glucose and improves whole-body glucose tolerance in the mouse. *Mol Endocrinol* 26: 281-291.
15. Soderling TR (1999) The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci* 24: 232-236.
16. Tokumitsu H, Soderling TR (1996) Requirements for calcium and calmodulin in the calmodulin kinase activation cascade. *J Biol Chem* 271: 5617-5622.
17. Tokumitsu H, Enslin H, Soderling TR (1995) Characterization of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J Biol Chem* 270: 19320-19324.
18. Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396: 584-587.
19. Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ (2014) The calcium/CaMKK $\alpha$ /beta and the cAMP/PKA pathways are essential upstream regulators of AMPK activity in boar spermatozoa. *Biol Reprod* 90: 29.
20. Campbell AK (1983) *Intracellular Ca<sup>2+</sup>, its Universal Role as Regulator*. New York: John Wiley & Sons, Inc: 556 pp.
21. Ozawa E (2011) Regulation of phosphorylase kinase by low concentrations of Ca ions upon muscle contraction: the connection between metabolism and muscle contraction and the connection between muscle physiology and Ca-dependent signal transduction. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 87: 486–508.
22. Morton B, Harrigan-Lum J, Albagli L, Jooss T (1974) The activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis by calcium and cyclic nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 56: 372-379.
23. Morton BE, Sagadraca R, Fraser C (1978) Sperm motility within the mammalian epididymis: species variation and correlation with free calcium levels in epididymal plasma. *Fertil Steril* 29: 695-698.

24. Davis BK (1978) Effect of calcium on motility and fertilization by rat sperm in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 157: 54-56.
25. Yanagimachi R (1975) Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea pigs spermatozoa by detergents and other reagents. *Biol Reprod* 13: 519-526.
26. Babcock DF, First NL, Lardy HA (1976) Action of ionophore A23187 at the cellular level. Separation of effects at the plasma and mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 251: 3881-3886.
27. Tash JS, Means AR (1987) Ca<sup>2+</sup> regulation of sperm axonemal motility. *Methods Enzymol* 139: 808-823.
28. Lindemann CB, Goltz JS (1988) Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in triton X-100--extracted rat sperm. *Cell Motil Cytoskeleton* 10: 420-431.
29. Ho HC, Granish KA, Suarez SS (2002) Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca<sup>2+</sup> and not cAMP. *Dev Biol* 250: 208-217.
30. Suarez SS, Varosi SM, Dai X (1993) Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4660-4664.
31. Gross MK, Toscano DG, Toscano WA, Jr. (1987) Calmodulin-mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. *J Biol Chem* 262: 8672-8676.
32. Lemoine M, Grasseau I, Brillard JP, Blesbois E (2008) A reappraisal of the factors involved in in vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction* 136: 391-399.
33. Florman HM, Corron ME, Kim TD, Babcock DF (1992) Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 152: 304-314.
34. Blackmore PF (1999) Extragenomic actions of progesterone in human sperm and progesterone metabolites in human platelets. *Steroids* 64: 149-156.
35. Smith EF (2002) Regulation of flagellar dynein by calcium and a role for an axonemal calmodulin and calmodulin-dependent kinase. *Mol Biol Cell* 13: 3303-3313.
36. Tash JS, Krinks M, Patel J, Means RL, Klee CB, et al. (1988) Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J Cell Biol* 106: 1625-1633.
37. Means AR, Cruzalegui F, LeMagueresse B, Needleman DS, Slaughter GR, et al. (1991) A novel Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase and a male germ cell-specific

- calmodulin-binding protein are derived from the same gene. *Mol Cell Biol* 11: 3960-3971.
38. Ignatz GG, Suarez SS (2005) Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembrated bovine sperm. *Biol Reprod* 73: 519-526.
  39. Schlingmann K, Michaut MA, McElwee JL, Wolff CA, Travis AJ, et al. (2007) Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *J Androl* 28: 706-716.
  40. Zeng HT, Tulsiani DR (2003) Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components. *J Cell Sci* 116: 1981-1989.
  41. Ashizawa K, Tomonaga H, Tsuzuki Y (1994) Regulation of flagellar motility of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of intracellular free Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. *J Reprod Fertil* 101: 265-272.
  42. Peron A, Gomez J, Mignon-Grasteau S, Sellier N, Besnard J, et al. (2006) Effects of wheat quality on digestion differ between the D+ and D- chicken lines selected for divergent digestion capacity. *Poult Sci* 85: 462-469.
  43. Burrows WH, Quinn JP (1937) The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science* 16: 19-24.
  44. Lake PE, Ravie O, McAdam J (1981) Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application to breeding programmes. *Br Poult Sci* 22: 71-77.
  45. Chalah T, Brillard JP (1998) Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology* 50: 487-493.
  46. Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, et al. (2008) Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* 69: 252-261.
  47. Horrocks AJ, Stewart S, Jackson L, Wishart GJ (2000) Induction of acrosomal exocytosis in chicken spermatozoa by inner perivitelline-derived N-linked glycans. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 84-89.
  48. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450.
  49. Nys Y, Zawadzki J, Gautron J, Mills AD (1991) Whitening of brown-shelled eggs: mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. *Poult Sci* 70: 1236-1245.

50. Suarez SS (2002) Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* 37: 140-143.
51. Breitbart H (2003) Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49: 321-327.
52. Primakoff P, Myles DG (2002) Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296: 2183-2185.
53. Ashizawa K, Sano R (1990) Effects of temperature on the immobilization and the initiation of motility of spermatozoa in the male reproductive tract of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 96: 297-301.
54. Howarth B, Jr. (1983) Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis epididymis and vas deferens following intramaginal insemination. *Biol Reprod* 28: 586-590.
55. Okamura F, Nishiyama H (1978) The passage of sperm through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*. *Cell Tissue Res* 188: 497-508.
56. Tokumitsu H, Inuzuka H, Ishikawa Y, Kobayashi R (2003) A single amino acid difference between alpha and beta Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase dictates sensitivity to the specific inhibitor, STO-609. *J Biol Chem* 278: 10908-10913.
57. Tokumitsu H, Inuzuka H, Ishikawa Y, Ikeda M, Saji I, et al. (2002) STO-609, a specific inhibitor of the Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *J Biol Chem* 277: 15813-15818.
58. Bendahmane M, Lynch C, 2nd, Tulsiani DR (2001) Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Arch Biochem Biophys* 390: 1-8.
59. Si Y, Olds-Clarke P (2000) Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 62: 1231-1239.
60. Jones HP, Lenz RW, Palevitz BA, Cormier MJ (1980) Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2772-2776.
61. Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR (1999) Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 79-84.
62. Liguori L, Rambotti MG, Bellezza I, Minelli A (2004) Electron microscopic cytochemistry of adenylyl cyclase activity in mouse spermatozoa. *J Histochem Cytochem* 52: 833-836.
63. Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, et al. (2004) Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2993-2998.

64. Jaiswal BS, Conti M (2003) Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10676-10681.

## Figure legends

### **Fig 1. Presence and localization of CaMKK $\alpha$ and CaMKK $\beta$ in chicken sperm**

Western-blotting of sperm proteins used the anti-CaMKK $\alpha$  and anti-CaMKK $\beta$  antibodies. Cell lysates from chicken muscle and testis (40 $\mu$ g of protein) were used as positive controls. A band of approximately 50 kDa for CaMKK $\alpha$  (A) and approximately 65 kDa for CaMKK $\beta$  (B) were detected. Indirect immunofluorescence of chicken sperm used the anti-CaMKK $\alpha$  or anti-CaMKK $\beta$  antibody. Immunofluorescence staining of CaMKK $\alpha$  (Fig 1A4, green) and CaMKK $\beta$  (Fig 1B4, green) were conducted; nuclei were stained with DAPI (blue). Negative control: primary antibody was not added (Fig 1A2 and Fig 1B2). Black and white image (Figs 1A3 and 1B3). White arrows indicate regions containing CaMKK $\alpha$  and CaMKK $\beta$  immunoreactivity. Scale bar: 10 $\mu$ m.

### **Fig 2. Presence and localization of CaMKI in chicken sperm**

Western-blotting of sperm proteins uses the anti-CaMKI antibody. Cell lysates from chicken testis (40 $\mu$ g of protein) were used as positive controls. A band of approximately 41 kDa for CaMKI (Fig 2A1) was detected. Indirect immunofluorescence of chicken sperm uses the anti-CaMKI antibody. Negative control: primary antibody was not added (Fig 2A2). Black and white image (Fig 2A3). Immunoreactivity was present in the acrosome, in the midpiece and in the flagellum (green) (Fig 2A4). Sperm nuclear DNA was labeled with DAPI (blue). White arrows indicate regions containing CaMKI immunoreactivity. Scale bar: 10 $\mu$ m.

### **Fig 3. Effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> on chicken sperm motility and viability**

Sperm were incubated for up to 60 min at 35°C in medium without Ca<sup>2+</sup> (white) or containing different concentrations of Ca<sup>2+</sup>: 0.5mM (diagonal brick bars): 2.5mM (horizontal bars): 5mM (grey bar): 10mM (diamond bars). The percentages of motile (A) and viable (B) sperm after 5, 15, 30 and 60 min of incubation were determined as described in the Materials and Methods section. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM, n=6. Different superscripts indicate statistically significant differences (P < 0.05).

### **Fig 4. Effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> on chicken sperm AR.**

Sperm were incubated for up to 60 min at 35°C in medium not supplemented with Ca<sup>2+</sup> (-Ca<sup>2+</sup>, white bar) or containing 5mM Ca<sup>2+</sup> (+Ca<sup>2+</sup>, grey bar). The percentages of successful sperm AR after 5, 15, 30 and 60 min of incubation were determined as described in the

Materials and Methods. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM, n=6. Different superscripts letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Fig 5. Effect of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on the AMPK phosphorylation in chicken sperm**

Sperm were incubated at 35°C in the  $-\text{Ca}^{2+}$  or + 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  medium. Proteins from sperm lysates were analyzed by western-blotting using anti-phospho-Thr172-AMPK $\alpha$  or anti-AMPK $\alpha$  as primary antibody. Bands for phospho-Thr172-AMPK $\alpha$  were detected at 62 kDa (top lanes). Total AMPK $\alpha$  (62 kDa) was used as loading control (bottom lanes) and the phosphorylated protein AMPK $\alpha$  (Thr172)/total AMPK $\alpha$  ratio is shown at the bottom. **A)** Effects of increased intracellular 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  on the AMPK phosphorylation after 5 min of incubation. **B)** Effect of STO-609 on AICAR induced AMPK phosphorylation: sperm were incubated with STO-609 for 5 min before adding 1mM AICAR and incubated 5 min more. The control: sperm incubated in the medium with DMSO. Results express the mean  $\pm$  SEM of the mean from 6 different experiments. Different superscripts indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Fig 6. Effects of CaMKKs (STO-609) inhibitor on the AMPK phosphorylation in chicken sperm**

Sperm were incubated at 35°C in the  $-\text{Ca}^{2+}$  or + 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  medium with or without CaMKKs inhibitor STO-609 (1; 10; 50  $\mu\text{M}$ ) for 5 or 15 min. Proteins from sperm lysates were analyzed by western-blotting using anti-phospho-Thr172-AMPK $\alpha$  or anti-AMPK $\alpha$  as primary antibody. Bands for phospho-Thr172-AMPK $\alpha$  were detected at 62 kDa (top lanes). Total AMPK $\alpha$  (62 kDa) was used as loading control (bottom lanes) and the phosphorylated protein AMPK $\alpha$  (Thr172)/total AMPK $\alpha$  ratio is shown at the bottom. **A)** Effects of different concentrations of STO-609 on the AMPK phosphorylation in sperm incubated for 5 min or 15 min. The control (Ctrl): sperm incubated with or without  $\text{Ca}^{2+}$  in the absence of STO-609. **B)** Effects of 10 $\mu\text{M}$  STO-609 on the AMPK phosphorylation in sperm incubated for 5, 15, 30, 60 min. The control (Ctrl): sperm incubated 0 min with or without  $\text{Ca}^{2+}$  in the absence of STO-609. Results express the mean  $\pm$  SEM of the mean from 6 different experiments. Different superscripts indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Fig 7. Effect of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on the CaMKI phosphorylation in chicken sperm**

Sperm incubated at 35°C for 5 min in the  $-\text{Ca}^{2+}$  or +5mM  $\text{Ca}^{2+}$  medium with or without CaMKKs inhibitor STO-609. The control (Ctrl): sperm incubated in the absence both +5mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 10 $\mu\text{M}$  STO-609. Proteins from sperm lysates were analyzed by western-blotting

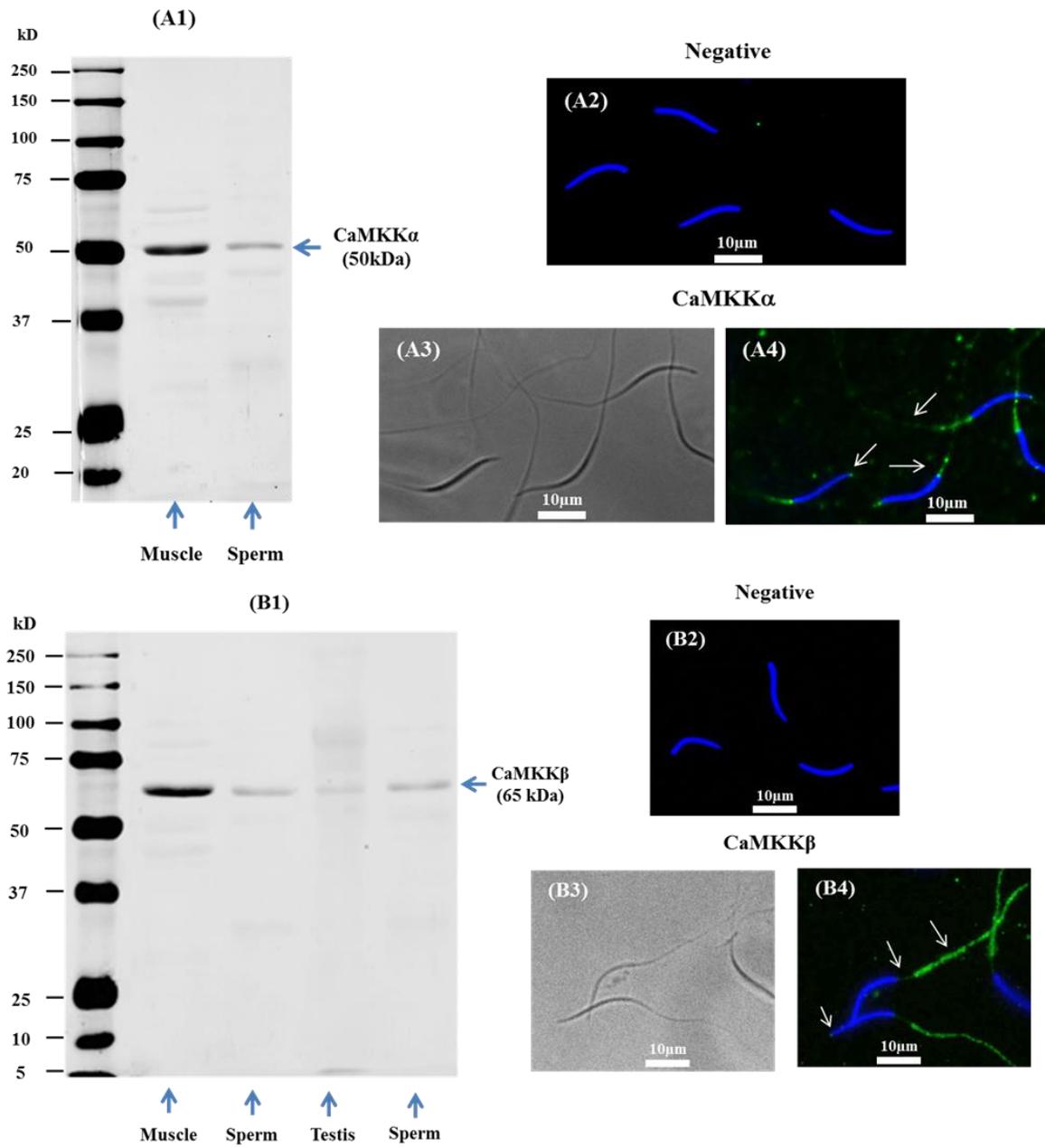
using anti-phospho-Thr177-CaMKI or anti-CaMKI as the primary antibody. Bands for phospho-Thr177-CaMKI were detected at 41 kDa (top lanes). Total CaMKI (41 kDa) was used as loading control (bottom lanes) and the phosphorylated protein CaMKI (Thr177)/total CaMKI ratio is shown at the bottom. Results express the mean  $\pm$  SEM of the mean from 4 different experiments. Different superscripts indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Fig 8. Effects of STO-609 on the CaMKI phosphorylation in chicken sperm**

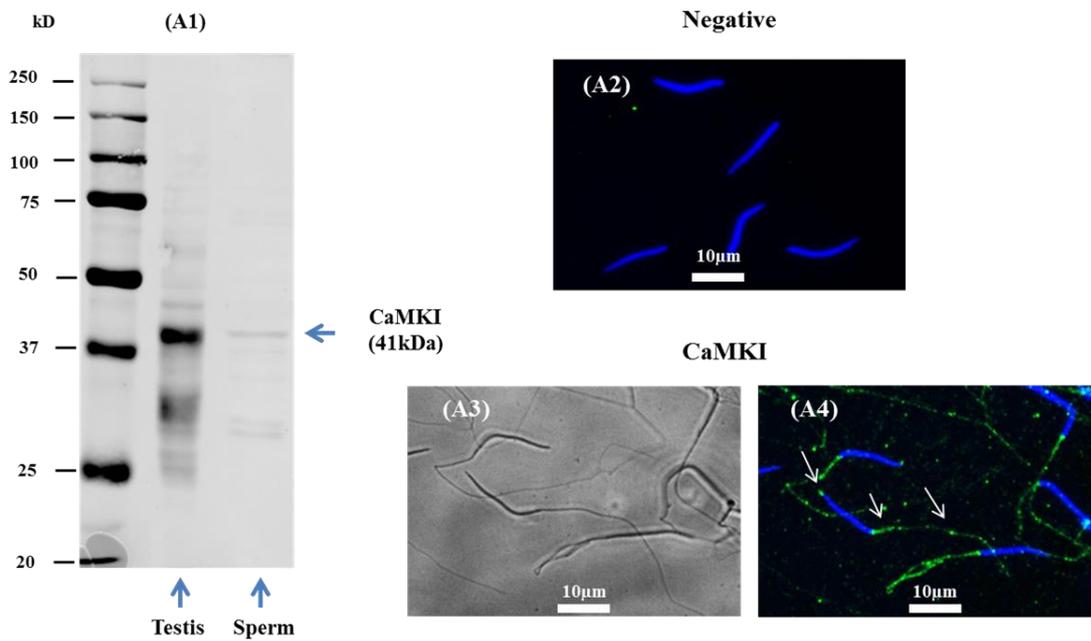
Sperm incubated at 35°C in the  $-Ca^{2+}$  or  $+5mM Ca^{2+}$  medium with or without CaMKKs inhibitor STO-609 (0; 1; 10; 50  $\mu$ M) at 5 min and 15 min. The control (Ctrl): sperm incubated with or without  $Ca^{2+}$  in the absence of STO-609. Proteins from sperm lysates were analyzed by western-blotting using anti-phospho-Thr177-CaMKI or anti-CaMKI as the primary antibody. Bands for phospho-Thr177-CaMKI were detected at 41 kDa (top lanes). Total CaMKI (41 kDa) was used as loading control (bottom lanes) and the phosphorylated protein CaMKI (Thr177)/total CaMKI ratio is shown at the bottom. Results express the mean  $\pm$  SEM of the mean from 4 different experiments. Different superscripts indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Fig 9. Proposed scheme of  $Ca^{2+}$  signaling pathways leading to regulation of AMPK activity in avian sperm.** This schematic diagram shows potential mechanisms of calcium role through CaMKK stimulation in chicken sperm. They all activate AMPK and CaMKI, which leads to metabolic improvements, leading themselves to the control of sperm functions. Solid arrows and blocked arrows illustrate more established relationships between stimuli, signals, improved metabolic status and control of avian sperm functions. Solid black arrows indicate  $Ca^{2+}$ /CaMKKs/AMPK signaling pathways. Dashed black arrows indicate  $Ca^{2+}$ /CaM/CaMKKs/CaMKI signaling pathways. Curved arrows (black) indicate AMPK phosphorylation, CaMKI phosphorylation; dashed grey arrows with a question mark are used for hypotheses.

**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

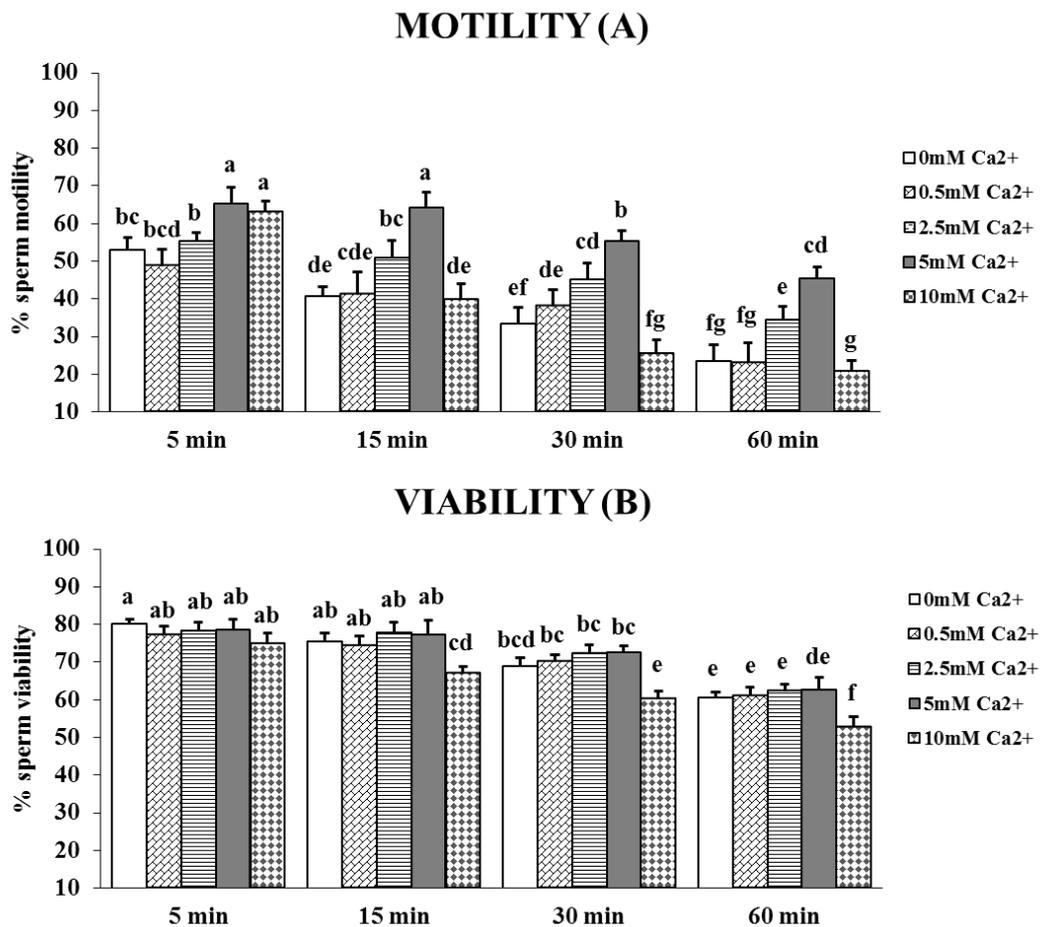


Fig. 4

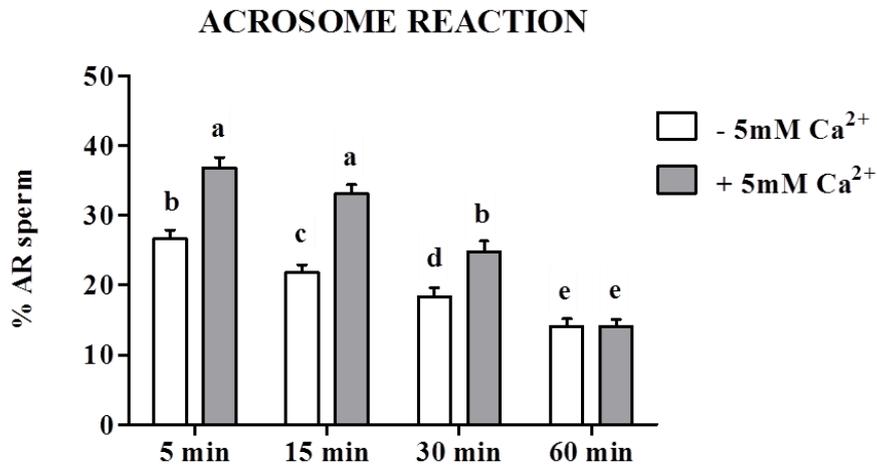
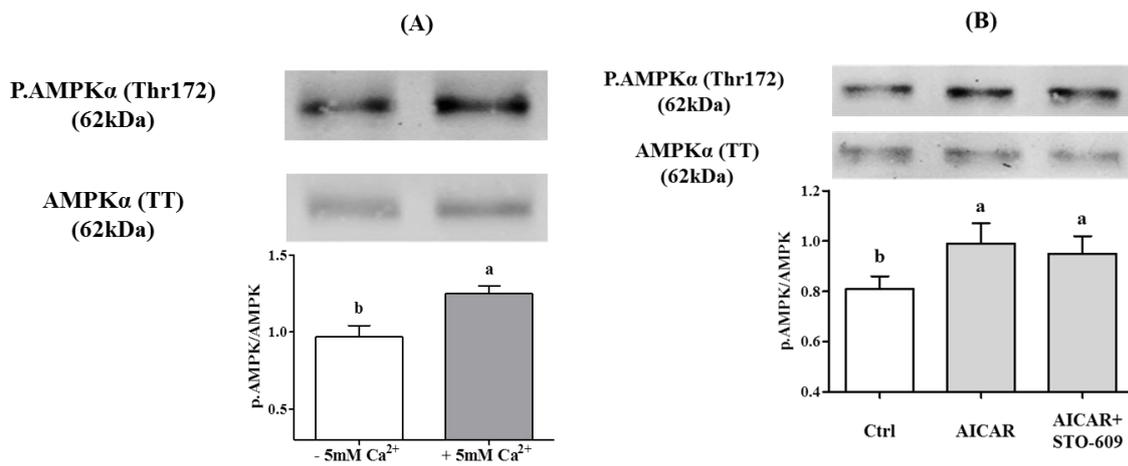
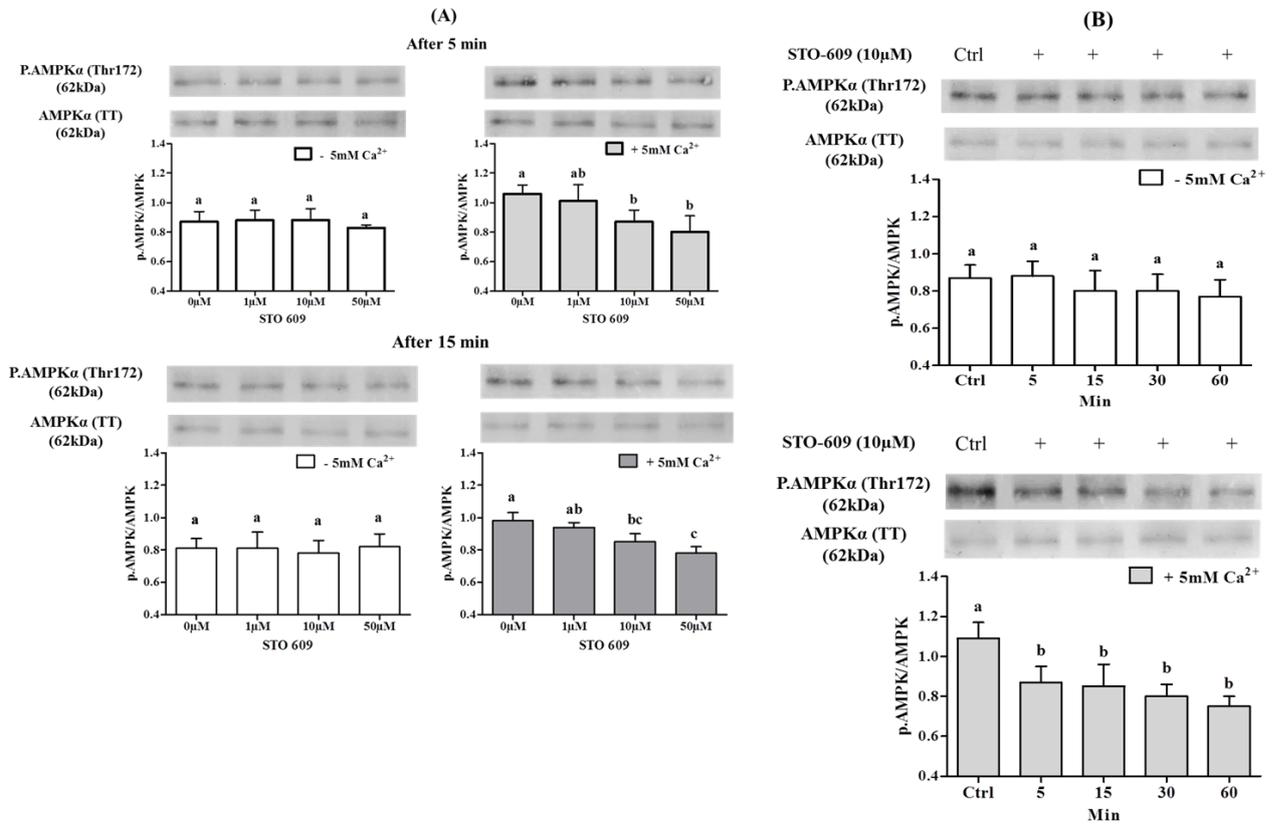


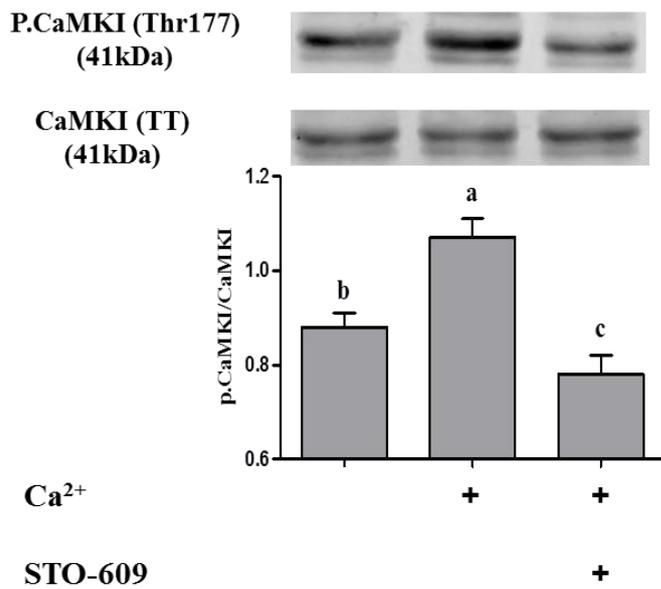
Fig. 5



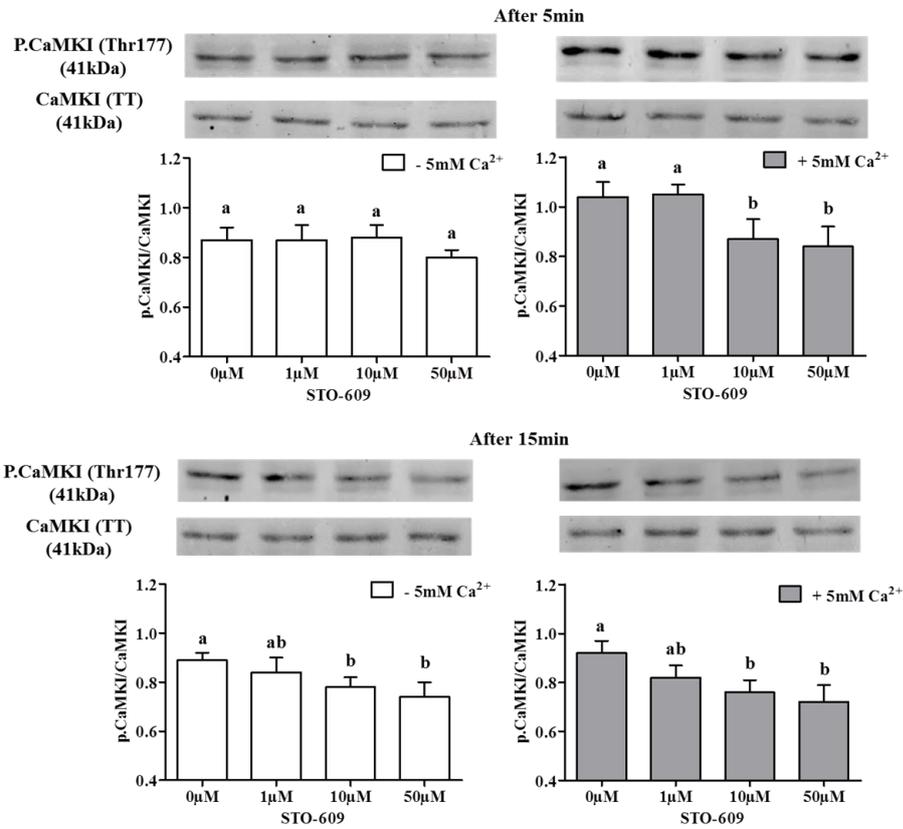
**Fig. 6**



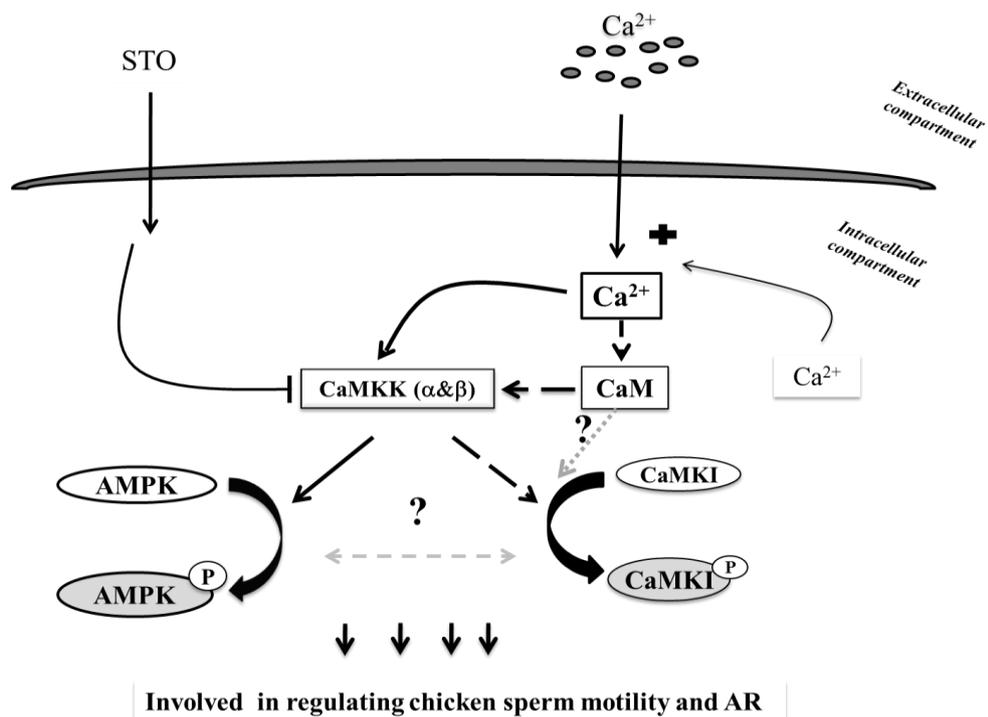
**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Table 1. Effect of STO-609 treatment on motility of chicken sperm.**

Time of incubation	- Ca <sup>2+</sup>				+ 5µM Ca <sup>2+</sup>			
	STO-609 concentration (µM)							
	0 µM	1 µM	10 µM	50 µM	0 µM	1 µM	10 µM	50 µM
5 min	54.7±3.0 <sup>bc</sup>	49.7±3.6 <sup>c</sup>	39.2±4.7 <sup>d</sup>	31.7±5.7 <sup>d</sup>	63.7±4.2 <sup>a</sup>	58.0±2.7 <sup>ab</sup>	53.7±2.3 <sup>bc</sup>	40.0±3.4 <sup>d</sup>
15 min	40.5±4.7 <sup>cd</sup>	30.7±5.3 <sup>de</sup>	22.7±5.3 <sup>ef</sup>	17.8±4.6 <sup>f</sup>	64.5±4.8 <sup>a</sup>	50.5±2.5 <sup>b</sup>	41.5±2.1 <sup>c</sup>	34.0±3.6 <sup>d</sup>
30 min	31.8±6.1 <sup>bc</sup>	23.5±6.4 <sup>c</sup>	9.3±2.1 <sup>d</sup>	8.3±2.1 <sup>d</sup>	51.0±4.0 <sup>a</sup>	37.3±3.2 <sup>b</sup>	32.3±4.5 <sup>bc</sup>	25.5±3.6 <sup>c</sup>
60 min	21.7±5.5 <sup>bc</sup>	13.5±4.9 <sup>cd</sup>	8.2±2.8 <sup>de</sup>	4.5±1.3 <sup>e</sup>	37.8±4.9 <sup>a</sup>	29.3±4.4 <sup>ab</sup>	23.3±4.0 <sup>b</sup>	18.0±3.4 <sup>c</sup>

Values represent means ± SEM from 6 different experiments.

Different superscripts indicate statistically significant differences of values within a row (P<0.05).

**Table 2. Effect of STO-609 treatment on acrosome reaction of chicken sperm.**

Time of incubation	- Ca <sup>2+</sup>				+ 5µM Ca <sup>2+</sup>			
	STO-609 concentration (µM)							
	0 µM	1 µM	10 µM	50 µM	0 µM	1 µM	10 µM	50 µM
5 min	26.6±1.5 <sup>b</sup>	22.3±1.5 <sup>cd</sup>	20.4±1.0 <sup>d</sup>	13.8±1.1 <sup>f</sup>	31.0±1.5 <sup>a</sup>	28.2±1.5 <sup>ab</sup>	26.4±1.7 <sup>b</sup>	17.1±1.0 <sup>e</sup>
15 min	20.0±1.5 <sup>b</sup>	16.4±0.8 <sup>c</sup>	12.2±1.3 <sup>d</sup>	8.4±1.0 <sup>e</sup>	32.2±1.1 <sup>a</sup>	21.5±1.5 <sup>b</sup>	16.9±1.3 <sup>c</sup>	10.5±0.5 <sup>de</sup>
30 min	17.3±1.9 <sup>b</sup>	12.7±0.5 <sup>c</sup>	9.2±0.8 <sup>d</sup>	6.4±0.6 <sup>e</sup>	24.3±1.8 <sup>a</sup>	15.3±1.3 <sup>b</sup>	9.1±0.9 <sup>d</sup>	5.4±0.7 <sup>e</sup>
60 min	12.9±1.5 <sup>a</sup>	9.2±0.9 <sup>b</sup>	5.3±0.8 <sup>c</sup>	4.2±0.5 <sup>d</sup>	14.0±0.7 <sup>a</sup>	8.4±0.7 <sup>b</sup>	5.6±0.5 <sup>c</sup>	4.0±0.9 <sup>d</sup>

Values represent means ± SEM from 6 different experiments.

Different superscripts indicate statistically significant differences of values within a row (P<0.05)

**Table 3. Effect of STO-609 treatment on viability of chicken sperm.**

Time of incubation	- Ca <sup>2+</sup>				+ 5µM Ca <sup>2+</sup>			
	STO-609 concentration (µM)							
	0 µM	1 µM	10 µM	50 µM	0 µM	1 µM	10 µM	50 µM
5 min	79.3±1.7 <sup>a</sup>	79.3±1.2 <sup>a</sup>	78.8±1.6 <sup>a</sup>	76.3±2.3 <sup>a</sup>	80.3±2.1 <sup>a</sup>	79.4±0.8 <sup>a</sup>	79.2±1.6 <sup>a</sup>	76.6±2.2 <sup>a</sup>
15 min	77.6±2.4 <sup>a</sup>	72.2±1.9 <sup>a</sup>	70.2±1.0 <sup>a</sup>	64.6±2.2 <sup>b</sup>	78.9±1.4 <sup>a</sup>	68.8±1.9 <sup>a</sup>	69.3±1.8 <sup>a</sup>	63.5±2.1 <sup>b</sup>
30 min	70.4±1.4 <sup>a</sup>	69.6±2.1 <sup>a</sup>	64.1±2.3 <sup>b</sup>	63.3±1.5 <sup>b</sup>	72.5±1.2 <sup>a</sup>	69.4±1.1 <sup>a</sup>	62.1±1.2 <sup>b</sup>	62.5±1.7 <sup>b</sup>
60 min	64.6±1.7 <sup>a</sup>	64.6±1.7 <sup>a</sup>	58.8±1.4 <sup>b</sup>	54.9±1.5 <sup>cd</sup>	62.9±1.8 <sup>a</sup>	64.3±1.6 <sup>a</sup>	57.2±1.4 <sup>bc</sup>	54±1.1 <sup>d</sup>

Values represent means ± SEM from 6 different experiments.

Different superscripts indicate statistically significant differences of values within a row (P<0.05).

**Table 4. Effects of CaMKK inhibitor STO-609 (10µM) on sperm functions in the absence or presence of extracellular Ca<sup>2+</sup>.**

Motility parameters	- Ca <sup>2+</sup>				+ 5µM Ca <sup>2+</sup>			
	5 MIN		60 MIN		5 MIN		60 MIN	
	Control	STO	Control	STO	Control	STO	Control	STO
Motile (%)	54.7±3.0 <sup>b</sup>	39.2±4.7 <sup>c</sup>	21.7±5.5 <sup>d</sup>	8.2±2.8 <sup>e</sup>	63.7±4.2 <sup>a</sup>	53.7±2.3 <sup>b</sup>	37.8±4.9 <sup>c</sup>	23.3±4.0 <sup>d</sup>
Progressive (%)	19.3±2.4 <sup>b</sup>	13.7±1.9 <sup>c</sup>	5.8±1.9 <sup>d</sup>	1.7±1.0 <sup>e</sup>	28.0±3.6 <sup>a</sup>	21.5±2.4 <sup>b</sup>	12.0±2.8 <sup>c</sup>	5.7±1.0 <sup>d</sup>
Rapid(%)	35.5±3.9 <sup>ab</sup>	25.0±4.7 <sup>c</sup>	11.3±2.7 <sup>d</sup>	3.8±1.4 <sup>e</sup>	45.3±4.9 <sup>a</sup>	33.5±2.4 <sup>b</sup>	23.7±3.9 <sup>c</sup>	12.8±2.2 <sup>d</sup>
VAP (µm/s)	58.3±4.3 <sup>b</sup>	57.0±4.5 <sup>b</sup>	56.8±4.0 <sup>b</sup>	43.3±4.9 <sup>c</sup>	70.0±5.7 <sup>a</sup>	68.1±4.8 <sup>a</sup>	58.6±3.4 <sup>b</sup>	46.5±4.3 <sup>c</sup>
VSL (µm/s)	43.5±4.8 <sup>bc</sup>	42.0±4.9 <sup>bc</sup>	43.7±4.1 <sup>bc</sup>	32.6±3.2 <sup>d</sup>	56.9±6.5 <sup>a</sup>	55.0±5.1 <sup>a</sup>	45.5±3.7 <sup>b</sup>	35.6±3.8 <sup>cd</sup>
VCL (µm/s)	108.6±5.9 <sup>a</sup>	109.0±6.4 <sup>a</sup>	105.1±5.5 <sup>a</sup>	92.7±4.2 <sup>b</sup>	117.5±6.1 <sup>a</sup>	115.1±4.8 <sup>a</sup>	112.5±3.4 <sup>a</sup>	107.2±5.3 <sup>a</sup>
STR (%)	70.8±2.7 <sup>bc</sup>	70.7±2.9 <sup>bc</sup>	64.2±2.7 <sup>d</sup>	60.0±2.3 <sup>d</sup>	77.3±1.7 <sup>a</sup>	77.3±1.8 <sup>a</sup>	73.2±1.6 <sup>b</sup>	69.5±0.6 <sup>c</sup>
LIN (%)	39.7±2.7 <sup>bc</sup>	38.5±2.9 <sup>bc</sup>	38.7±2.1 <sup>bc</sup>	32.2±2.3 <sup>d</sup>	47.3±3.2 <sup>a</sup>	46.8±3.1 <sup>a</sup>	40.5±2.5 <sup>b</sup>	34.8±2.0 <sup>cd</sup>
AR (%)	26.6±1.5 <sup>b</sup>	20.4±1.0 <sup>c</sup>	12.9±1.5 <sup>d</sup>	5.3±0.8 <sup>e</sup>	31.0±1.5 <sup>a</sup>	26.4±1.7 <sup>b</sup>	14.0±0.7 <sup>d</sup>	5.6±0.5 <sup>e</sup>
Viability (%)	79.3±1.7 <sup>a</sup>	78.8±1.6 <sup>a</sup>	64.6±1.7 <sup>b</sup>	58.8±1.4 <sup>c</sup>	80.3±2.1 <sup>a</sup>	79.2±1.6 <sup>a</sup>	62.9±1.8 <sup>b</sup>	57.2±1.4 <sup>c</sup>

Values represent means ± SEM from 6 different experiments.

Different superscripts within a row indicate statistically significant differences between the control and treatment at each time (P<0.05) or between incubation times (P<0.01).

## Résumé des résultats et conclusion de l'article :

Les deux CaMKKs ( $\alpha$  &  $\beta$ ) et leur substrat, CaMKI, ont été mis en évidence dans les spermatozoïdes de coq. La CaMKK $\alpha$  a été principalement localisée dans l'acrosome et la pièce intermédiaire, et plus faiblement au niveau du flagelle. La localisation de CaMKK $\beta$  s'est avérée différente puisqu'elle a été principalement localisée dans le flagelle et l'acrosome, et, à une intensité beaucoup moins forte, dans la pièce intermédiaire. Cependant, CaMKI est présente dans l'acrosome et la pièce intermédiaire, et le flagelle.

L'inhibiteur de CaMKK STO-609 a réduit la phosphorylation de l'AMPK dès 5 minutes d'incubation en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, mais pas en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. CaMKI a été phosphorylée très rapidement (5 minutes) en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire et plus lentement (15 minutes) en son absence. En outre, nos observations ont également montré que la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes ont été diminuées très rapidement en présence ou en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. En présence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, les activations de l'AMPK et de CaMKI par CaMKKs agissent toutes deux sur les fonctions des spermatozoïdes. Cependant, en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, seul CaMKI conserve son influence sur les fonctions des spermatozoïdes.

Les inhibiteurs de canaux calciques de type L, R et SOCs (respectivement Nifédipine, SNX et MRS) ont diminué la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, l'inhibiteur de SOC, MRS, étant le plus efficace. MRS a également été l'inhibiteur le plus efficace de la motilité et de la réaction acrosomique des spermatozoïdes. L'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK par CaMKKs en réponse à l'augmentation du calcium intracellulaire a été bloquée par l'inhibition des canaux SOCs, démontrant ainsi la dépendance de la phosphorylation de l'AMPK par CaMKKs aux canaux calciques SOCs.

En conclusion : Cette étude a permis pour la première fois la localisation et l'identification d'effet des CaMKKs ( $\alpha$ & $\beta$ ) et CaMKI sur la régulation de l'activation de l'AMPK dans les spermatozoïdes de coq. Les transmembranaires canaux SOCs semblent être les canaux calciques les plus réactifs déclenchant la cascade de réactions  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKKs/AMPK et les voies  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKKs/CaMKI dans les spermatozoïdes de coq. Ces résultats améliorent notre connaissance de la transduction du signal dans ces cellules avec génome silencieux qui se montrent hautement réactives.

## **Discussion générale et perspectives**

## Discussion générale

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, le système de l'AMPK est sensible à de nombreux stimuli et est un régulateur clé lors témoin d'une baisse de l'énergie cellulaire disponible. Il agit en chef d'orchestre afin de pallier de façon rapide mais aussi à plus long terme les besoins énergétiques. Senseur et régulateur majeur de l'énergie au niveau cellulaire, tissulaire et corporel, l'AMPK est impliquée dans la régulation des métabolismes lipidiques, glucidiques et protéiques des tissus périphériques. Au niveau plus central de l'hypothalamus, l'AMPK est impliquée dans le contrôle des dépenses. Elle a aussi été caractérisée dans les tissus reproducteurs mâle et femelle.

Récemment, il a été montré que la protéine AMPK est assez fortement exprimée dans les spermatozoïdes éjaculés de mammifères et qu'elle régule l'une de leurs fonctions les plus importantes : la mobilité (Hurtado de Llera et al, 2012). Elle contribue également efficacement au maintien du potentiel de membrane mitochondriale, à la fluidité et à l'organisation de la membrane plasmique ainsi qu'à l'intégrité de l'acrosome, à température physiologique (Hurtado de Llera et al, 2013) ou pendant la conservation du sperme à 17°C (Hurtado de Llera et al, 2013). Soutenant un rôle important de l'AMPK dans les fonctions des cellules germinales mâles, Tartarin et al, 2012, ont observé chez les souris dépourvues du gène de la sous-unité catalytique  $\alpha 1$  de l'AMPK [ $\alpha 1$ AMPK $\alpha 1$  knockout (KO)] une diminution de la fertilité en parallèle à une altération de la morphologie des spermatozoïdes et une diminution de leur mobilité. Bertoldo et al, 2014, a montré que l'addition de Metformine dans la semence de rat avant conservation peut améliorer la mobilité des spermatozoïdes.

Grâce au travail accompli au cours de cette thèse, nous avons pu mettre en évidence et apporter de nouveaux éléments importants concernant l'activation de la voie de signalisation AMPK du spermatozoïde de coq. Nous avons mis en évidence les liens qui existent d'une part entre l'activation de l'AMPK et les fonctions des spermatozoïdes et, d'autre part, entre la signalisation calcique et l'activation de l'AMPK.

Les données acquises au cours de l'étude des effets de modulateurs de l'AMPK sur la qualité des spermatozoïdes (viabilité, motilité et capacité à effectuer la réaction acrosomique) confortent l'hypothèse que l'activation de l'AMPK modifie le niveau d'énergie, et par conséquent, les fonctions des spermatozoïdes. Nos résultats suggèrent également que l'activation de l'AMPK dans les spermatozoïdes de coq est d'une part très rapide, et d'autre

part différente de celle proposée chez les mammifères (Hurtado de Llera et al, 2012, 2013): principalement par son implication cruciale dans le processus de réaction acrosomique.

L'évaluation du rôle de l'AMPK dans les spermatozoïdes après cryopréservation a donné les résultats que nous anticipions. L'activation de l'AMPK par ses modulateurs a amélioré la qualité des spermatozoïdes grâce à la diminution de la peroxydation lipidique (LPO) et des réactifs de l'oxygène (ROS) et a restauré une partie des systèmes enzymatiques de défenses antioxydants (SOD, GPx, GR).

Afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes intracellulaires sous-jacents, notre travail s'est ensuite orienté vers une étude des voies de signalisation du calcium susceptibles d'être impliquées dans le déclenchement de l'activation de l'AMPK, ce qui nous a permis de suggérer l'implication de la voie de signalisation  $Ca^{2+}$ /CaMKKs/CaMKI et l'importance de canaux calciques tels les canaux SOCs dans l'augmentation du Calcium intracellulaire nécessaire à cette voie.

### **1. Identification et localisation de l'AMPK dans le spermatozoïde de coq**

La kinase AMPK possède une structure quaternaire composée de trois sous-unités différentes: une sous-unité catalytique  $\alpha$  et deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ . Cet assemblage trimérique est essentiel à son activité et à sa stabilité (Carling, 2004 ; Dyck et al. 1996). Chaque sous-unité possède des structures aux caractéristiques très conservées entre les espèces qui permettent à l'AMPK d'être sensible à de nombreux stimuli et d'exercer son activité de régulation de l'énergie. Dans ma thèse, je me suis intéressée à la sous-unité catalytique  $\alpha$  car elle possède un domaine sérine/thréonine kinase NH2-terminal qui est activée par la phosphorylation de la thréonine 172 de la sous-unité  $\alpha$ .

Dans ce travail, j'ai pu caractériser pour la première fois l'AMPK $\alpha$  dans un spermatozoïde d'oiseau, à savoir le coq. L'utilisation de la technique western-blot a permis de détecter une bande principale avec une masse moléculaire apparente de 62 kDa (pour la phospho-AMPK $\alpha$  et l'AMPK $\alpha$  totale). La localisation d'AMPK $\alpha$  dans les spermatozoïdes de coq a été évaluée par immunofluorescence indirecte. L'AMPK $\alpha$  totale est observée dans la région de l'acrosome, dans la pièce intermédiaire et dans l'ensemble du flagelle, mais la phospho-AMPK $\alpha$  est principalement localisée dans le flagelle et dans la région de l'acrosome, et avec une intensité beaucoup plus faible dans la pièce intermédiaire. Nos résultats sont différents de ceux déjà obtenus pour les spermatozoïdes de porc (Hurtado de Llera et al et al, 2013) qui indiquaient l'AMPK $\alpha$  et la phospho-AMPK $\alpha$  sont principalement localisées dans la

région de l'acrosome et la pièce intermédiaire. Chez le coq, l'action de l'AMPK dans le flagelle et l'acrosome des spermatozoïdes est en accord avec la localisation de la synthèse de l'ATP qui n'est pas limitée à la pièce intermédiaire avec le soutien de la respiration mitochondriale mais également présente dans d'autres parties des spermatozoïdes grâce à la glycolyse anaérobie (Mukai et al, 2004 ; Takei et al, 2014). En effet, les enzymes de la glycolyse ont déjà été trouvées dans le flagelle des spermatozoïdes d'oiseaux et de mammifères (Eddy et al, 2003 ; Cao et al, 2006) et la glycolyse anaérobie est connue pour être efficace dans les spermatozoïdes de coq (Wishart et al 1998).

## **2. Implication de l'AMPK dans la gestion de l'énergie des spermatozoïdes**

La kinase AMPK est une enzyme qui permet de maintenir l'homéostasie énergétique, d'une part en stimulant les voies productrices d'ATP et d'autre part en inhibant les voies consommatrices d'ATP (Hardie et Hawley, 2001; Hardie et al, 2006; Kahn et al, 2005). Ces caractéristiques font que cette kinase agit comme un véritable chef d'orchestre de la gestion de l'énergie en étant impliquée dans de nombreuses voies métaboliques. En utilisant plusieurs conditions connues pour moduler l'activité de l'AMPK, telles que les modulateurs pharmacologiques AICAR, Metformine ou Compound C, nous avons étudié la réponse de cette kinase et ses conséquences sur les fonctions biologiques des spermatozoïdes de coq.

Nous avons traité les spermatozoïdes avec différentes concentrations d'AICAR (de 0.2mM à 10mM) et de Metformine (de 0.5mM à 5mM): afin de vérifier si la protéine AMPK peut être activée dans les spermatozoïdes comme elle l'est dans d'autres cellules. Les analyses par western-blot et immunofluorescence indirecte avec un anticorps spécifique à l'AMPK phosphorylée ont permis de déterminer que la protéine réagissait de la manière escomptée suivant les différents traitements (Nguyen et al, 2014). Selon qu'ils utilisent de l'AICAR ou de la Metformine, ces traitements ont permis d'observer un changement significatif du niveau de phosphorylation du résidu Thr172 de la sous-unité  $\alpha$  de l'AMPK. L'activation de l'AMPK par 2mM d'AICAR (après 5 minutes d'incubation) est cependant plus rapide que par 1mM de Metformine (après 25 minutes d'incubation).

Nous avons ensuite mesuré les niveaux d'énergie après l'activation de l'AMPK dans les spermatozoïdes. Nous avons démontré que, via la phosphorylation de l'AMPK, l'AICAR stimule la production d'ATP et aussi de lactate, qui est un substrat énergétique nécessaire aux spermatozoïdes (Richardson et al, 2009): tandis que la Metformine ne stimule que la production de lactate. Ces différences sont compréhensibles car les deux activateurs n'ont pas le même mode de fonctionnement. L'AICAR est transformé en un analogue de l'AMP, le

ZMP, qui permet l'activation allostérique directe de l'AMPK, alors que la Metformine agit indirectement en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui élève le ratio AMP:ATP et active donc ensuite l'AMPK. Ces effets respectivement quasi-direct et indirect de l'AICAR et la Metformine expliquent la différence de cinétiques d'activation de l'AMPK immédiat avec AICAR (5min) et 25 min avec Metformine. Cela est également cohérent avec notre observation de la phosphorylation de l'AMPK par l'AICAR et la Metformine par immunofluorescence indirecte : l'AICAR la stimule aux niveaux de l'acrosome, de la pièce intermédiaire et du flagelle tandis que la Metformine ne la stimule qu'aux niveaux de l'acrosome et du flagelle.

En utilisant du Compound C, il se produit au contraire une diminution de la phosphorylation de l'AMPK et de la production d'ATP et de lactate. L'activité de l'AMPK est ainsi diminuée de façon importante. Cela suggère que le compound C a un effet direct sur l'AMPK. Les échantillons traités avec du Compound C montrent toutefois que l'AMPK est inhibée après 25 minutes d'incubation, comme pour la stimulation via la Metformine, mais cela est sans doute dû à la très faible concentration que nous avons utilisée pour éviter la toxicité de son solvant le DMSO.

Notre observation suggère également que l'AMPK peut restaurer une partie de l'énergie initiale dans le sperme congelé/décongelé. Nous savons qu'après la décongélation, beaucoup de spermatozoïdes sont morts ou incapables de se mouvoir ou de réussir la réaction acrosomique, c'est-à-dire de libérer le contenu de l'acrosome pour permettre l'accrochage des spermatozoïdes à l'ovule et donc de la fécondation. Un grand nombre de spermatozoïdes ont leur flagelle ou leur pièce intermédiaire altérée. Dans ces conditions particulières, les spermatozoïdes demandent une quantité d'énergie très importante pour conserver leur pouvoir fécondant. L'ajout de Metformine ou d'AICAR avant cryoconservation peut restaurer une partie de l'énergie nécessaire en stimulant le métabolisme anaérobie et, pour l'AICAR une partie du métabolisme aérobie. En fait, la Metformine ou l'AICAR stimulent la production de lactate, qui est le produit final de la glycolyse anaérobie, et l'AICAR stimule la production de citrate. Le citrate est un produit intermédiaire du cycle de Krebs qui commence avec un acétyl-CoA, une forme activée de l'acétate qui dérive de la glycolyse et de l'oxydation du pyruvate à partir des hydrates de carbone et de la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

### **3. Implication de l'AMPK dans la gestion des enzymes antioxydantes**

Il s'agit de la première étude examinant le rôle de l'AMPK des spermatozoïdes dans l'activité des enzymes principales antioxydantes : superoxyde dismutase (SOD): glutathion

peroxydase (GPx): glutathion réductase (GR) et catalase (CAT): 2/ la production de peroxydes des lipides (LPO) et 3/ des radicaux libres de l'oxygène (ROS) dans la semence cryoconservée. Le système antioxydant de la semence contient naturellement des enzymes et autres antioxydants qui empêchent ou limitent la formation et la propagation de peroxydes. Le processus de congélation est connu pour entraîner des dommages considérables aux structures cellulaires, telles que la membrane plasmique, le noyau, les mitochondries et le flagelle (Partyka et al, 2010 ; Blesbois et al, 2005 ; Guthrie et al, 2008). On pense que ces dommages sont à l'origine d'autres effets négatifs, y compris des fuites et des dénaturations de protéines, des altérations du génome, et des déformations structurelles des organites cellulaires. La détérioration devient irréversible et entraîne la réduction de la qualité du sperme. Certains auteurs ont rapporté que l'accumulation de ROS pourrait être un facteur important dans les dommages subis par le sperme après décongélation (Guthrie et al, 2008).

La membrane plasmique est particulièrement sensible aux dommages entraînés pas la réfrigération, la congélation et la décongélation. Aitken, 1995 et Nield et al, 2005, ont indiqué que ces dommages sont causés par les produits de la peroxydation des lipides, qui altèrent l'intégrité des membranes (les membranes intracellulaires également). En outre, l'analyse de sperme cryoconservé de nombreuses espèces de mammifères a montré que, pendant le processus de congélation-décongélation, la production de ROS est augmentée (Bilodeau JF et al, 2000 ; Chatterjee, 2001). Nos résultats confirment que les activités des enzymes antioxydantes (SOD, GPx et GR) diminuent alors que la production de MDA qui est un produit terminal de la peroxydation lipidique et reflète un état de stress oxydatif dans la cellule ainsi que les ROS augmentent significativement après la cryoconservation du sperme.

Nos résultats suggèrent que l'ajout de Metformine ou d'AICAR avant cryoconservation diminue la production de LPO et de ROS dans le sperme congelé-décongelé et, en revanche, le Compound C augmente la LPO et les ROS. Des études ont déjà montré que l'AICAR supprime la production de ROS dans les cellules endothéliales via l'activation de l'AMPK (Kim et al, 2008) et que le Compound C a un effet contraire (Ouslimani et al, 2005). De même, il a été montré que le Metformine a empêché la stéato-hépatite non alcoolique par les voies dépendantes et indépendantes de l'AMPK (Kita et al, 2012) en empêchant l'épuisement des GPx, SOD et catalase, et en diminuant les ROS et le MDA (Bułdak et al, 2014). Nos résultats confirment l'hypothèse que les ROS et le MDA sont diminués par l'AICAR et la Metformine et ont été augmentés par le Compound C.

Le principal site d'action de la Metformine a été identifié comme étant le complexe I de la chaîne respiratoire, conduisant à une baisse de la production d'ATP, et par conséquent à l'activation de l'AMPK (Zhou et al, 2001). L'inhibition du complexe I réduit le nombre d'électrons entrant dans la chaîne de transport d'électrons, bloquant ainsi l'oxydation du NADH par le complexe I et conduisant à l'accumulation de NADH (Murphy , 2009): et réduisant donc la production de ROS par les complexes I et III. Contrairement à la Metformine, l'AICAR se transforme rapidement en ZMP qui active directement l'AMPK (Corton et al, 2001). Des études antérieures ont montré que l'activation de l'AMPK a réduit la production de ROS en restaurant les niveaux de Mn-SOD dans les cellules progénitrices endothéliales (Wang et al, 2011). Une découverte importante dans la présente étude est que l'AICAR et la Metformine ont significativement augmenté l'activité des enzymes antioxydantes, SOD, GR et GPx. Cependant, contrairement aux SOD, GR et GPx, l'activité de la catalase semble échapper au contrôle de l'AMPK puisque seule la Metformine stimule la catalase, probablement par un mécanisme sans rapport avec l'AMPK. Ainsi, nos résultats indiquent que le traitement avec des activateurs de l'AMPK (Metformine ou AICAR) limite l'oxydation en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes impliquées dans le métabolisme des spermatozoïdes de coq congelés/décongelés. Cependant, les mécanismes potentiels par lesquels les activateurs de l'AMPK peuvent activer les systèmes d'enzymes antioxydantes dans les spermatozoïdes sont encore mal connus, et nécessitent d'être mieux étudiés. L'inhibiteur de l'AMPK Compound C agit également directement sur la phosphorylation de l'AMPK, et il a été montré qu'il augmente le stress oxydatif dans la cellule H9c2 dérivée du cœur embryonnaire de rat en diminuant l'activité de SOD et en augmentant les niveaux de MDA et de ROS (Hu et al, 2014).

Dans notre étude, l'effet inhibiteur du Compound C sur l'activité des enzymes antioxydantes liées à l'AMPK n'était pas complet puisque le Compound C a diminué seulement SOD mais n'a pas affecté GPx et GR. Comme le Compound C doit être dilué dans du DMSO qui est toxique pour les spermatozoïdes, nous n'avons pu étudier que des concentrations de Compound C de loin inférieures à celles de l'AICAR et de la Metformine. Par conséquent, l'AMPK pourrait ne pas avoir été complètement inhibée par le Compound C sans doute en lien avec les très faibles doses que nous ont imposé le diluent avec DMSO toxique pour les spermatozoïdes de coq. Dans l'ensemble, nos résultats montrent tout de même que l'activation de l'AMPK dans le sperme de poulet congelé/décongelé peut, au moins partiellement, restaurer l'activité des enzymes antioxydantes dans les spermatozoïdes.

#### **4. Régulation de l'activation de l'AMPK par des kinases liées à la signalisation calcique (CaMKKs, CaMKI)**

Les CaMKKs ont été initialement identifiées comme des nouveaux membres de la CaMKs, sous deux formes, CaMKK $\alpha$  et CaMKK $\beta$  (également nommées CaMKK1 ou CaMKK2, respectivement): toutes deux exprimées dans le système nerveux, dans les cellules endothéliales de nombreuses zones du cerveau, dans des cellules hématopoïétiques, et à des niveaux inférieurs dans les testicules, la rate, les poumons, le foie et les muscles (Anderson et al, 1998 ; Gong et al, 2003 ; Means, 2008). Dans d'autres tissus, tels que les reins, l'intestin ou le cœur, son expression est moins claire (Ohmstede et al, 1989 ; Anderson et al, 1998 ; Anderson et al, 2012). Lors de l'interaction avec la calmoduline liée au calcium (Ca<sup>2+</sup>-CAM): les CaMKKs activent deux protéines kinases calmoduline-dépendantes : CaMKI, par phosphorylation de la Thr177, et CaMKIV, par phosphorylation de la Thr196 (Tokumitsu et al, 1995 ; Tokumitsu, 1996 ; Soderling, 1999). Les CaMKKs peuvent également phosphoryler et activer PKB / Akt (Yano et al, 1998) et l'AMPK (Woods et al, 2005 ; Hawley et al, 2005). La protéine AMPK est une des cibles de la CaMKK, qui elle-même est activée suite à une augmentation du calcium intracellulaire (Woods et al, 2005). Dans les cellules de reproduction, l'inhibition des CaMKK  $\alpha$  et  $\beta$  par STO-609 entraîne une baisse de phosphorylation de l'AMPK dans le sperme de porc (Hurtado de Llera et al, 2013). Cependant, la caractérisation des mécanismes impliqués dans la régulation de la phosphorylation de l'AMPK et des fonctions biologiques des spermatozoïdes par les CaMKK est encore très incomplète. Dans cette étude, nous montrons pour la première fois que la régulation de la voie de signalisation de l'AMPK par les kinases CaMKKs et CaMKI est liée aux voies de signalisation calciques et aux fonctions biologiques des spermatozoïdes d'oiseaux.

Nos résultats ont montré que la CaMKK $\beta$  est localisée principalement dans les mêmes compartiments subcellulaires que phospho-AMPK $\alpha$ , dans l'acrosome et le flagelle (Nguyen et al, 2014): tandis que la CaMKK $\alpha$  est principalement localisée dans l'acrosome et la pièce intermédiaire, et plus faiblement au niveau du flagelle. Nos résultats soutiennent donc l'idée que la CaMKK $\beta$ , plus que la CaMKK $\alpha$ , phosphoryle l'AMPK dans les spermatozoïdes de coq, comme indiqué précédemment dans d'autres types cellulaires (Woods et al, 2005 ; Hawley et al, 2005).

Le traitement des spermatozoïdes avec l'inhibiteur de CaMKK, STO-609, en absence de calcium ou en présence de calcium extracellulaire (5mM): montre que la phosphorylation

de l'AMPK diminue en présence de calcium extracellulaire, mais pas en son absence. Cette expérience suggère l'implication du calcium extracellulaire dans la phosphorylation de l'AMPK via les CaMKKs dans les spermatozoïdes, cette implication ayant un effet significatif sur la fonction des spermatozoïdes. Cet effet du calcium est en accord avec une étude précédente qui avait également démontré l'activation de l'AMPK par CaMKK $\beta$  en augmentant la concentration intracellulaire de calcium dans la cellule le cerveau de rat (Woods et al, 2005). Cependant, cette étude n'avait pas identifié l'origine du calcium. Nous montrons ici que, dans le sperme de coq, la hausse de calcium induite par l'activation de l'AMPK par CaMKKs est essentiellement due à l'entrée dans la cellule de calcium extracellulaire. Pour rechercher les voies d'entrée du calcium extracellulaire, le sperme a été incubé dans un milieu supplémenté avec des inhibiteurs de canaux calciques membranaires, avant l'addition de calcium et la mesure de la phosphorylation de l'AMPK en présence ou en absence d'inhibiteur de CaMKK. Dans ce cas, l'influx de calcium a été bloqué plus fortement par le MRS, l'inhibiteur des SOCs, que par la Nifédipine ou la SNX, les bloqueurs des canaux L et R respectivement. De même, l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK en raison de l'entrée de calcium dans le sperme a été bloquée par le MRS seul, ou par les trois inhibiteurs ensemble. Ainsi, la stimulation de l'AMPK par Ca<sup>2+</sup>/CaMKKs est régulée par des canaux calciques membranaires, en premier lieu les canaux calciques SOCs. De nombreux types de canaux calciques différents ont été mis en évidence ces dernières années et un candidat SOCs (TRCP2) aurait un rôle d'entrée du Ca<sup>2+</sup> au moment de la RA chez la souris. Nous montrons dans cette thèse que les SOCs semblent avoir une action encore plus générale en lien avec régulation du métabolisme énergétique des spermatozoïdes.

## **5. Présence de CaMKI dans les spermatozoïdes de coq**

L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> est un signal omniprésent qui régule diverses réponses cellulaires, habituellement via la protéine calmoduline (CaM). Le complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM peut moduler les fonctions de nombreuses protéines intracellulaires, dont certaines protéines serine/thréonine kinases. Beaucoup de protéine kinases sont membres de cascades de transduction du signal. Ces dernières années, une cascade de CaM-kinase a commencé à être caractérisée. Presque toutes les études ont à ce jour été effectuées sur les membres de la cascade de CaM-kinase chez le rat, la souris ou des cellules d'origine humaine. La cascade de CaM-kinase semble composée de trois membres associés : les CaM kinases CaMKI et CaMKIV et leur activateur en amont CaMKK. Des niveaux élevés sont présents dans le cerveau, les testicules et la rate, alors que d'autres tissus contiennent des taux

beaucoup plus faibles de CaMKI ou CaMKIV (Tokumitsu et al, 1995 ; Kitani et al, 1997 ; Anderson et al, 1998). CaMKIV a principalement été localisée dans le noyau, tandis que CaMKI a été seulement localisée dans le cytoplasme. La CaMKIV nucléaire régule la transcription par la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription, y compris CREB (Soderling TR, 1996). Dans notre étude, nous nous intéressons à une seule kinase, CaMKI et pas à la CaMKIV nucléaire puisqu'il n'y a pas transcription dans les spermatozoïdes.

Nos résultats montrent que CaMKI est localisée dans l'acrosome, la pièce intermédiaire et le flagelle, c'est-à-dire dans les mêmes compartiments subcellulaires que la CaMKK $\alpha$ . Ils suggèrent des rôles différents pour les deux CaMKK  $\alpha$  et  $\beta$ , chacune d'entre elles agissant principalement sur différents substrats : CaMKK $\beta$  > AMPK et CaMKK $\alpha$  > CaMKI (> AMPK). Cependant, nous avons aussi observé que la phosphorylation de la CaMKI par CaMKKs est stimulée en présence du calcium et diminuée par la suite avec le STO-609, en l'absence comme en présence de calcium. Cependant, la phosphorylation de la CaMKI par CaMKKs en présence de calcium est plus rapide (5min) qu'en l'absence de calcium (15 min). Ceci suggère que la CaMKI peut être activée dans le sperme de coq en réponse à la libération des stocks internes de calcium.

## **6. Activation de l'AMPK impliquée dans les fonctions biologiques des spermatozoïdes de coq frais et congelés/décongelés**

Un des objectifs de ma thèse était d'évaluer le rôle de l'AMPK dans les fonctions de spermatozoïdes de coq frais et congelés/décongelés après stimulation par plusieurs acteurs différents. L'analyse de la qualité des spermatozoïdes après l'activation de l'AMPK a permis de déterminer que la protéine réagissait de la manière escomptée suivant les différents traitements, mais qu'elle réagissait différemment de ce qui est connu chez les spermatozoïdes de porc.

### ***a. Les modulateurs de l'AMPK affectent les fonctions biologiques des spermatozoïdes***

En utilisant différents activateurs (AICAR et Metformine) et un inhibiteur (Compound C) de l'AMPK, nous avons pu montrer que sa phosphorylation était finement régulée, et qu'elle-même régula la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq.

Les activateurs de l'AMPK ont stimulé significativement un grand nombre de paramètres de motilité des spermatozoïdes frais (augmentation de 40% de la mobilité, 90% de la proportion de mobilité progressive et 60% des rapides motiles). La réaction acrosomique a augmenté de 40% et la viabilité aussi mais faiblement, aux environs de 9%. L'inhibiteur de

l'AMPK a réduit significativement le pourcentage de mobilité (diminution de 25%): de mobilité progressive (diminution de 35%): et de sperme rapide (diminution de 30%). La réaction acrosomique a aussi diminué mais la viabilité n'a pas été affectée par le compound C, et pour cause, nous avons choisi une dose faible qui n'altère pas la viabilité.

De plus, l'ajout de modulateurs de l'AMPK avant la congélation des spermatozoïdes montre que l'AICAR et la Metformine ont amélioré significativement la plupart des paramètres de motilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes congelés/décongelés (+23% pour la motilité, +34% pour les spermatozoïdes rapide, +100% de RA par AICAR et Metformine). Le Compound C a un effet négatif sur tous ces paramètres.

Ce travail montre que la voie signalisation de l'AMPK peut réguler la mobilité et la réaction acrosomique chez les spermatozoïdes de coq. Nos résultats sur la mobilité sont en accord avec d'autres études effectuées sur les spermatozoïdes de mammifères (Hurtado de Llera et al, 2012 ; 2013). Cependant, nous montrons également que l'AMPK est impliquée dans la réaction acrosomique ce qui n'avait pas été mis en évidence précédemment. Par ailleurs, ces effets positifs de la stimulation de l'AMPK restent présents après cryopréservation ce qui conforte son rôle "réparateur" après soumission des gamètes aux conditions de stress thermique et osmotique extrême, rencontrées dans le processus de congélation / décongélation. Nous souhaitons que nos résultats aident à l'amélioration des méthodes de conservation de la semence.

#### ***b. L'inhibiteur de CaMKK affecte les fonctions biologiques des spermatozoïdes***

Notre étude a été la première à relier CaMKK aux fonctions biologiques de spermatozoïdes. Nous démontrons ici pour la première fois que des doses appropriées de l'inhibiteur des CaMKKs STO-609 diminuent la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq sans affecter leur viabilité. Le STO-609 a diminué rapidement plusieurs paramètres de mobilité des spermatozoïdes (% motile,% rapide,% progressive) et la réaction acrosomique après 5 min d'incubation en présence de calcium, en parallèle à une diminution de la phosphorylation de l'AMPK, ce qui suggère que les CaMKKs affectent la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq via l'activation de l'AMPK. Cependant, le STO-609 a également diminué la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq en l'absence de calcium extracellulaire, en parallèle à une diminution de la phosphorylation de CaMKI. On peut donc émettre l'hypothèse que les CaMKKs sont également impliquées dans la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq par deux mécanismes différents, un impliquant la voie Ca/CaMKKs/AMPK et un autre

mécanisme indépendant de l'entrée de calcium extracellulaire, ou tout autre processus encore inconnu. Toutefois, la possibilité que le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  affecte directement les fonctions des spermatozoïdes ne peut pas être exclue. En effet CaM est présente à la fois dans la pièce principale des spermatozoïdes de souris et dans l'acrosome (Schlingmann et al, 2007) et est impliquée dans diverses fonctions des spermatozoïdes dépendantes de  $\text{Ca}^{2+}$  dans d'autres espèces (Bendahmane et al, 2001; Si et al, 2000; Jones et al, 1980): mais par des voies encore non définies.

## **7. Canaux calciques dans les spermatozoïdes de coq**

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes de synthèse bibliographique, les mécanismes modulant le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire impliqué dans la mobilité, la réaction acrosomique de spermatozoïde ont beaucoup été étudiés chez mammifères et chez l'oursin. Cependant, le rôle des canaux calciques impliqués dans les spermatozoïdes d'oiseaux demeure à ce jour mal connu. Les augmentations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et de phosphorylation d'AMPK et de CaMKI semblent impliquer plusieurs voies reliées entre elles lors du processus de mobilité et de réaction acrosomique. Aide d'inhibiteurs, nous avons montré dans notre étude la présence pour la première fois des canaux calciques HVC « High voltage channel » de type L et R, et les canaux SOCs « Store-operated calcium channels » dans les spermatozoïdes de coq. Nous avons également montré que l'activation des canaux calciques (L, R, SOCs) est impliquée dans les fonctions biologiques des spermatozoïdes de coq.

Nos résultats ont montré que les inhibiteurs, Nifedipine, SNX ou MRS, pouvaient diminuer la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq via les canaux de type L, R ou SOC, et ainsi. Cependant, l'effet de MRS est plus fort que ceux de la Nifedipine ou de SNX. Tel que discuté précédemment, les TRPCs qui sont présents dans les spermatozoïdes de mammifère, plus particulièrement TRPC2, pourraient participer à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  lors de la réaction de l'acrosome chez les souris (Jungnickel et al, 2000). Cependant, aucune démonstration n'indique le rôle des SOCCs au niveau la mobilité de spermatozoïdes. Les présents travaux montrent pour la première fois que l'activation des canaux, L, R, SOCs joue un rôle dans la régulation de la mobilité et de la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq en réponse à une augmentation de calcium intracellulaire.

## **8. Vitesse de l'activation de kinase dans les spermatozoïdes de coq**

Des études précédentes sur le métabolisme intracellulaire impliqué dans la transduction du signal aboutissant au déclenchement de la réaction acrosomique de

spermatozoïdes de coq ont montré qu'un certain nombre de voies (la PKA, la PI3K, la MAPK ERK) qui régulent positivement la réaction acrosomique des mammifères sont aussi impliqués dans cette RA chez les spermatozoïdes d'oiseaux. Cependant, *in vitro*, ces voies sont activées très rapidement : en moins de 5 min chez les spermatozoïdes d'oiseaux (Lemoine et al, 2008 ; 2009). Nos résultats montrent aussi que la voie de signalisation de l'AMPK est activée très rapidement en moins de 5 min par ses modulateurs pharmacologiques les plus directs ou par CaMKKs et qu'elle est impliquée dans la mobilité et dans la capacité à la réaction acrosomique des spermatozoïdes aussi vite. Nous suggérons donc que l'activation très rapide des protéines kinases est une spécificité de ce modèle cellulaire. Dans notre compréhension, ce qui est probablement un modèle que les voies de signalisation est activée rapidement. Explication de ce problème, nous pensons que, la cause peut est due à la différence de la reproduction interne des oiseaux avec autres classes d'animaux. À côté d'un génome inactif qui fait d'eux un modèle particulier pour l'étude de la signalisation cellulaire comme ceux des autres espèces. La reproduction des oiseaux comporte de nombreuses spécificités différentes comparées à celles des autres classes d'animaux. Parmi celles-ci, à la sortie du testicule, les spermatozoïdes possèdent déjà l'essentiel de leur capacité de motilité (Ashizawa et Sano 1990) et un pouvoir fécondant important (Howarth 1983). Ces capacités se renforcent encore au long du trajet dans l'épididyme. Le défi majeur des spermatozoïdes aviaires intervient après l'éjaculation : la fécondation d'un œuf télolécithe et leur longue survie dans le tractus génital femelle (3 semaines chez le coq, Brillard et Mc Daniel, 1986). La capacitation des spermatozoïdes (série de modifications biochimiques et biophysiques qui commencent dans l'oviducte par un efflux de cholestérol des membranes plasmiques et qui aboutissent à une déstabilisation membranaire qui permet la réaction acrosomique) semble ne pas exister chez les oiseaux. En effet, des spermatozoïdes éjaculés sont capables d'initier sans délai cette réaction à condition d'être en présence de calcium et de membrane périvitelline, ou de calcium et d'ionophore calcique. Ce dernier permet de «forcer» l'entrée du calcium extracellulaire dans le cytoplasme des spermatozoïdes (Lemoine et al, 2008). Parmi les autres particularités affectant la biologie des spermatozoïdes, on notera aussi la remontée des spermatozoïdes vers le site de fécondation et, dans le même temps, la continuation de la formation de l'œuf. Il n'a pas non plus été trouvé d'hyperactivation de la mobilité des spermatozoïdes de coq au moment de la réaction acrosomique, l'hyperactivation qui serait, chez les mammifères, nécessaire à la progression des spermatozoïdes jusqu'à la zone pellucide et à la pénétration de cette dernière n'excitent pas chez les oiseaux.. Ces caractéristiques font du modèle des oiseaux un modèle particulièrement intéressant et très

différent de celui des mammifères. Tout ceci , et en particulier la maturation précoce et l'absence de (ou la très faible) capacitation pourraient contribuer à expliquer l'activation très rapide des protéines kinases dans les spermatozoïdes d'oiseaux.

## 9. Perspectives

Ce travail constitue une première approche des mécanismes de signalisation intracellulaire pouvant réguler à partir de la signalisation "énergétique" la mobilité et l'initiation de la réaction acrosomique chez les spermatozoïdes aviaires. Nous avons étudié la voie de signalisation du calcium  $Ca^{2+}$ /CaMKK  $\alpha$ & $\beta$ /CaMKI et le rapport entre la signalisation calcique et l'activation de l'AMPK.

Une des suites logiques dans la compréhension des mécanismes serait une étude du rôle de CaM impliquée dans la régulation de l'activation de la voie  $Ca^{2+}$ /CaMKKs/CaMKI/AMPK dans les spermatozoïdes. Nous savons que le complexe  $Ca^{2+}$ -CaM peut moduler les fonctions de nombreuses protéines intracellulaires, dont certaines protéines serine/thréonine kinases. L'activation de CaMKI sur la thréonine (Thr177) par CaMKKs ne semble pas être inaccessible en l'absence d'activation par  $Ca^{2+}$ -CaM. CaM est trouvée à la fois dans la pièce principale et l'acrosome des spermatozoïdes et nous pensons qu'elle n'est pas seulement impliquée dans l'activation de l'AMPK et de CaMKI par CaMKKs mais qu'elle pourrait aussi affecter directement les fonctions des spermatozoïdes. Il serait donc intéressant d'identifier la localisation de CaM dans les spermatozoïdes de coq et d'étudier son rôle dans la régulation de l'activation d'autres protéines.

Chez les oiseaux, au moment de la fécondation, les spermatozoïdes doivent effectuer la réaction acrosomique pour traverser la membrane périvitelline interne afin de pénétrer dans l'ovocyte. Nous savons que le calcium est nécessaire pour déclencher la réaction acrosomique, mais nous ne savons pas encore précisément quel canal calcique s'ouvre dans les spermatozoïdes pour permettre l'entrée du calcium extracellulaire. Il serait donc intéressant de rechercher les canaux calciques impliqués dans la réaction acrosomique des spermatozoïdes de coq. Nos résultats ont montré que les canaux SOCs sont ceux ayant le plus fortement affecté la réaction acrosomique et il serait donc logique que nous commençons par cette famille en recherchant leur place dans les spermatozoïdes, leurs modes d'activation et d'éventuels partenaires putatifs pour les TRPCs qui pourraient faire le lien avec les autres acteurs de la signalisation calcique (l'IP3R ou le RyR) connus dans d'autres modèles pour être impliqués dans la réaction acrosomique.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier le rôle des canaux LVA pour « Low Voltage Activated » (Type T) impliqués dans la réaction acrosomique chez les oiseaux. Les canaux calciques de type T jouent un rôle crucial lors de la réaction acrosomique des spermatozoïdes de mammifères, au cours de laquelle trois différents types de canaux ont été identifiés et s'activent successivement (Walensky and Snyder, 1995 ; O'Toole et al, 2000). Les canaux de type T sont les premiers à s'activer (Arnoult et al, 1996 ; Arnoult et al, 1999). L'influx de calcium passant par ces canaux est transitoire et leur inactivation par des inhibiteurs spécifiques bloque l'activation du récepteur à l'IP3 situé au niveau de l'acrosome et d'un canal de type SOC TRPC2 (Jungnickel et al, 2001). Ainsi, le fait que l'activation de ces canaux de type T constitue l'événement initial de la signalisation calcique lors de la réaction acrosomique rend l'étude de leur régulation très importante. Si le schéma s'ouvrait être le même chez les oiseaux, nous chercherions à comprendre le rôle des ions calcium transitant par le canal T dans la suite de la signalisation en regardant si les caractéristiques biophysiques de ce canal sont modifiées après activation des autres canaux calciques impliqués dans la réaction acrosomique chez les oiseaux. Nous identifierions la régulation entre le canal calcique de Type T avec le récepteur à l'IP3 et les canaux calciques TRPCs. Pour cela, nous utiliserions des outils pharmacologiques pour moduler le récepteur à l'IP3 et les canaux calciques TRPCs, et ainsi pouvoir observer les conséquences sur les propriétés biophysiques du canal calcique de type T.

Au plan appliqué maintenant, nous pourrions étudier l'effet de l'AMPK en présence d'un système antioxydant suffisamment efficace (SOD, GPx ou GR) pendant la cryopréservation des spermatozoïdes. Nous espérons que la capacité des activateurs d'AMPK à restaurer l'action des enzymes antioxydantes, combinée à l'ajout d'enzymes commerciales permettra d'améliorer la fertilité des spermatozoïdes cryopréservés.

## **10. Conclusion**

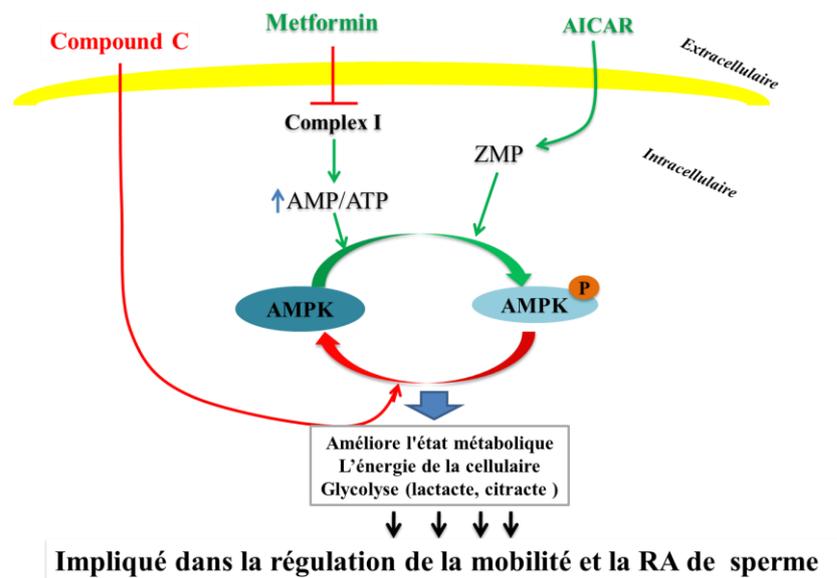
Bien que les spermatozoïdes soient des cellules spécialisées nécessitant un très haut potentiel énergétique, aucune étude n'avait été entreprise avant cette thèse pour examiner le rôle central de l'AMPK dans les fonctions cellulaires des spermatozoïdes aviaires.

Notre étude a permis de montrer l'importance de la stimulation de l'AMPK pour obtenir une régulation énergétique efficace et assurer le bon fonctionnement de la mobilité et de la réaction de réaction acrosomique (Figure 15). Elle a également mis en évidence le rôle de ce senseur métabolique dans la régulation des défenses anti-oxydantes de la cellule (Figure 16): et par voie de conséquence, dans ses capacités de conservation.

En remontant vers l'étude d'acteurs de signalisation en amont de l'AMPK, nous avons également pu identifier et proposer une approche du rôle de différents acteurs de signalisation liés au métabolisme énergétique et aux flux calciques des spermatozoïdes, en particulier les Calmodulines-dependent protein kinases kinases et la Calmoduline-dependent protein kinase I (CaMKI). Ces acteurs ont été identifiés et étudiés pour la première fois dans les gamètes aviaires. L'un d'entre eux (CaMKI) a également été identifié pour la première fois dans les cellules reproductrices, et nous avons pu montrer que les canaux transmembranaires calciques Store-operated calcium channels (SOCs) jouaient un rôle très important dans le processus (Figure 17).

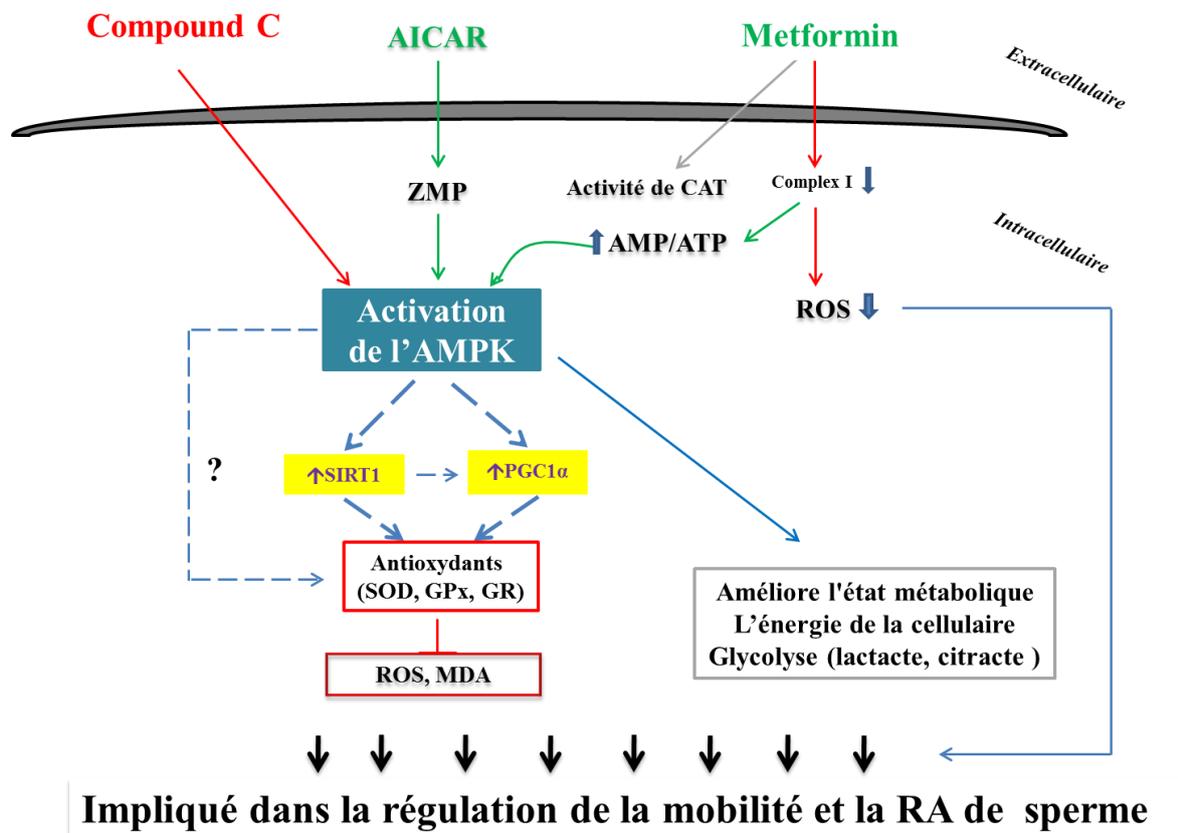
Ces travaux ont aussi permis d'évaluer dans quelle mesure la voie de signalisation de l'AMPK était altérée par la cryopréservation cellulaire, quels dysfonctionnements métaboliques pouvaient y être associés et comment ces effets négatifs pouvaient être contrecarrés.

Les résultats apportés par cette thèse ont une double portée, à la fois fondamentale et appliquée. Au plan fondamental, l'étude a apporté des connaissances avancées sur différents acteurs de la transduction du signal impliqués dans la fonction reproductrice des gamètes mâles. Au plan appliqué, les résultats pourront mener à modifier les protocoles de cryopréservation des gamètes pour mieux prendre en compte ces nouveaux facteurs.



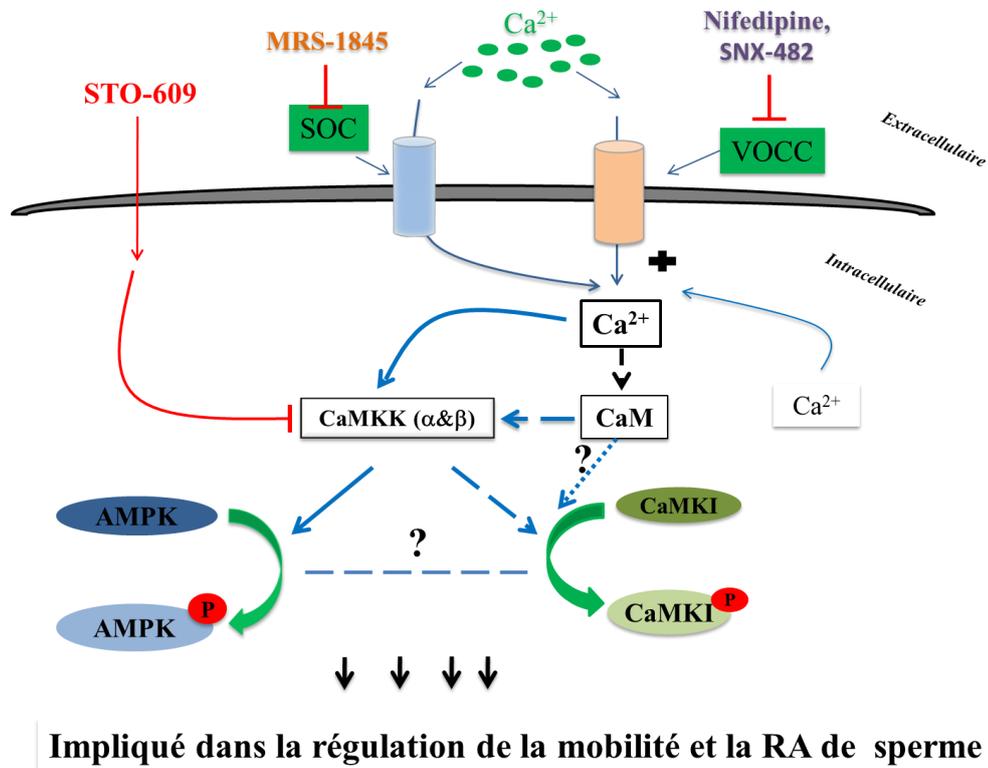
**Figure 15 : Schéma de la régulation de l'activité de l'AMPK dans les spermatozoïdes aviaires.** Ce schéma montre l'action des modulateurs de l'AMPK (CC, AICAR et MET) dans les spermatozoïdes aviaires. En stimulant l'AMPK, les activateurs provoquent une

amélioration du métabolisme qui conduit elle-même au contrôle des fonctions des spermatozoïdes. Les flèches pleines montrent les relations qui sont établies entre la stimulation (en vert): l'inhibition (en rouge): les signaux, l'amélioration de l'état métabolique et le contrôle des fonctions des spermatozoïdes aviaires. La flèche verte courbée vers le bas indique la stimulation de la phosphorylation de l'AMPK. La flèche rouge courbée vers le haut indique l'inhibition de la phosphorylation de l'AMPK.



**Figure 16: Schéma hypothétique du mécanisme impliqué dans les fonctions des enzymes antioxydantes de l'AMPK dans les spermatozoïdes aviaires.** Ce schéma montre que la stimulation de l'AMPK peut inhiber la production des radicaux libres de l'oxygène (ROS) en stimulant l'activation des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, GR) en réponse à l'AICAR ou à la Metformine et que le rôle antioxydant de l'AMPK peut être médié par l'activation d'autres facteurs, comme SIRT1 ou PGC1 $\alpha$ , qui induisent la stimulation de la biogenèse mitochondriale. Les flèches pleines montrent les relations qui sont établies entre la stimulation (en vert): l'inhibition (en rouge): les signaux, l'amélioration de l'état métabolique et le contrôle

des fonctions des spermatozoïdes aviaires. Les flèches avec des tirets indiquent des voies encore à l'état d'hypothèses.



**Figure 17 : Schéma hypothétique de la voie de signalisation du calcium impliquée dans la régulation de l'activation de l'AMPK dans les spermatozoïdes aviaires.** Ce schéma montre les implications potentielles du calcium dans l'activation de CaMKKs dans les spermatozoïdes aviaires. L'activation de l'AMPK et de CaMKI par CaMKKs provoquent une amélioration du métabolisme qui conduisent elle-même au contrôle des fonctions des spermatozoïdes. Les flèches pleines montrent les relations qui sont établies entre la stimulation (en vert): l'inhibition (en rouge): les signaux, l'amélioration de l'état métabolique et le contrôle des fonctions des spermatozoïdes aviaires. Les flèches vertes courbées indiquent la stimulation de la phosphorylation de l'AMPK et de CaMKI. Les flèches avec des tirets indiquent des hypothèses.

# **Bibliographie**

## Articles de périodiques imprimés

- ADEOYA-OSIGUWA SA.** Evidence for Ca(2+)-dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm. *Molecular reproduction and development*, 1996, 44(1): 111-120.
- AHMAD K.** Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases. *Archives of andrology*, 1995, 35(3): 187-208.
- ALVAREZ JG.** Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biology of reproduction*, 1982, 27(5): 1102-1108.
- AMANN RP.** Reflections on CASA after 25 years. *Journal of andrology*, 2004, 25(3): 317-325.
- AMIR D.** Passage and disappearance of labelled spermatozoa in the genital tract of the male Japanese quail in segregation or cohabitation. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 1973, 13(3): 321-328.
- ARNOULT C.** Activation of mouse sperm T-type Ca<sup>2+</sup> channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(23): 13004-13009.
- ASHIZAWA K.** Resolution of the sperm motility-stimulating principle of fowl seminal plasma into Ca<sup>2+</sup> and an unidentified low molecular weight factor. *Journal of reproduction and fertility*, 1987, 81(2): 495-499.
- ATTAL J.** Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys*, 1963, 3(3): 219-241.
- ATTIA SM.** Assessment of genomic instability in normal and diabetic rats treated with metformin. *Chemico-biological interactions*, 2009, 180(2): 296-304.
- BAAS AF.** Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *The EMBO journal*, 2003, 22(12): 3062-3072.
- BAKST MR.** Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. *Journal of reproduction and fertility*, 1980, 60(1): 121-127
- BALLACHEY BE.** The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *Journal of andrology*, 1988, 9(2): 109-115.
- BARBIER Y.** Cycle annuel du testicule de la pintade. *Bull. Bioch*, 1970, CIV(2): 119-147.

- BARTHEL A.** Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase. *Endocrinology*, 2002, 143(8): 3183-3186.
- BATEMAN A.** The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends in biochemical sciences*, 1997, 22(1): 12-13.
- BELLAGAMBA F.** Cryopreservation of poultry semen: a review. *World's Poult Sci J*, 1993, 49: 157-66.
- BENDAHMANE M.** Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2001, 390(1): 1-8.
- BERI RK.** Molecular cloning, expression and chromosomal localisation of human AMP-activated protein kinase. *FEBS letters*, 1994, 356(1): 117-121.
- BERRIDGE MJ.** The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2000, 1(1): 11-21.
- BLACKMORE PF.** Extragenomic actions of progesterone in human sperm and progesterone metabolites in human platelets. *Steroids*, 1999, 64(1-2): 149-156.
- BLACKMORE PF.** Thapsigargin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. *Cell calcium*, 1993, 14(1): 53-60.
- BLANCO JM.** Osmotic tolerance of avian spermatozoa: influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. *Cryobiology*, 2008, 56(1): 8-14.
- BLAUSTEIN MP.** Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological reviews*, 1999, 79(3): 763-854.
- BLESBOIS E.** Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poult Sci J*, 2007, 63, 213-22.
- BLESBOIS E.** Effect of different fractions of seminal plasma on the fertilizing ability of fowl spermatozoa stored in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, 1992, 95(1): 263-268.
- BLESBOIS E.** Freezing avian semen. *Avian Biol Res*, 2011, 4: 52-58.
- BLESBOIS E.** Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 2005, 129(3): 371-378.
- BLESBOIS E.** Recherche d'indicateurs d'aptitude à la congélation de la semence chez les oiseaux et mis au point de la cryopréservation de sperme de jars landais. *Les actes du BRG*, 2006, 6: 415-413.

- BLESBOIS E.** Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank. *Poultry science*, 2007, 86(3): 555-564.
- BLESBOIS E.** 'Serum like' albumin of fowl seminal plasma and effects of albumin on fowl spermatozoa stored at 4 degrees C. *British poultry science*, 1992, 33(3): 663-670.
- BLESBOIS E.** Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal : an international journal of animal bioscience*, 2007, 1(10): 1472-1481.
- BLOM E.** Live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin smears. *Fertility and sterility*, 1950, 1, 176-177.
- BOGDONOFF PD Jr.** The effect of pH on in vitro survival, metabolic activity, and fertilizing capacity of chicken semen. *Poultry Science*, 1954, 33: 665-669.
- BORMAN SM.** Progesterone promotes oocyte maturation, but not ovulation, in nonhuman primate follicles without a gonadotropin surge. *Biology of reproduction*, 2004, 71(1): 366-373.
- BOUDEAU J.** MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *The EMBO journal*, 2003, 22(19): 5102-5114.
- BRADLEY MP.** A sodium-calcium exchange mechanism in plasma membrane vesicles isolated from ram sperm flagella. *FEBS letters*, 1980, 121(1): 15-18.
- BRANDL CJ.** Adult forms of the Ca<sup>2+</sup>ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, 1987, 262(8): 3768-3774.
- BREITBART H.** Evidence for the presence of ATP-dependent calcium pump and ATPase activities in bull sperm head membranes. *Biochemical and biophysical research communications*, 1984, 122(2): 479-484.
- BRILLARD JP.** Influence of spermatozoa numbers and insemination frequency on fertility in dwarf broiler breeder hens. *Poultry science*, 1986, 65(12): 2330-2334.
- BRILLARD JP.** Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poultry science*, 1993, 72(5): 923-928.
- BROWN CR.** Comparison of neutral proteinase activities in cock and ram spermatozoa and observations on a proacrosin in cock spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*, 1976, 46(1): 155-164.
- BROWNE GJ.** Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *The Journal of biological chemistry*, 2004, 279(13): 12220-12231.

- BURK SE.** cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca<sup>2+</sup> pump. *The Journal of biological chemistry*, 1989, 264(31): 18561-18568.
- BURROWS WH, QUINN JP.** The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult Sci*, 1937, 16: 19-24.
- BWANGA CO.** Cryopreservation of boar semen. I: A literature review. *Acta veterinaria Scandinavica*, 1991, 32(4): 431-453.
- CANTO C.** AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(20): 3407-3423.
- CANTO C.** AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 2009, 458(7241): 1056-1060.
- CARAFOLI E.** Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB*, 1994, 8(13): 993-1002.
- CARAFOLIN E.** Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(3): 1115-1122.
- CARATTINO MD.** Epithelial sodium channel inhibition by AMP-activated protein kinase in oocytes and polarized renal epithelial cells. *J biol chem*, 2005, 280(18): 17608-17616.
- CARLING D.** A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett*, 1987, 223(2): 217-222.
- CASTELLANO LE.** Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS letters*, 2003, 541(1-3): 69-74.
- CATTERALL WA.** International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev*, 2003, 55(4): 579-581.
- CATTERALL WA.** Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 521-555.
- CENTOLA GM.** Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Mol Reprod Dev*, 1990, 27(2): 130-135.
- CEROLINI S.** Effect of docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, 2006, 66(4): 877-886.
- CHALAH T.** Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology*. 1998, 50(3): 487-493.

- CHALAH T.** In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 1999, 39(2): 185-191.
- CHEUNG PC.** Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J*, 2000, 346(Pt3): 659-669.
- CHIARELLA P.** Ryanodine receptors are expressed and functionally active in mouse spermatogenic cells and their inhibition interferes with spermatogonial differentiation. *Journal of cell science*, 2004, 117(Pt 18): 4127-4134.
- CLARKE RN.** Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. *Poultry science*, 1984, 63(4): 801-805.
- CLERMONT Y.** Différenciation et évolution des cellules sexuelles 1° la lignée mâle. Cinétique de la spermatogénèse chez les mammifères. *Arch Anat Microsc*, 1967, 56: 7-60.
- COOL B.** Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell metabolism*, 2006, 3(6): 403-416.
- COOPER DM.** Relation between fertility, embryonic survival and some semen characteristics in the chicken. *Poultry science*, 1958, 37: 699-706.
- CORTON JM.** 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *European journal of biochemistry / FEBS*, 1995, 229(2): 558-565.
- CORTON JM.** Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Current biology*, 1994, 4(4): 315-324.
- COSSARIZZA A.** Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level. *Exp Cell Res*, 1996, 222(1): 84-94.
- COUROT M.** Développement du testicule chez l'agneau. Etablissement de la spermatogénèse. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys*, 1962, 2(1): 25-41.
- COUROT M.** Transport and maturation of spermatozoa in the epididymis of mammals. *Prog. Reprod. Biol*, 1981, 8: 67-79.
- CRUTE BE.** Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1998, 273(52): 35347-35354.
- DACHEUX JL.** Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech*. 2003, 61(1): 7-17.
- DARSZON A.** Are TRP channels involved in sperm development and function? *Cell Tissue Res* 2012, 349(3): 749-764.

**DONOGHUEA AM.** Storage of poultry semen. *Anim Reprod Sci*, 2000, 62(1-3): 213-232.

**DOWNS SM.** A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. *Dev Biol*, 2002, 245(1): 200-212.

**DROBNIS EZ.** Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool*, 1993, 265(4): 432-437.

**FAWCETT DW.** A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod Suppl*, 1970, 2: 90-127.

**FENG HL.** Impact of Ca<sup>2+</sup> flux inhibitors on acrosome reaction of hamster spermatozoa. *J Androl*, 2007, 28(4): 561-564.

**FESKE S.** A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006, 441(7090): 179-185.

**FLORMAN HM.** Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol*, 1992, 152(2): 304-314.

**FLORMAN HM.** Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca<sup>2+</sup> are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol*, 1994, 165(1): 152-164.

**FORETZ M.** Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*, 2010, 120(7): 2355-2369.

**FRASER LR.** Ca(2+)-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca(2+)-ATPase. *J Reprod Fertil*, 1992, 96(1): 363-377.

**FUJIHARA N.** Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. *Poult Sci*, 1978, 57(6): 1766-1768.

**FULTON JE.** Avian genetic stock preservation: an industry perspective. *Poult Sci*, 2006, 85(2): 227-231.

**GALARDO MN.** Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 330(1-2): 49-58.

**GALARDO MN.** The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribose nucleoside, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol*, 2007 39(4): 279-288.

**GARNER DL.** Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, 1997, 57(6): 1401-1406.

**GARNER DL.** Porcine sperm viability, oocyte fertilization and embryo development after staining spermatozoa with SYBR-14. *Theriogenology*, 1996, 45(6): 1103-1113.

**GARNER DL.** Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*, 1995, 53(2): 276-284.

- GORANSSON O.** Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2007, 282(45): 32549-32560.
- GORDON M.** Identification of phosphates on the membranes of guinea pig sperm. *Anat Rec*, 1978, 191(1): 123-133.
- GORDON M.** Localization of phosphatase activity on the membranes of the mammalian sperm head. *J Exp Zool*, 1973, 185(1): 111-120.
- GRANADOS-GONZALEZ G.** Identification of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in sea urchin sperm. *FEBS Lett*, 2005, 579(29): 6667-6672.
- GRAVANCE CG.** Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod Toxicol*, 2001, 15(1): 5-10.
- GREEB J.** Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem*, 1989, 264(31): 18569-18576.
- GUIGAS B.** Beyond AICA riboside: in search of new specific AMP-activated protein kinase activators. *IUBMB Life*, 2009, 61(1): 18-26.
- GUNARATNE HJ.** Evidence for a secretory pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase in sea urchin spermatozoa. *FEBS Lett*, 2006, 580(16): 3900-3904.
- GUNARATNE HJ.** Plasma membrane calcium ATPase is concentrated in the head of sea urchin spermatozoa. *J Cell Physiol*, 2006, 207(2): 413-419.
- GUNTESKI-HAMBLIN AM.** A novel Ca<sup>2+</sup> pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca<sup>2+</sup> and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site. *J Biol Chem*, 1988, 263(29): 15032-15040.
- HAMMERSTEDT RH.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, 1990, 11(1): 73-88.
- HAMMERSTEDT RH.** Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 1992, 29(1): 26-38.
- HANKS SK.** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 1988, 241(4861): 42-52.
- HARDIE DG.** AMP-activated protein kinase-development of the energy sensor concept. *J Physiol*, 2006, 574(pt1): 7-15.
- HARDIE DG.** AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012, 13(4): 251-262

- HARDIE DG.** Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, 2003, 144(12): 5179-5183.
- HARPER C.** Secretory pathway Ca(2+)-ATPase (SPCA1) Ca(2+) pumps, not SERCAs, regulate complex [Ca(2+)](i) signals in human spermatozoa. *J Cell Sci*, 2005, 118(pt): 1673-1685.
- HARPER CV.** Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of [Ca(2+)](i) oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem*, 2004, 279(44): 46315-46325.
- HARRIS GC, Jr.** Changes in the ultrastructure of the fowl spermatozoon due to rapid freeze-thaw. *J Reprod Fertil*, 1973, 34(3): 389-394.
- HAWLEY SA.** 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J Biol Chem*, 1995, 270(45): 27186-27191
- HAWLEY SA.** Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab*, 2005, 2(1): 9-19.
- HAWLEY SA.** Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1996, 271(44): 27879-27887.
- HAWLEY SA.** Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*, 2003, 2(4): 28.
- HERNANDEZ M.** Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of semen frozen in medium-straws from good and sub-standard freezer AI-boars. *Cryobiology*, 2007, 54(1): 63-70.
- HERRICK SB.** The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol*, 2005, 202(3): 663-671.
- HO HC.** An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca(2+) store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol Reprod*, 2001, 65(5): 1606-1615.
- HO HC.** Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod*, 2003, 68(5): 1590-1596.
- HOLT WV.** Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 1997, 9(3): 309-319.
- HOLT WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 2000a, (1-3): 62: 3-22.

**HOLT** WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 2000b, 53(1): 47-58.

**HOLZ** MK. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem*, 2005, 280(28): 26089-26093.

**HORMAN** S. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol*, 2002, 12(16): 1419-1423.

**HORMAN** S. Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J Biol Chem*, 2006, 281(9): 5335-5340.

**HORROCKS** AJ. Induction of acrosomal exocytosis in chicken spermatozoa by inner perivitelline-derived N-linked glycans. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 278(1): 84-89.

**HOU** X. Luteinizing hormone stimulates mammalian target of rapamycin signaling in bovine luteal cells via pathways independent of AKT and mitogen-activated protein kinase: modulation of glycogen synthase kinase 3 and AMP-activated protein kinase. *Endocrinology*, 2010, 151(6): 2846-2857.

**HUDSON** ER. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol*, 2003, 13(10): 861-866.

**HURLEY** RL. Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J Biol Chem*, 2006, 281(48): 36662-36672.

**HURTADO DE LLERA** A. AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38840.

**HURTADO DE LLERA** A. AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of plasma membrane organization in boar spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(9): 2143-2151

**HURTADO DE LLERA** A. AMPK up-activation reduces motility and regulates other functions of boar spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 2015, 21(1): 31-45

**IGNOTZ** GG. Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembrated bovine sperm. *Biol Reprod*, 2005, 73(3): 519-526.

**JUNGNICHEL** MK. Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(5): 499-502.

**KAHN** BB. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 2005, 1(1): 15-25.

- KEMP BE.** AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(pt1): 162-168.
- KEMP BE.** Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *J Clin Invest*, 2004, 113(2): 182-184.
- KHATIR H.** Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during in vitro maturation. *Theriogenology*, 1998, 50(6): 917-929.
- KIDO S.** Macromolecular components of the vitelline membrane of hen's egg. I. Membrane structure and its deterioration with age. *J Biochem*, 1975, 78(2): 261-268.
- KIM YD.** Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes*, 2008, 57(2): 306-314.
- KOAY A.** AMPK beta subunits display isoform specific affinities for carbohydrates. *FEBS Lett*, 2010, 584(15): 3499-3503.
- KOAY A.** Oligosaccharide recognition and binding to the carbohydrate binding module of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett*, 2007, 581(26): 5055-5059.
- KOEHLER JK.** Lectins as probes of the spermatozoon surface. *Arch Andro*, 1981, 6(3): 197-217
- KOMAREK RJ.** Lipids of porcine spermatozoa, seminal plasma and gel. *J. Reprod. Fertil*, 1965, 9: 131-136.
- KORN N.** Ultrastructure of spermatozoa from Japanese quail. *Poult Sci*, 2000, 79(3): 86-93.
- KOVACIC S.** Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem*, 2003, 278(41): 39422-39427.
- KRASZNAI Z.** Role of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in calcium homeostasis and human sperm motility regulation. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006, 63(2): 66-76.
- KURODA Y.** Are there inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) receptors in human sperm? *Life Sci*, 1999, 65(2): 135-143.
- KURTH-KRACZEK EJ.** 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*, 1999, 48(8): 1667-1671.
- LABAS V.** Qualitative and quantitative peptidomic and proteomic approaches to phenotyping chicken semen. *J Proteomics*, 2015, 112: 313-335.
- LAKE PE.** Effect on fertility of storing fowl semen for 24 h at 5 degrees C in fluids of different pH. *J Reprod Fertil*, 1979, 57(1): 149-155.
- LAKE PE.** Some effects of the composition of inseminated semen and the site of its deposition on fertility in Gallus domesticus. *Animal reproductive science*, 1985, 9(3): 273-284.

- LAKE PE.** The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm. *Poult Sci*, 1986, 65(1): 1-15.
- LAKE PE.** The ultrastructure of the ejaculated fowl spermatozoon. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 1968, 53(4): 356-366.
- LECLERC I.** Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, 2001, 50(7): 1515-1521.
- LECLERC I.** Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286(6): E1023-1031.
- LEFIÈVRE L.** 2-APB-potentiated channels amplify CatSper-induced Ca(2+) signals in human sperm. *Biochem J* 2012, 448(2): 189-200.
- LEMOINE M.** A reappraisal of the factors involved in in vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. *Reproduction*. 2008, 136(4): 391-399.
- LEMOINE M.** Potential involvement of several signaling pathways in initiation of the chicken acrosome reaction. *Biology of reproduction*, 2009, 81(4): 657-665.
- LI M.** Signal transduction pathways in guinea pig sperm. *Sci China C Life Sci*, 1996, 39(5): 484-490.
- LIN J.** Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*, 2005, 1(6): 361-370.
- LIN M.** The cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and estimation of its duration. *J Reprod Fertil*, 1990, 88(2): 481-490.
- LIU J.** STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* 2005, 15(13): 1235-1241.
- LOBLEY A.** Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1: 53.
- LOCHHEAD PA.** 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes*, 2000, 49(6): 896-903.
- LONG JA.** An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poult Sci*, 2004, 83(41): 1594-601.
- LONG JA.** Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges. *Poult Sci*, 2006, 85(2): 232-236.

- LONGNUS SL.** 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 284(4): R936-944.
- LYTTON J.** Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene. *J Biol Chem*, 1988, 263(29): 15024-15031.
- LYTTON J.** Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport. *Biochem J*, 2007, 406(3): 365-382.
- MACLENNAN DH.** Amino-acid sequence of a Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, 1985, 316(6030): 696-700.
- MANSFIELD R.** Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril*, 2003, 79(4): 956-962.
- MARCHAND CR.** Étude par auto radiographie et marquage à la thymidine tritiée de la durée de la spennatogenèse du canard de Barbarie (*Cairina mosha/a L.*). *C.R Soc. Biol*, 1977, 171: 927-931.
- MARTINET L.** Etablissement de la spennatogenèse chez le campagnol des champs (*Micro/us arvalis*) en fonction de la durée quotidienne d'éclairement. *Ann.Biol. Anim. Bioch. Biophys*, 1963, 3(4): 343-352.
- MARTY I.** Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(6): 2270-2274.
- MARVAN F.** Postnatal development of the male genital tract of the *Gallus domesticus*. *Anat Anz*, 1969, 124(4): 443-462.
- MAXWELL WM.** Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 1999, 52(8): 1353-1362.
- MCBRIDE A.** The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab*, 2009, 9(1): 23-34.
- MCINDOE WM.** Distribution of some hyfrolytic enzyme in semen of domestic fow, *gallus-domesticus*. *Journal of reproduction and fertility*, 1974, 40: 359.
- MERRILL GF.** AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol*, 1997, 273(6pt1): E1107-1112.

**MIKI K.** Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(47): 16506.

**MITCHELHILL KI.** Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase beta1 subunit. *J Biol Chem*, 1997, 272(39): 24475-24479.

**MOHAN J.** Isolation of a spermatozoa motility inhibiting factor from chicken seminal plasma with antibacterial property. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1245(3): 407-413.

**MOMCILOVIC M.** Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem*, 2006, 281(35): 25336-25343.

**MUKAI C.** Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod*, 2004, 71: 540-547.

**NAABY-HANSEN S.** Co-localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and calreticulin in the equatorial segment and in membrane bounded vesicles in the cytoplasmic droplet of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7: 923-933.

**NEILD D.** Hyposmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999, 51 : 721-727.

**NIKPOOR P.** CatSper gene expression in postnatal development of mouse testis and in subfertile men with deficient sperm motility. *Hum Reprod*, 2004, 19: 124-128.

**NISHIDA T.** Comparative and topographical anatomy of the fowl. XLII. Blood vascular system of the male reproductive organs. *Jap. J. Vet. Sei*, 1964, 26: 211-221.

**NISHIYAMA H.** Studies on the accessory reproductive organs in the cock. *J.F.Agric*, 1955, 10: 277-305.

**OKAMURA F.** The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl *Gallus gallus*. *Cell Tiss Res*, 1978, 188: 497-508

**ORTAVANT R.** Action de la durée d'éclairement sur le processus spermatogénétique chez le bélier. *C.R. Soc. Biol*, 1956, 150: 471.

**OWEN MR.** Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical Journal*, 2000, 348: 607-614.

**PADINJAT R.** TRP channels at a glance. *J Cell Sci*, 2004, 117: 5707-5709.

**PALMER MB.** The requirement of a trypsin-like acrosomal enzyme for fertilization in the domestic fowl. *Journal of reproduction and fertility*, 1973, 37: 7-11.

**PELLATT LJ.** Phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) by metformin in the human ovary requires insulin. *Endocrinology*. 2011, 152(3): 1112-1118.

- PETITJEAN M.** Résultats expérimentaux sur la subfertilité liée à la crête rosacée chez le coq. *Cong. Mond. Avic. Madrid*, 1970, 1: 302-303
- PHILIPSON KD.** Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol*, 2000, 62: 111-133.
- POLEKHINA G.** AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol*, 2003, 13: 867-871.
- PUTNEY JW, Jr.** Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, 1990, 11: 611-624.
- QUILL TA.** A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 12527-12531.
- REN D.** A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 2001, 413(6856): 603-609.
- REVIERS M. de.** Détermination de la durée du processus spermatogénétique chez le coq à l'aide de thymidine tritiée. *VI Congo Int. Reprod. Anim. Insem. ArtiL*, Paris, 1968, 1: 183-185.
- REVIERS M. de.** Le développement testiculaire chez le Coq. I. Croissance pondérale des testicules et développement des tubes séminifères. *Ann. Siol. anim. Biochim. Biophys*, 1971a 11(4): 519-530.
- REVIERS M. de.** Le développement testiculaire chez le coq: II Morphologie de l'épithélium séminifère et établissement de la spermatogenèse. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys*, 1971b, 11(4): 531-546.
- RHIM JA.** Expression of an avian protamine in transgenic mice disrupts chromatin structure in spermatozoa. *Biol Reprod*, 1995, 52(1): 20-32.
- ROHAS LM.** A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(19): 7933-7938.
- SAINT JALME M.** Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology*, 2003, 59(3-4): 875-888.
- SAMOUR JH.** Seminal plasma composition in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 1986, 84(4): 735-738.
- SATIR P.** The mechanochemical cycle of the dynein arm. *Cell Motil*, 1981, 1(3): 303-327.
- SAUVEUR B.** Conservation prolongée et transport des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles des oiseaux. *Colloque de la société internationale pour l'étude de la stérilité et fécondité*, 1979: 65-86.
- SCHLINGMANN K.** Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *J Androl*, 2007, 28(5): 706-716.

**SCHUH K.** Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem*, 2004, 279(27): 28220-28226.

**SCOTT JW.** CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest*, 2004, 113(2): 274-284.

**SEIGNEURIN F.** Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Theriogenology*, 1995, 43(8): 1351-1358.

**SERRES C.** RU486 and calcium fluxes in human spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 204(3): 1009-1015.

**SHAFFNER CS.** Viability of spermatozoa of the chicken under various conditions. *Poultry science*, 1941, pp 259-265.

**SHAW RJ.** The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*, 2005, 310(5754): 1642-1646.

**SHIN S.** trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(1): 83-87.

**SHULL GE.** Physiological functions of plasma membrane and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pumps revealed by analysis of null mutants. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 986: 453-460.

**SI Y.** Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod*, 2000, 62(5): 1231-1239.

**SMILEY ST.** Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(9): 3671-3675.

**SMITH AC.** AMP kinase activation with AICAR simultaneously increases fatty acid and glucose oxidation in resting rat soleus muscle. *J Physiol*, 2005, 565(pt2): 537-546.

**SMITH AU.** Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, 1950, 166(4225): 668-669.

**SONTAKKE SD.** Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the Blue rock pigeon (*Columba livia*). *Theriogenology*, 2004, 62(1-2): 139-153.

**STAHMANN N.** Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(16): 5933-5945.

**STAPLETON D.** Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem*, 1994, 269(47): 29343-29346.

- STEIN SC.** The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* 2000, 345(Pt 3): 437-443.
- STREHLER EE.** Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev*, 2001, 81(1): 21-50.
- STRICKER SA.** Stimulators of AMP-activated kinase (AMPK) inhibit seawater- but not cAMP-induced oocyte maturation in a marine worm: Implications for interactions between cAMP and AMPK signaling. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(6): 497-510.
- SU YH.** A flagellar K(+)-dependent Na(+)/Ca(2+) exchanger keeps Ca(2+) low in sea urchin spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(10): 6743-6748.
- SULLIVAN JE.** Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett*, 1994, 353(1): 33-36.
- SURAI PF.** Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 1998, 120(3): 527–533.
- SUTTON KA.** Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm. *Dev Biol*, 2004, 274(2): 426-435.
- TANEJA GC.** Effect of varying doses of undiluted semen on fertility in the domestic fowl. *Nature*, 1961, 191: 828-829.
- TANWAR PS.** Altered LKB1/AMPK/TSC1/TSC2/mTOR signaling causes disruption of Sertoli cell polarity and spermatogenesis. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(20): 4394-4405.
- TARTARIN P.** Inactivation of AMPK $\alpha$ 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology*, 2012, 153(7): 3468-3468.
- TASH JS.** Ca<sup>2+</sup> regulation of sperm axonemal motility. *Methods Enzymol*, 1987, 139, 808–823.
- TASH JS.** Identification, characterization and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J Cell Biol*, 1988, 106(5): 1626–1633.
- THOMAS CA.** Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 1998, 58(3): 786-793.
- THOMSON MF.** Temperature-mediated regulation of calcium flux and motility in fowl spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1991, 93(2): 385-391.
- TINGARI MD.** Ultrastructural studies on the uterovaginal sperm-host glands of the domestic hen, *Gallus domesticus*. *J Reprod Fertil*, 1973, 34(3): 423-431.

- TON VK.** Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca(2+): Mn(2+)-ATPase defective in Hailey-Hailey disease. *J Biol Chem*, 2002, 277(8): 6422-6427.
- TOSCA L.** Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 2005, 146(10): 4500-4513.
- TOSCA L.** AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *J Endocrinol*, 2006a 190(1): 85-97.
- TOSCA L.** Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biol Reprod*, 2007, 76(3): 368-378.
- TOSCA L.** Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. *Biol Reprod*, 2006b, 75(3): 342-351.
- TOWLER MC.** A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *Biochem J*, 2008, 416(1): 1-14.
- TREEBAK JT.** AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes*, 2006, 55(7): 2051-2058.
- TREVINO CL.** Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett*, 2001, 509(1): 119-125.
- TREVINO CL.** Localisation of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications. *Zygote*, 1998, 6(2): 159-172.
- TRIPHAN J.** Localization and regulation of plasma membrane Ca(2+)-ATPase in bovine spermatozoa. *Eur J Cell Biol*, 2007, 86(5): 265-273.
- TSELUTIN K.** Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult Sci*, 1999, 78(4): 586-90.
- TSELUTIN K.** Cryopreservation of poultry semen. *Br Poult Sci*, 1995, 36(5): 805-811.
- UHLER ML.** Assessment of human sperm acrosome reaction by flow cytometry: validation and evaluation of the method by fluorescence-activated cell sorting. *Fertil Steril*, 1993, 60(6): 1076-1081.
- VAN BAELEN K.** The contribution of the SPCA1 Ca<sup>2+</sup> pump to the Ca<sup>2+</sup> accumulation in the Golgi apparatus of HeLa cells assessed via RNA-mediated interference. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(2): 430-436.
- VAN WAMBEKE F, FUJIHARA N.** The effect of transparent fluid on fertility, hatchability and embryonic mortality following insemination of a normal number of stored fowl spermatozoa. *Canadian journal of animal science*, 1994, 74: 475-478.

- VARNER DD.** Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, 2008, 70(3): 448-462.
- VELASCO G.** Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 337(2): 169-175.
- VERMASSEN E.** Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol Cell*, 2004, 96(1): 3-17.
- VINCENT MF.** Inhibition by AICA riboside of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Diabetes*, 1991, 40(10): 1259-1266.
- VIOLLET B.** AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf)*: 2009, 196(1): 81-98.
- WARDEN SM.** Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J*, 2001, 354(pt2): 275-283.
- WATERHOUSE KE.** Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, 2006, 131(5): 887-894.
- WATSON PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 2000, 60-61: 481-492.
- WENNEMUTH G.** Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *J Gen Physiol*, 2003, 1122(1): 115-128.
- WESTENBROEK RE.** Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel alpha1 subunits in sperm. *Dev Biol*, 1999, 207(2): 457-469.
- WHITE DR.** Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res*, 1989, 22(2): 163-177.
- WHITE IG.** Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod Fertil Dev*, 1993, 5(6): 639-658.
- WILL MA.** Metformin: direct inhibition of rat ovarian theca-interstitial cell proliferation. *Fertil Steril*, 2012, 98(1): 207-214.
- WISHART GJ.** Correlation of the fertilising ability of semen from individual male fowls with sperm motility and ATP content. *Br Poult Sci*, 1986, 27(1): 97-102.

- WONG KA.** A revised model for AMP-activated protein kinase structure: The alpha-subunit binds to both the beta- and gamma-subunits although there is no direct binding between the beta- and gamma-subunits. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 36434-36442.
- WOODS A.** Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, 2005, 2(1): 21-33.
- XIA LJ.** Ultrastructure of fresh and frozen-thawed spermatozoa of high and low fertility lines of chickens. *Poult Sci*, 1988, 67: 819-825.
- XIE M.** A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(5): 17378-17383.
- XIE Z.** Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation*, 2008, 117(46): 952-962.
- YUNES R.** Rab3A and calmodulin regulate acrosomal exocytosis by mechanisms that do not require a direct interaction. *FEBS Lett*, 2002, 525(1-3): 126-130.
- ZHANG X.** Effects of follicle-stimulating hormone and ovarian steroids during in vitro meiotic maturation on fertilization of rat oocytes. *Gamete Res*, 1989, 23(3): 267-277.
- ZHOU G.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 2001, 108(8): 1167-1174.

## Chapitre dans un ouvrage imprimé

- BATELLIER F.** Anatomie et physiologie de l'appareil génital femelle des oiseaux. In : **COUAILLER J.** (éd.): *Reproduction des animaux domestiques*. Éditions Educagri. Dijon, France, 2005, 342-355.
- BLESBOIS E.** Anatomie et physiologie de l'appareil reproducteur mâle des oiseaux. In : **COUAILLER J.** (éd.): *Reproduction des animaux domestiques*. Éditions Educagri. Dijon, France, 2005, 358-367.
- BLESBOIS E.** Introduction à la reproduction des oiseaux domestiques. In : **COUAILLER J.** (éd.): *Reproduction des animaux domestiques*. Éditions Educagri. Dijon, France, 2005, 334-340.

**BLESBOIS E.** La reproduction des oiseaux. In : **SAINT-DIZIER M, CHASTANT-MAILLARD S** (éd.): *La reproduction animale et humaine*. Éditions Quæ, Versailles cedex, France, 2014, 673-686.

**DADOUNE JP.** Structure et fonction du testicule. In: **THIBAUT C, LEVASSEUR MC** (éd.): *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Éditions Ellipse, Paris, 1991, 221-250.

**ETCHES RJ.** The male. In : *Reproduction in Poultry*. Wallingford, London, UK, 1996, 208-233.

**FOURNIER-DELPECH.** Acquisition de la fécondance du spermatozoïdes. In : *la reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris : INRA Ellipse. 1991, 251-271.

**FRASER LR.** Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction. In: **FENICHEL P, PARINAUD J** (éd.): *Human sperm acrosome reaction*. Colloque/INSERM John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge, France, 1995, 236, 17-33.

**GOVOROUN M.** De la fécondation à l'éclosion de l'oeuf chez les oiseaux. In : couailler J. (éd.): *Reproduction des animaux domestiques*. Éditions Educagri. Dijon, France, 2005, 370-380.

**REVIERS M. de.** Appareil génital mâle et production des spermatozoïdes. In : **SAUVEUR B** et de **REVIERS M** (éd.): *Reproduction des volailles et production d'oeufs*. Paris, Fr: INRA; 1988; 141-181.

**WAITES GMH.** Temperature regulation and the testis. In : **JOHNSON AD, GOMES WR** et **VANDEMARK NL** (eds.): *The testis*, vol. 1. London, UK : Academie Press. 1970.

## Ouvrages imprimés

**BARRIE GM.** Reproductive Biology and Phylogeny of Birds: Phylogeny, Morphology, Hormones, Fertilization, vol. 6A. Édition Jamieson, Enfield, NH: Science Publishers, 2007, 609 p.

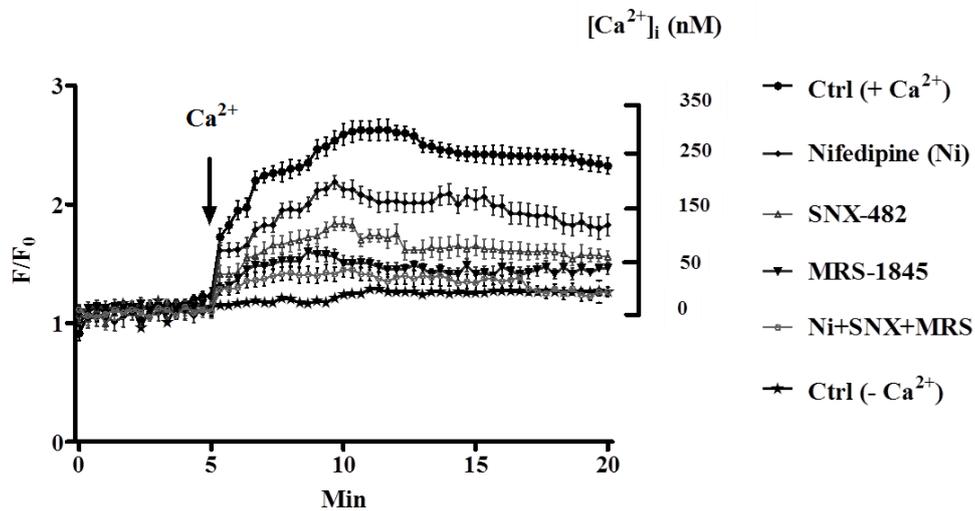
## Travaux universitaires

**BRILLARD JP.** *Influence de la photopériode quotidienne sur le développement des testicules et sur l'établissement de la spennatogenèse chez la pintade.* Thèse, Faculté des Sciences exactes et Naturelles de l'Université de Tours, 1981, 68 p.

**PETITJEAN M.** *Recherches sur l'estimation du pouvoir fécondant des coqs.* Mémoire d'ingénieur du CNAM, Central national des Arts et Métiers, Paris, 1965.

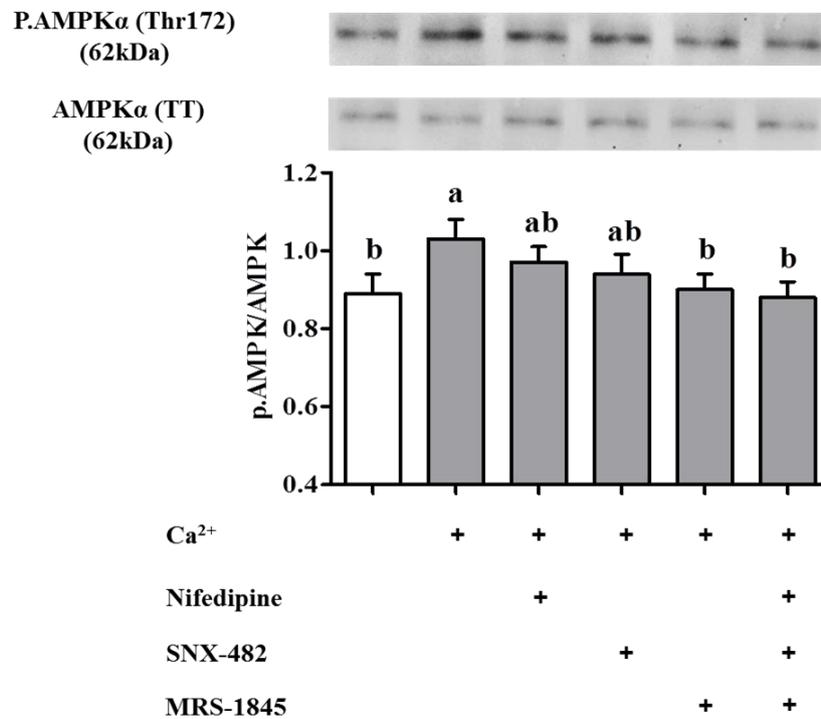
# **Annexes**

**Annexe 1:** Changes in the intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in chicken sperm with or without the inhibitors of  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity at  $35^\circ\text{C}$  (Article 3)



**Annexe 1.** Changes in the intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in chicken sperm with or without the inhibitors of  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity at  $35^\circ\text{C}$ . Sperm cells were incubated with Fluo-4/AM as described in the Materials and Methods section. The intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) were analyzed by spectrofluorimeter with an excitation wavelength of 494 nm and an emission of 506 nm. Fluorescence signals were expressed as  $F/F_0$  ( $F_0$  is the initial level of fluorescence). Sperm incubated in the + 5mM  $\text{Ca}^{2+}$  (black circles, ●): with Nifedipine (black diamonds, ◆): SNX-482 (white triangles, △): MRS-1845 (black triangles, ▼): Ni+SNX-482+MRS-1845 (white circles, ○) and - $\text{Ca}^{2+}$  (black stars, ★). The graph shows the average  $\pm$  SEM of six different experiments.

**Annexe 2:** Effect of Ca<sup>2+</sup> channel activity inhibitors (Nifedipine, SNX-482 and MRS-1845) with +Ca<sup>2+</sup> on STO-609-induced AMPK phosphorylation in sperm and sperm functions (Article 3)



**Annexe 2. Effect of Ca<sup>2+</sup> channel activity inhibitors (Nifedipine, SNX-482 and MRS-1845) with +Ca<sup>2+</sup> on STO-609- induced AMPK phosphorylation in sperm and sperm functions.** Sperm were incubated with 20μM Nifedipine, 60nM SNX-482 or 20μM MRS-1845 for 5 min before adding 5mM Ca<sup>2+</sup> and/or STO-609. Negative control: sperm were incubated in -Ca<sup>2+</sup> medium without the inhibitors. Positive control: sperm were incubated in + 5mM Ca<sup>2+</sup> medium without the inhibitors. **A)** AMPK phosphorylation: sperm were incubated 5 min more after adding 5mM Ca<sup>2+</sup>, **B)** Sperm motility, **C)** Acrosome reaction, **D)** Viability: sperm were incubated at 5 min and 30 min more after adding 5mM Ca<sup>2+</sup>. The experiment was repeated four times for western-blotting; six times for motility, viability and AR; values (%) are mean ± SEM. Different superscripts indicate statistically significant differences (P < 0.05).



**NGUYEN Thi Mong Diep**  
**Rôle de protéines clés de  
signalisation dans la qualité de  
cellules de reproduction destinées  
à être cryopréservées**



## Résumé

L'AMPK est un senseur cellulaire des réserves énergétiques de l'organisme. Les spermatozoïdes, mobilisent beaucoup d'énergie pour leur mobilité et la fécondation de l'ovocyte. L'objectif de ce travail était de caractériser et décrire des éléments clés de la voie de signalisation de l'AMPK, de comprendre leur implication dans les spermatozoïdes de coq et d'étudier comment leurs modulateurs peuvent impacter les fonctions des gamètes conservés *in vitro*. Nous avons montré une augmentation de la mobilité et de la réaction acrosomique dans les spermatozoïdes exposés à l'AICAR et à la metformine, des activateurs de l'AMPK, y compris après avoir été congelés. Ces activateurs ont partiellement restauré les activités des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, GR): et diminué les ROS et la LPO dans les spermatozoïdes décongelés. Nous avons établi la présence des CaMKKs ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et de CaMKI dans les spermatozoïdes et leur rôle lié au calcium extracellulaire (via les canaux calciques SOCs) dans la voie de régulation de l'AMPK et dans la mobilité et la réaction acrosomique des spermatozoïdes.

En conclusion, ce travail confirme le rôle de différents acteurs de signalisation liés au métabolisme énergétique et aux flux calciques dans les fonctions des spermatozoïdes.

Mots clés : reproduction, AMPK, Metformine, AICAR, Compound C, CaMKK, CaMKI.

## Résumé en anglais

AMPK is a cellular sensor of body energy reserves. Spermatozoa mobilize a lot of energy for their motility and the fertilization of the oocyte. The objective of this work was to characterize and describe key elements of the signaling pathway of AMPK, understand their involvement in chicken spermatozoa and study how their modulators may impact the functions of *in vitro* preserved gametes. We showed an increase in mobility and acrosome reaction in spermatozoa exposed to AICAR and metformin, activators of AMPK, including after freezing. These activators have partially restored the activities of antioxidant enzymes (SOD, GPx, GR): and decreased ROS and LPO in thawed spermatozoa. We have established the presence of CaMKKs ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and CaMKI in sperm and their role related to extracellular calcium (via calcium channels SOCs) in the control channel of AMPK and in motility and acrosome reaction of spermatozoa.

In conclusion, this work confirms the role of different signaling actors related to energy metabolism and calcium fluxes in spermatozoa functions.

Keywords: reproduction, AMPK, Metformin, AICAR, Compound C, CaMKK, CaMKI.