



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Etude bibliographique sur la capacitation in vitro des
spermatozoïdes bovins**

Présenté par
CHAFA Dyhia

Devant le jury :

Président(e) : YAHIMI. A MCB ISV-B1

Examineur : KELANEMER. R MCB ISV-B1

Promoteur : ADEL. D MAA ISV-B1

Année : 2017-2018

REMERCIEMENTS

Au nom de DIEU, qui m'a donné la force, la volonté et la patience durant toutes ces années d'étude et qui m'a guidé pour réaliser ce travail.

Je tien à remercier tout particulièrement mon promoteur Dr ADEL .D qui m'a inspiré ce sujet et guidé dans ce travail.

Je tien à remercier tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements vont aux membres de jury:

A Monsieur YAHIMI.A , vous me faite l'honneur et le plaisir d'accepter la présidence de jury, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur KELENAMER.R, Je vous remercie d'avoir accepté de mon travail et d'être membre de jury.



Dédicaces

Du profond de mon cœur, Je dédie ce travail qui couronne cinq années d'études supérieures riches en rebondissements à tous ceux qui sont chers,
Au Dieux le tout puissant, qui m'a permet d'accomplir ce travail.

A ma chère mère :

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices puisse Dieux, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mes chers frères et sœurs :

Je vous dédie ce travail en témoignage des liens solides et intimes qui nous unissent et pour vos soutiens, encouragements en vous souhaitant un avenir plein de succès et de bonheur.

Tout particulièrement ma sœur **Samia** et son époux **Nadir** ainsi leurs petit chouchou de la famille **Amayas** qui ne cessent de s'inquiéter pour moi.

Que dieux vous bénisse et vous garde l'un pour l'autre.

A tous mes collègues et amis :

De ce fait je cite : NABIL, SAMIR, ASMA, FAZIA

Qui sont comme les étoiles .Nous ne pouvant pas toujours les voir .Nous savons pourtant qu'ils sont là.

A ma précieuse copine de cœur Nanouche :

Une présence chaleureuse, bienveillante, qui sait me faire du bien .Tu me connais mieux que quiconque et c'est réciproque. C'est toi qui mérite le mieux à mes yeux le titre de meilleure amie.

Tu es une belle personne, que je suis fière de côtoyer.

Je te souhaite tout le bonheur possible et je t'envoie plein de bonnes ondes.

Résumé

Malgré l'amélioration dans les connaissances du déroulement du cycle oestral bovin et les applications thérapeutiques qui en découlent (protocoles de synchronisation des chaleurs notamment), l'infertilité apparaît aujourd'hui comme une véritable maladie de l'élevage bovin ce qui a motivé la progression des recherches et le développement des biotechnologies telles que la fécondation *in vitro*.

Parmi les étapes de la fécondation *in vitro*, la capacitation des spermatozoïdes est un processus primordial qui consiste à des modifications membranaires qui rendent le spermatozoïde apte à féconder un ovocyte.

Le liquide folliculaire a été montré pour être un supplément bénéfique dans les milieux de maturation chez la vache.

Nous allons présenter dans cette partie les différentes étapes de la capacitation des spermatozoïdes *in vitro*.

L'objectif de ce travail est d'effectuer une recherche bibliographique pour répertorier la méthode employée pour les étapes de la capacitation *in vitro* et l'utilisation d'une technique de récolte du liquide folliculaire (Voire annexe).

Abstract

Despite improvement on the knowledge of the progress of the bovine oestrous cycle and therapeutic application that result (synchronization protocol of particular heat), today infertility appears as veritable disease of cattle breeding which is stimulate the progression of research and development of biotechnology such as in vitro fertilization.

Among the steps of in vitro fertilization, there is the capacitation of spermatozoa which is a primary process and consist the membrane modifications which make the spermatozoids able to fertilize an oocyte.

The follicular fluid has been shown to be a beneficial supplement in maturing media of the cow.

We are going to present in this part the different steps of the in vitro spermatozoa capacitation.

The objective of this project is to accomplish a bibliographic search to identify the method that used for the steps of in vitro capacitation and the use of a follicular fluid harvesting technique.

ملخص

على الرغم من التقدم المحرز في دورة الشبق والطلبات العلاجية التي تنتج عنها (بروتوكولات تزامن الحرارة على وجه الخصوص) ، يعتبر العقم اليوم كمرض حقيقي لتربية الماشية التي حفزت التقدم في مجال البحوث وتطوير التكنولوجيات الحيوية مثل الإخصاب في المختبر.

من بين مراحل الإخصاب في المختبر، تكون سائل الحيوانات المنوية هي عملية أساسية تتألف من تعديلات غشائية تجعل الحيوانات المنوية مناسبة لإخصاب بويضة.

وقد ثبت أن السائل الجريبي مكمل مفيد في وسط نضج الحيوانات المنوية.

سنقدم في هذا الجزء مراحل مختلفة من نضج سائل الحيوانات المنوية في المختبر.

الهدف من هذا العمل هو إجراء بحث بيبيولوجرافي للتعرف على الطريقة المستخدمة لمراحل التطوير الوظيفي للحيوانات المنوية في المختبر واستخدام تقنية حصاد السائل الجريبي.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Durée de cycle de l'épithélium séminale et de spermatogenèse chez différents Mammifères (Dadoune et <i>al</i> ,1991).....	09
Tableau 02. L'âge à la puberté (Noakes, 1979).....	11

Liste des figures

Figure 01 :	Reproducteur du taureau (Chatelain, 1986).....	03
Figure 02 :	https://www.rituel-de-retour-affectif-rapide.com (<u>site web</u>) 13/06/2018.....	04
Figure 03 :	http://www.embryology.ch/francais/cgametogen/spermato02.html (2018).....	07
Figure 04	Spermatogènè(spermatogénèse(https://www.youtube.com/watch?v=JQZM9ASf680 ,2018)).....	08
Figure 05 :	: Contrôle neuroendocrinien de l'appareil génital masculin (Source: http://spiral.univlyon1.fr/polycop/HistologieFonctionnelleOrganes/GenitalMasculin/gm6rd.html).....	12
Figure 06 :	Représentation schématique d'un spermatozoïde de Mammifère (www.embryology.ch).....	15
Figure07 :	Redistribution du cholestérol (vetopsy).....	22
Figure 08 :	Organisation des lipides et phospholipides de la membrane plasmique en conditions non capacitanes (A) et capacitanes (B).....	24
Figure 09 :	Schéma montrant les différents Modifications ioniques lors de la capacitation des spermatozoïdes de mammifères (Nishigaki et al.2014).....	26
Figure 10 :	Modèle de l'interaction des entrées de calcium médiés par CatSper (carré bleu) et des relâchements des stocks interne de calciums situés dans la région du cou (carré jaune).....	28
Figure11 :	Schéma représentant les cascades de signalisations impliquées dans la capacitation (schéma modifié) (Darszon et al.2001).....	29
Figure 12 :	Illustration de la vélocité curvilinéaire (VCL), la vélocité linéaire (VSL), la vélocité moyenne du trajet (VAP), l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH).....	31
Figure13 :	Schéma résumant les principaux facteurs impliqués dans la régulation du mouvement flagellaire. (Pierre J ouannet et Catherine Serres 1995).....	32

Liste des abréviations

Co₂ : dioxyde de carbone

Coc : complexe ovocyte/cumulus

E₂: œstradiol

P₄: Progestérone

LH : hormone lutéinisante

FSH: Hormone Folliculo-Stimulante

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

ABP : Androgen Binding Proteine

PH : Potentiel Hydrogène

GSH: (George Stanley Halas): Glutathione

BPS: Bovin Semined Plasma

GH: Growth Factor

MCT: Mono Carboxylate Transporteurs

Vit C: Acide ascorbique

IgG: Immunoglobuline G

PC : phosphatidylcholine

PE : phosphatidyléthanolamine

UV : Ultra violet

HDL: high density lipoproteines

Hg: Mercure

TNF: Tumor Necrosis Factor

IL: Interleukine

ACs: Adénylate cyclase soluble

APL : Aminophospholipide

PLN : Phospholipide neutre

FE : Feuillet externe

FI : Feuillet interne

SRB-1 : Scavenger Receptor de type B et de classe 1

PDEs: phosphodiesterases

VOCCs: Voltage Operated Calcium Channels

TRPCs: Transient Receptor Potential Channels

CatSper: Calcium Transient channel of spermatozoa

CNGs: Cyclic Nucleotide-gated channels

CASA: Computer Assisted Semen Analysis

mV: millivolte (potentiel électrique)

K⁺: Potassium

Na⁺: Sodium

H⁺: hydrogen

Cl⁻: Chlore

HCO₃⁻ : Bicarbonate

Ca²⁺: Calcium

g: Gramme

mL: millilitre

Kg: Kilogramme

mm: millimetre

GABA: acide γ -aminobutyrique

% : pourcentage

C: le degré celsius

SOMMAIRE

DEDICACES

REMERCIEMENT

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

RESUMES

Introduction générale.....01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I « Anatomie de l'appareil génital du taureau »

1- Anatomies03

1-1. Testicule.....03

1-2. Les voies spermatiques.....05

1.3. Les glandes annexes.....05

2- Physiologie de l'appareil reproducteur male.....06

2.1 : La spermatogenèse06

2-2 : La durée de cycle spermatique de l'épithélium séminale et de la spermatogenèse08

2-3 : Régulation de la spermatogénèse09

2-3-1 : La puberté09

2-3-2 : Contrôle neuroendocrinien de la spermatogenèse11

2-3-2-1 : Le rôle de la FSH dans la spermatogenèse.....11

2-3-2-2 : Rôles de la LH11

2-3-3 : La thermorégulation testiculaire12

CHAPITRE II « LE SPERMATOZOÏDE »

I-Ultra structure de spermatozoïde et notion physiologique14

Introduction.....14

1-La tête.....14

2 - Pièce intermédiaire 14

3 -Le flagelle	14
4 –conclusion	15

CHAPITRE III « Le liquide folliculaire »

1-Introduction	16
2- Rôle	16
3- Caractères physico-chimique du liquide folliculaire :.....	16.
3-1- Caractère physiques	16
3-2- Caractères chimiques	17
3-2-1 Acides aminés	17
3-2-2- Les Carbohydrates	17
3-2-3 Les lipides.....	18
3-2-4 Autres composés	18
3-2-4-1 Hormones et vitamines.....	18
3-2-4-2 Protéines et autres molécules	18
3-2-4-3 Facteurs de croissance	18
3-2-4-4 Enzymes	19
4-Conclusion	19

CHAPITRE IV : *La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes*

1-Introduction	20
2-Modification de la composition lipidique membranaire lors de la capacitation.....	20
2-1La membrane plasmique du spermatozoïde avant capacitation	21
3-La membrane plasmique du spermatozoïde lors de la capacitation.....	21
3-1 Efflux de cholestérol.....	21
3-2 Redistribution du cholestérol.....	22
3-3 Réorganisation des phospholipides	23
3-4 Le bicarbonate induit des modifications lipidiques de la membrane	24
4- Les différents ions	25
5- <i>Mécanisme moléculaire de la capacitation</i>	29
5-1 <i>L'hyper activation flagellaire</i>	30
6- <i>Mécanisme moléculaire de la mobilité spermatique après capacitation</i>	30
6-1 <i>Mécanisme moléculaire d'hyperactivité flagellaire</i>	32
7- Conclusion.....	33
CONCLUSION	34

Référence bibliographiques35

ANNEXES

Anatomie de l'appareil génital du taureau

1- Anatomies:

L'appareil génital du taureau, représenté sur la figure (01), peut se décomposer en trois grandes parties (Taveau, 2012) : organe primaire, secondaire et accessoire

-**Les principaux organes sexuels mâles** : sont les testicules, qui sont situés dans le scrotum suspendue à l'extérieur de la région inguinale.

-**Les organes sexuels secondaires** : sont composés de tissus de conduit, qui transportent les spermatozoïdes des testicules vers l'extérieur.

-**les organes accessoires** : sont constitués les organes de la prostate, les vésicules séminales et la bulbo-urétrales (la glande de Cowper). (Chatelain, 1986)

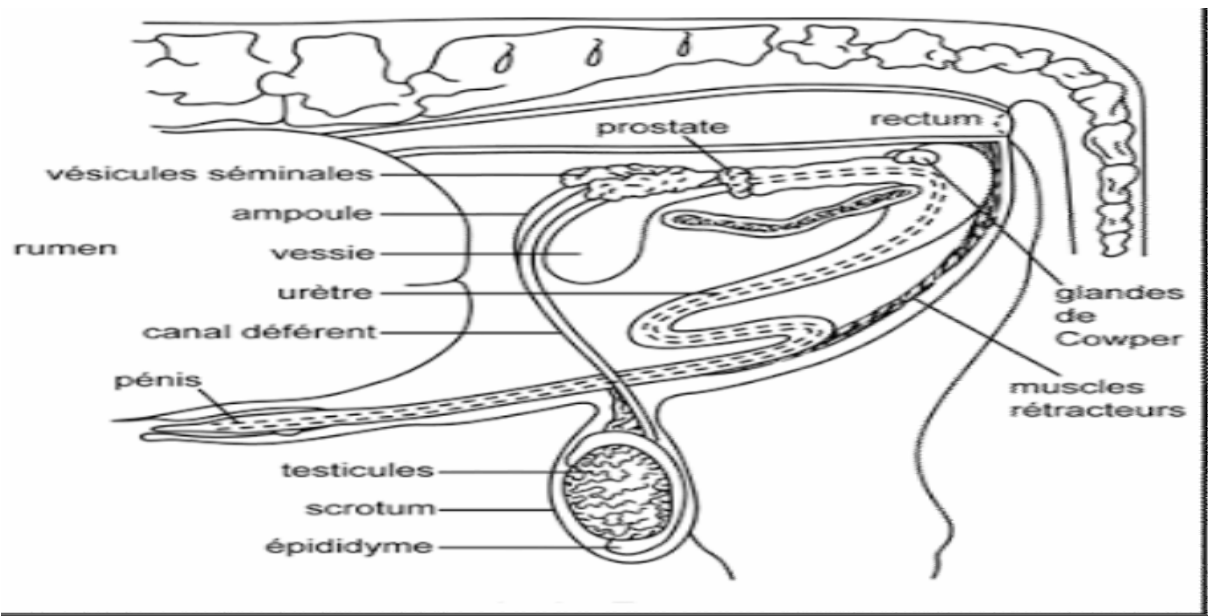


Figure (01): Appareil reproducteur du taureau (Chatelain, 1986).

1-1. Testicules

Les testicules sont des organes ovoïdes, bilobés, de couleur blanchâtre et, suspendus dans le scrotum en position verticale. Les testicules ont une origine méso néphrotique. Chez le taureau, ils descendent dans les enveloppes testiculaires avant même la naissance. Le testicule est recouvert par une membrane fibreuse, résistante, non élastique, elles ont une longueur de 10 à 14 cm, une largeur de 6 à 8 cm et une épaisseur de 6 à 8 cm chez le taureau (A.R.PETERS, 2004). Leur température doit être toujours inférieure de quelques degrés à celle du reste du corps. Les enveloppes testiculaires encore appelées « bourses », sont formées de six membranes. Elles soutiennent et protègent les testicules, les voies spermatiques sont accolées (épididyme, canal déférent) et les vaisseaux sanguins qui les irriguent. (Chenoweth et al., 2007)

Le drainage veineux forme le plexus pampiniforme dans la base du cordon, un complexe réseau de veine autour de l'artère spermatique, ce qui sert à refroidir le sang artériel avant d'atteindre le tissu testiculaire.

Anatomie de l'appareil génital du taureau

Elles sont pourvues d'une fonction exocrine et endocrine ; la fonction gamétogène (spermatogénèse, assimilable à une fonction exocrine, est assurée par les tubes séminifères de forme très flexueuse formant des anses qui s'ouvrent à leurs deux extrémités dans les tubes droits (Dadoun et Demoulin, 1991).

La base du testicule est ancrée dans le scrotum. Chaque testicule est entouré par la tunique vaginale, qui est une continuation du péritoine (la membrane revêtement de la cavité abdominale) et se compose de deux couches de membrane fibreuse.

Du testicule est divisé en compartiments ou lobules par des membranes ou des septa fibreux.

Chaque lobule est constitué d'un maximum de quatre tubes séminifères incorporés dans le tissu de stroma comprenant des vaisseaux sanguins, les nerfs et les cellules dites de Leydig.

+Les fonctions des testicules sont doubles :

- 1- La sécrétion de la testostérone et d'autres hormones stéroïdes par les cellules de Leydig
- 2- La production de spermatozoïdes ou spermatogénèse (PETERS, 2004).

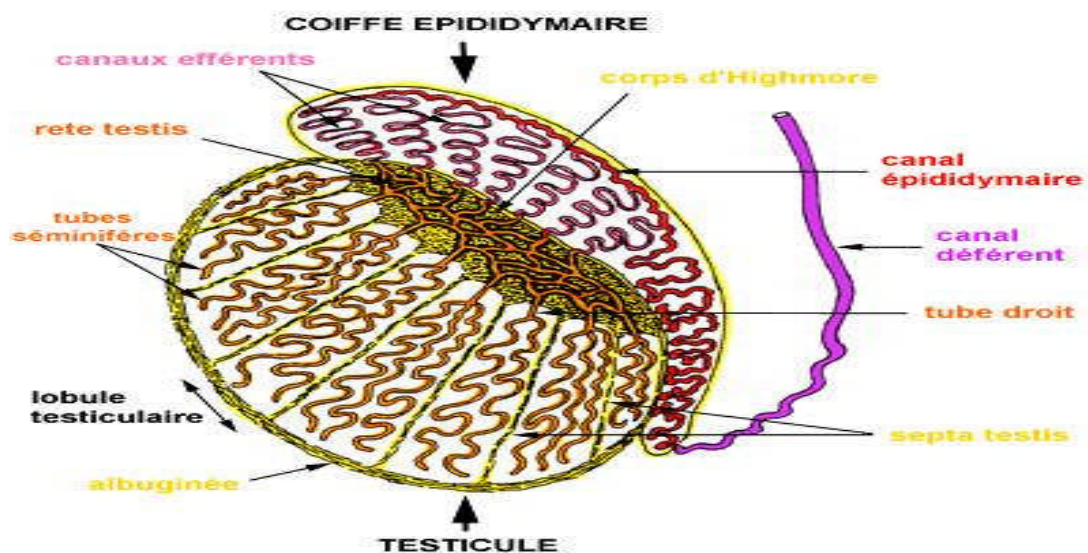


Figure (02): <https://www.rituel-de-retour-affectif-rapide.com> (site web) 13/06/2018

1.2. Les voies spermatiques

A leur sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds. La différenciation des spermatozoïdes appelée maturation s'effectue dans le

Anatomie de l'appareil génital du taureau

conduit epididymaire. L'épididyme phagocyte les spermatozoïdes dégénères, réabsorbe le liquide testiculaire, secrète des substances jouant un rôle dans la maturation des spermatozoïdes. L'épididyme est constitué de trois parties : la tête, le corps et la queue.

La tête couvre le testicule cranions-dorsalement. La continuité de la tête de l'épididyme avec le testicule est assurée par les conduits efférents. Le corps de l'épididyme longe le testicule médialement et la queue rejoint le conduit déférent. Les trois parties de l'épididyme sont palpables, plus ou moins saillantes en fonction des individus, et de consistance homogène. La musculature de l'épididyme chasse les spermatozoïdes dans le conduit déférent pendant la phase préliminaire de l'éjaculation (Dacheux, 2001).

1.3. Les glandes annexes

Les glandes annexes ou glandes sexuelles accessoires présentent chez les mammifères de grandes variations anatomiques et physiologiques. Chez le taureau, les trois glandes sont : les glandes vésiculaires ou vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales.

La palpation transrectale chez le taureau permet d'examiner ces glandes accessoires.

Des terminaisons libres nerveuses se situent dans le tissu sous-épithélial et donnent de

Informations sensibles de douleur, pression et température. (Knobil et al, 1988).

Ces glandes à sécrétions externe produisent des liquides destinés à diluer les spermatozoïdes, à favoriser leur mouvement et à les nourrir, notamment à partir du fructose (Soltner, 1993). Les sécrétions des glandes annexes représentent environ les trois quarts du plasma séminal d'un éjaculat (Fournier et Thibault, 1992)

2- Physiologie de l'appareil reproducteur male

2.1. La spermatogenèse

La spermatogenèse est la différenciation cellulaire pour la production des spermatozoïdes à partir des spermatogonies souches. Elle commence à la puberté et continue au cours de la vie de l'animal. La méiose est l'étape de brassage génétique. Les cellules sont haploïdes : les

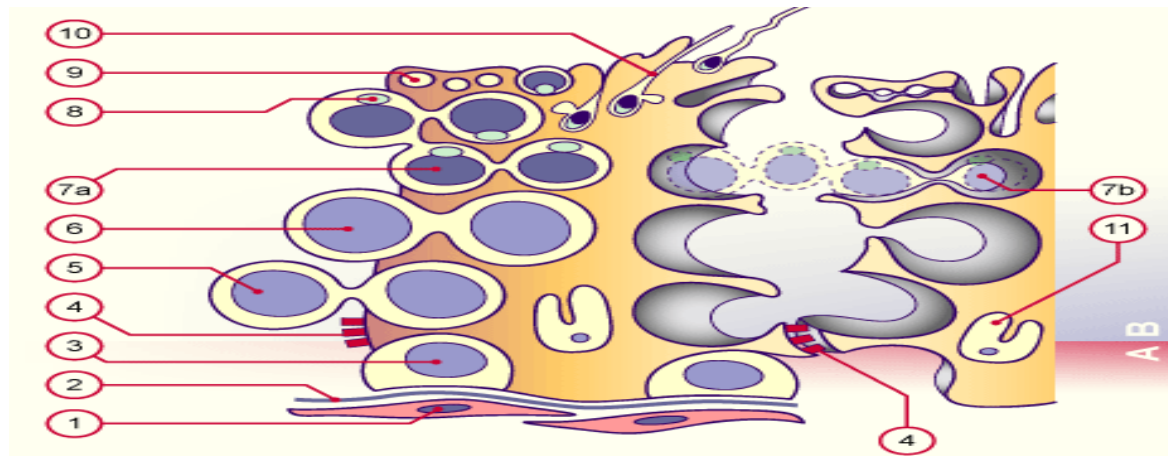
Anatomie de l'appareil génital du taureau

spermatides, à partir des spermatogonies (diploïdes). La spermatogenèse est l'étape de différenciation cytoplasmique qui permet la formation de cellules mobiles (Dadoune et al, 2001).

La spermatogenèse se déroule dans les tubules séminifères contournés et aboutit à la production des spermatozoïdes (Elaine et Marieb, 2005). Ces tubes séminifères contournés sont constitués par un épithélium germinal, composé de 2 populations cellulaires différentes : les cellules de soutien (les cellules de Sertoli) et les différents stades des cellules germinales en division et en différenciation (Lausanne et Berne). Autour des tubes séminifères, le tissu conjonctif est riche en capillaires et surtout en cellules de Leydig qui sont les cellules sécrétrices de la testostérone chez l'homme.

Les cellules de Sertoli forment une couche unistratifiée qui s'étend de la membrane basale à la lumière des tubes. Elles entourent les différents types de cellules germinales plus au moins complètement avec leurs prolongements cellulaires. La spermatogenèse s'effectue ainsi au contact étroit des cellules de Sertoli qui n'ont pas seulement une fonction de soutien et de nutrition, mais aussi une activité sécrétrice et phagocytaire. Elles sont reliées les unes aux autres un peu au-dessus de la membrane basale par des jonctions serrées (tight junction). Il en résulte deux zones dans l'épithélium : une zone basale où sont alignés les spermatogonies et une zone luminale dans laquelle se développent les cellules de tous autres stades de la spermatogenèse (Lausanne et Berne). Les jonctions serrées qui unissent les épithéliocytes de soutien forment la barrière hémato-testiculaire. Cette barrière empêche les antigènes de la membrane plasmique des spermatozoïdes en voie de différenciation de traverser la lame basale du tubule séminifère contourné pour passer dans la circulation sanguine (Elaine et Marieb, 2005).

Anatomie de l'appareil génital du taureau



- 1** Cellule péritubulaire
 - 2** Membrane basale
 - 3** Spermatogonie
 - 4** Tight junction (Jonction serrée)
 - 5** Spermatocyte I
 - 6** Spermatocyte II
 - 7a** Spermatide
 - 7b** Spermatide
 - 8** Acrosome
 - 9** Corps résiduel
 - 10** Spermatozoïde
 - 11** Noyau de la cellule de soutien de Sertoli
- A** Zone basale
B Zone adluminale

Figure 03 : structure schématique de l'épithélium germinatif

<http://www.embryology.ch/francais/cgametogen/spermato02.html> (2018)

Le spermatozoïde, qui s'appellera ainsi à la fin de sa fabrication passe par différents stades (figure 03) :

-Les cellules germinales, appelées spermatogonies, dans les tubules séminifères des testicules. Ces cellules subissent une série de divisions et de transformation cellulaire (Constancis P). Passant par le stade de spermatocyte, elles se différencient et conduisent à la formation des cellules possédant 23 chromosomes : les spermatides.

-La dernière étape de transformation vers le spermatozoïde s'appelle la spermiogénèse. Cette étape a lieu dans les tubes séminifères qui sont séparés de l'environnement par une barrière hémato-testiculaire (les cellules de Sertoli) (Ader et al, 2003). La testostérone, nécessaire à la maturation des spermatozoïdes des testicules et de l'épididyme, ne peut

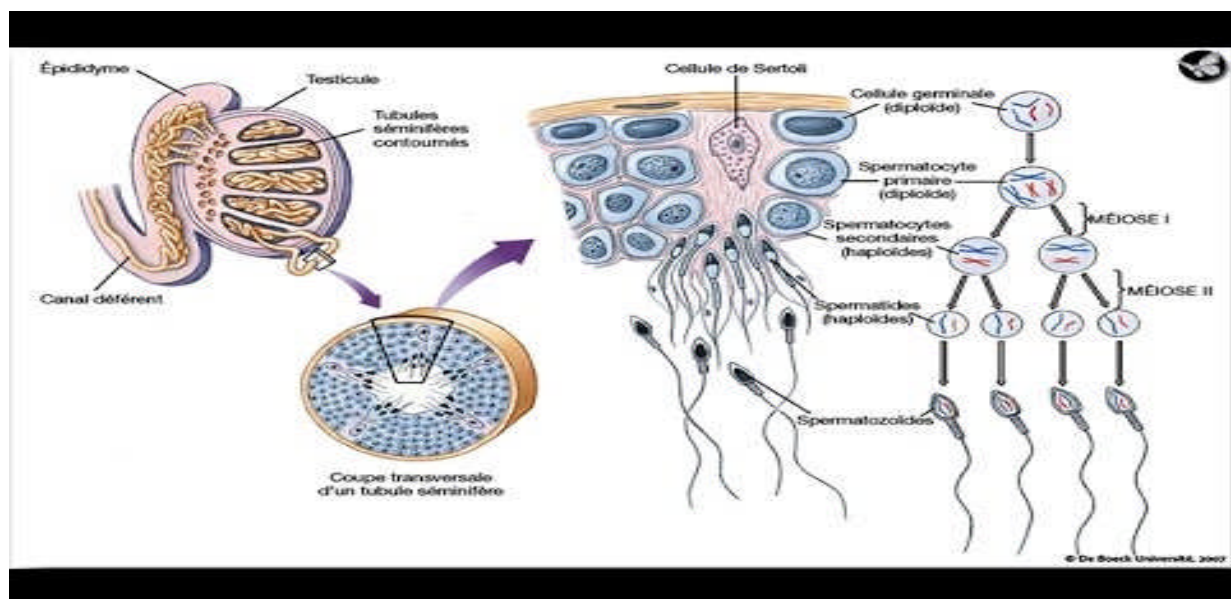
Anatomie de l'appareil génital du taureau

franchir cette barrière que sous sa forme liée à la protéine de liaison (ABP : androgen binding protein). Au cours de cette étape, le noyau se condense et l'acrosome ainsi que le flagelle sont formés.

- A ce stade, les spermatozoïdes n'ont pas toujours acquis ni leur mobilité ni leur pouvoir fécondant. Ils vont subir l'ultime étape de leur développement, la maturation qui a lieu tout au long de leur trajet dans l'épididyme (Ader et *al*, 2003) .Cette maturation permet l'achèvement de l'acrosome et l'acquisition d'une mobilité normale.

Ainsi un spermatozoïde prélevé au début de l'épididyme n'est pas et ne pourra, entre autre traverser la membrane de l'ovocyte. Par contre lorsque celle-ci est prélevé dans la portion terminale de l'épididyme, ou dans le canal déférent, il est capable de se lier à la zone pellucide de l'ovocyte et de le féconder (Nguyen, 2005).

La production de spermatozoïdes est influencée au sein des testicules. La température y est de 2 à 3°C inférieure à celle du reste du corps (Elaine et Marieb, 2005)



Figure(04) : la spermatogénèse (<https://www.youtube.com/watch?v=JQZM9ASf680>,2018)

2-2 La durée de cycle spermatique de l'épithélium séminale et de la spermatogénèse :

Anatomie de l'appareil génital du taureau

Le cycle de l'épithélium séminal est la série des modifications se produisant à un niveau donné de l'épithélium de l'extérieur vers l'intérieure des tubes séminifères (Parez et Duplan, 1987). La durée de cycle séminale et de la spermatogenèse diffèrent selon les espèces, chez le taureau, elle est respectivement 13.5 et 54 jours (voire tableau 01).

Tableau 01 : Durée de cycle de l'épithélium séminale et de spermatogenèse chez différents Mammifères (Dadoune et *al*, 1991).

Espèce	Durée (jours)	
	Cycle de l'épithélium séminal	Spermatogenèse
Bélier	10.4	49
Lapin	10.5	51.8
Taureau	13.5	54
Chien	13.6	54.4
Homme	16	74

2-3 Régulation de la spermatogénèse :

Ils sont sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire, des cellules de Sertoli et interstitielles de Leydig et de la température.

2-3-1 : La puberté :

Anatomie de l'appareil génital du taureau

La puberté est définie comme étant l'âge ou le taureau produit un éjaculat contenant 50 millions de spermatozoïdes avec une motilité minimum de 10%(Evans, 1995).D'autres auteurs ont donné comme définition : L'apparition des premiers spermatozoïdes dans l'éjaculat (Amman, 1970).

La Quantité journalière de spermatozoïdes produits par gramme de testicules est semblable à celle de l'adulte (Parez et Thibier, 1983).

Contrairement à l'ovogenèse qui débute pendant la vie fœtale, la spermatogenèse commence à la naissance. Les tubes séminifères paraissent inactifs (avec des gonocytes primordiaux et des cellules de soutien).Du point de fonctionnel, la puberté peut être défini comme le moment ou l'individu commence à produire des spermatozoïdes féconds.

Le facteur essentiel du déclenchement de la puberté et la mise en route du complexe hypothalamo-hypophysaire seraient de moins bloqué par la rétroaction négative des stéroïdes sexuels (testostérone) qui s'exerce sur lui.

Ainsi, sous l'action de FSH et LH, se produit une maturation des cellules de Leydig, puis une sécrétion de testostérone à des taux de plus en plus importants. L'imprégnation de l'organisme par la testostérone provoque :

- *le développement des caractères sexuels primaires et secondaires (croissance des glandes annexes du pénis. Augmentation de la libido et de l'instinct combatif. Modification de la musculature et de la pilosité).

- *La stimulation des cellules de Sertoli et le déclenchement de la spermatogenèse (action conjuguée avec FSH et LH) qui se fait de manière progressive à la fois sur le plan qualitatif et quantitatif.

On considère que la puberté s'établit généralement vers 10 à 12 mois. Il semble bien que l'âge, est le niveau général du développement de l'organisme qui compte plus pour la puberté (tableau 02).

Anatomie de l'appareil génital du taureau

Tableau 02 : L'âge à la puberté (Noakes, 1979)

	Taureau	Étalon	Verrat	Bélier	Bouc	chien	Chien
Age à la puberté (mois)	6-10	12	5-8	7-8	8	6-8	6-15
Age usuel au 1 ^{er} service (mois)	12	18-24	12	9-12	9-12	12	12

2-3-2 : Contrôle neuroendocrinien de la spermatogenèse :

Le déclenchement et le maintien de la spermatogenèse est sous la dépendance des hormones gonadotropes FSH, LH. Ainsi qu'une hypophysectomie, l'administration de FSH/LH a pu rétablir la spermatogenèse.

2-3-2-1 : Le rôle de la FSH dans la spermatogenèse :

La FSH stimule les cellules de Leydig pour la production de testostérone.

- Synthèse de l'ABP (transport des androgènes) par les cellules de Sertoli, ce qui permet de transport des androgènes des testicules vers l'épididyme (Kolb, 1975). Le contrôle de FSH se fait selon deux étages ; un étage hypothalamique par la GnRH (action positive), et un étage gonadique (cellules germinales). L'inhibine par contre va entraîner une action négative au niveau hypophysaire et hypothalamique et son action se fait en modulant la sécrétion du FSH par une interaction avec la réponse hypophysaire aux hormones hypothalamiques (Soltner, 1989).

2-3-2-2 : Rôles de la LH : L'action de la LH est indirecte sur le processus de la spermatogenèse puisqu'elle stimule la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig, responsable du comportement sexuel et des caractères sexuels secondaires (Soltner, 1993).

Anatomie de l'appareil génital du taureau

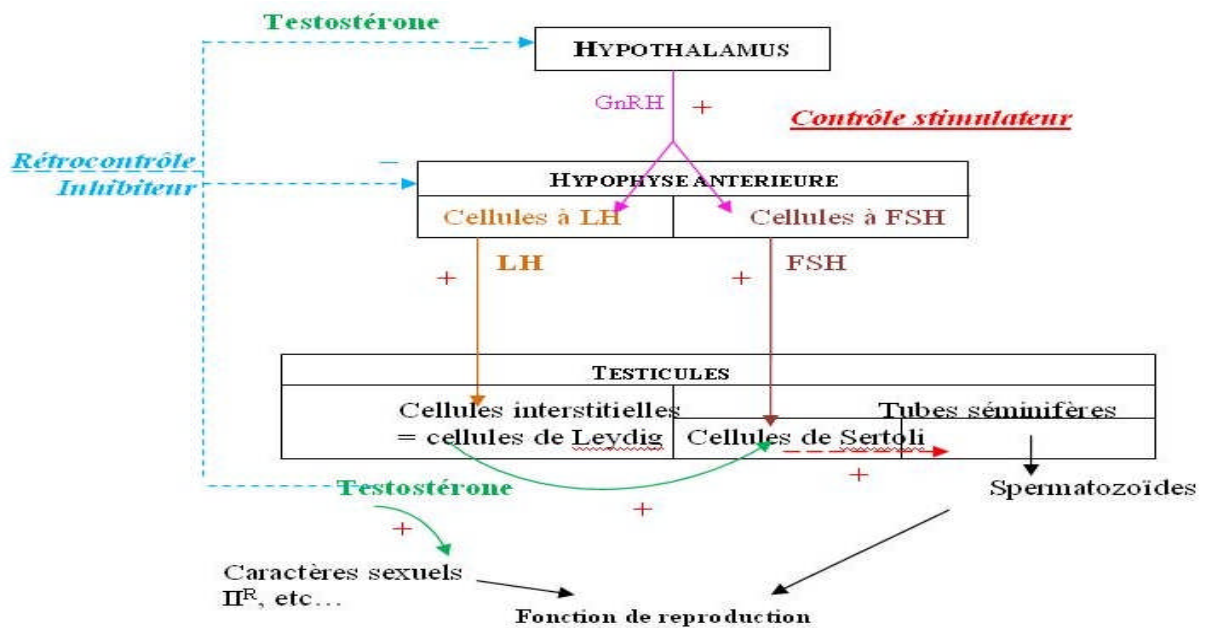


Figure (05) : Contrôle neuroendocrinien de l'appareil génital masculin

(Source:<http://spiral.univlyon1.fr/polycop/HistologieFonctionnelleOrganes/GenitalMasculin/gm6rd.html>)

2-3-3 : La thermorégulation testiculaire :

Chez la plupart des mammifères les testicules sont localisés dans le scrotum (espèces exorchidés), lequel non seulement supportent et protègent les testicules, mais jouent un rôle important dans la régulation de la température testiculaire (Mcky, 1991). Celle –ci est de 3-5°C inférieure à celle du corps, et la spermatogenèse ne peut se dérouler complètement qu'à cette température (Dadoune et Demoulin, 1991).

La température testiculaire est maintenue par un mécanisme de thermorégulation (Parez et Duplan, 1987), assurée par :

*Les fibres dartoïques et le crémaster qui constituent le thermostat.

*Le plexus pampiniformes qui joue un rôle d'échangeur thermique grâce à un mécanisme de contraction et de relâchement du scrotum .Ainsi à des températures élevées les testicules sont éloignés de la partie abdominale, tandis qu'à des basses températures, ils en sont rapprochés (Macky, 1991).

Anatomie de l'appareil génital du taureau

D'autre part, l'effet des facteurs externes (coups de soleil, les U.V et les températures élevée) sur les bourses entraînent une déstabilisation de la production spermatiques (Parez et Duplan, 1987). De même (Lagerlof, 1934) cité par (Derivaux, 1971) a noté que l'exposition du scrotum à une température élevée entraîne la dégénérescence de l'épithélium séminaire et compromet gravement la spermatogenèse.

Introduction :

C'est une cellule monoflagelée de 50-70 μ m de long et comportant plusieurs segments en premiers (figure06). Le spermatozoïde éjaculé de mammifère est une cellule haploïde, porteuse du patrimoine génétique male, qui doit être capable d'atteindre et de féconder l'ovocyte dans les voies génitales femelles. La mobilité des spermatozoïdes est le facteur le plus utilisé pour apprécier la qualité de la semence, bien qu'elle ne reflète pas totalement la capacité de fécondation des spermatozoïdes. Les processus de biosynthèse étant quasi nuls au sein des spermatozoïdes éjaculés, c'est le déplacement des spermatozoïdes qui requiert la plus importante quantité d'énergie (Batellier, 1997). La conservation de la semence à l'état liquide doit permettre aux spermatozoïdes de maintenir leur aptitude à la fécondation.

1-Tête : De forme variable selon l'espèce, allongée chez le taureau et présente une forme de massue chez le bélier et le bouc. Presque entièrement recouvert par le noyau qui contient le matériel nucléaire haploïde, elle est coiffée et limitée par deux membranes interne et externe appliquée à la membrane plasmique. Au niveau de la zone équatorial la cape acrosomiale est mince et plus dense et occupe le col de l'acrosome. Dans son tiers postérieur le noyau est séparée de la membrane plasmique par une mince couche cytoplasmique et cette région appelée « la cape postérieure plasmique ».

2- Pièce intermédiaire : De forme cylindrique, elle mesure environ 10 à 12 microns de longueur et un diamètre inférieur à 1 micron (Parez et Duplan, 1987). Représente par des filaments axiaux entourés de 9 grosses fibres (triplets) et des mitochondries disposées en hélice.

3-Le flagelle : Cylindrique, il mesure environ 50microns de longueur et 0.5 micron de diamètre (Parez et Duplan, 1987). Il se termine par : des filaments axiaux perdant leurs dispositions symétriques et entourés uniquement de la membrane plasmique.

La motilité du spermatozoïde est étroitement liée au fructose en anaérobie et au contenu intracellulaire en AMP cyclique (Mc Donald, 1980).

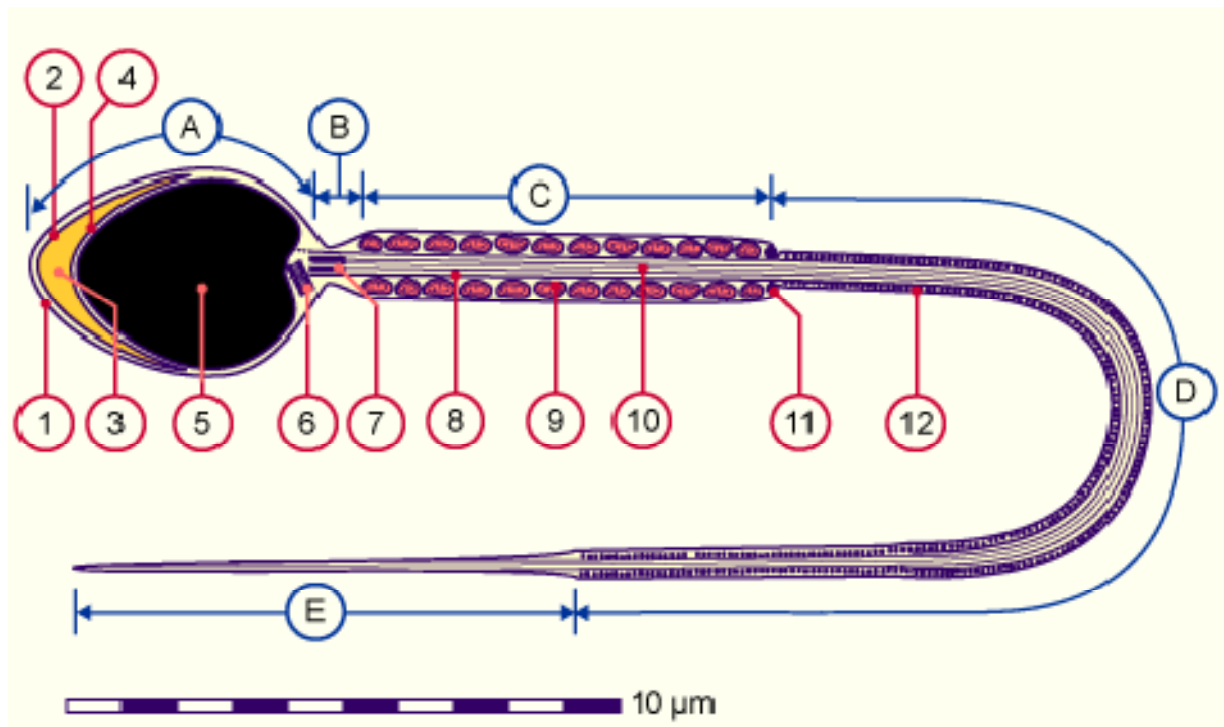


Figure (06): Représentation schématique d'un spermatozoïde de Mammifère (www.embryology.ch)

1 : Membrane plasmique, **2** : Membrane acrosomiale externe, **3** : Acrosome, **4** : Membrane acrosomiale interne, **5** : Noyau, **6** : Centriole proximal, **7** : Restes du centriole distal, **8** : Faisceaux longitudinaux extérieurs denses, **9** : Mitochondrie, **10** : Axonème, **11** : Annulus, **12** : Fibres denses externes. **A** : Tête, **B** : Collet, **C** : Pièce intermédiaire, **D** : Pièce principale, **E** : Pièce terminale.

4-Conclusion :

Le spermatozoïde est le produit final de la gamétogénèse chez le male, qui se produit dans les tubules séminifères des testicules. Le poids sec d'un spermatozoïde bovin est environ 16.5×10^{-12} g et son volume est environ 30 pm^3 . Les spermatozoïdes varient, selon les espèces, par leur forme, leur longueur et leur taille (Eddy et *al*, 1994). Les spermatozoïdes des mammifères sont composés de deux parties principales, la tête et le flagelle, qui sont reliées par la pièce intermédiaire. La tête est constituée de l'acrosome, du noyau, et de petites quantités de structure cytosquelettique, et de cytoplasme (Bangham, 1961).

1-Introduction :

Le liquide folliculaire est un fluide extracellulaire complexe, semi-visqueux, de couleur jaune qui s'accumule dans l'antrum des follicules ovariens au cours de leur croissance. Il constitue le micro-environnement dans lequel le complexe ovocyte-cumulus se développe et les cellules de la granulosa se différencient. Les scientifiques s'accordent à considérer que les constituants du fluide folliculaire proviennent en majorité du plasma sanguin, via la vascularisation des cellules de la thèque (Ménézo et Guérin, 2001). Cependant, il contient aussi des facteurs produits localement par les cellules folliculaires et ce en fonction de leur activité métabolique.

2-Rôle :

Le liquide folliculaire participe aux étapes finales de la maturation de l'ovocyte. Il contrôle, avant l'ovulation, les dernières modifications transcriptionnelles et post transcriptionnelles (polyadénylation et deadénylation) qui permettront à l'embryon d'effectuer ses synthèses protéiques au cours des premières divisions de segmentations. Le liquide folliculaire pourrait également protéger l'ensemble ovocyte-cumulus contre les enzymes protéolytiques qui attaquent la couche de collagène de la paroi du follicule au moment de l'ovulation. Son rôle réel est finalement peu connu. Il est présent sur le site de la fécondation. Il a en outre un rôle dans le transport de l'ovocyte de l'ovaire à l'oviducte lors de l'ovulation. Ce rôle est évidemment plus important chez les espèces où le liquide folliculaire est abondant (Ménézo et Guérin, 2001).

3- Caractères physico-chimique du liquide folliculaire :

3-1- Caractère physiques :

Le volume du liquide folliculaire est très différents d'une espèce à l'autre (quelques mm chez les rongeurs, 2 à 10 ml chez la femme, vache et la truie, 60 ml chez la jument). Le liquide folliculaire ressemble au plasma sanguin par sa viscosité, son osmolarité (280-320 milliosmoles/kg) et sa composition en électrolytes (Ménézo et Guérin, 2001). La pression partielle en oxygène varie d'un facteur 1 à 9 dans l'espèce humaine avec une moyenne de 54

CHAPITRE III : Le liquide folliculaire

mm Hg. La pression partielle en CO₂ est moins variable (35 mm Hg en moyenne pour le liquide folliculaire humain). Elle permet de contrôler le pH (7,3-7,4).

3-2- Caractères chimiques :

3-2-1 Acides aminés

Glutamine et glycine sont particulièrement abondantes dans le liquide folliculaire. Les concentrations en taurine sont toujours inférieures à celle du sérum (Ménézo et Guérin, 2001). Il est évident qu'à cette période deux types de composés doivent être nécessairement protégés : les lipides, pour permettre la fusion des membranes au moment de la fécondation et le matériel nucléaire pour protéger le patrimoine génétique. Les gonadotropines modifient le métabolisme des aminoacides du complexe cumulo-ovocytaire : elles peuvent augmenter le transport de la glycine, de la cystéine et de la glutamine, qui sont présentes dans le liquide folliculaire, afin d'élever le niveau de glutathion (GSH) dans l'ovocyte. Ce glutathion essentiellement synthétisé après le pic de LH, servira à la décondensation du matériel nucléaire du spermatozoïde, au moment de la formation des pronuclei. In vitro, l'adjonction de la cystéamine, présente dans le liquide folliculaire, induit une élévation du taux de GSH intracellulaire (Ménézo et Guérin, 2001). L'addition d'acides aminés lors de la maturation in vitro permet de réduire la vitesse du turnover de certains transcrits.

3-2-2- Les Carbohydrates :

Le Glucose représente 75% des carbohydrates du liquide folliculaire. Il est présent à une concentration moindre (2.2 mM) que dans le sérum, chez la vache. Cependant sa concentration augmente pendant l'œstrus. Le fructose est trouvé en faibles quantités. Le taux de lactate est d'environ 9 mM. L'ovocyte comporte des transporteurs communs au lactate et au pyruvate (MCT : mono carboxylate transporteurs). Les acides mono carboxyliques interfèrent avec la régulation du pH interne. Sont présents également tous les précurseurs nécessaires à la synthèse stéroïdienne dont les intermédiaires en C₂ nécessaires à la synthèse du cholestérol (Ménézo et Guérin, 2001).

3-2-3 Les lipides

3-2-4 Autres composés :

Des bases puriques et pyrimidiques ainsi que leurs dérivés sont présentes dans le liquide folliculaire. L'hypoxanthine et l'adénosine joueraient un rôle dans le maintien du noyau de l'ovocyte à l'état de vésicule germinative, en fin de prophase méiotique.

3-2-4-1 Hormones et vitamines

- Estradiol (E2).
- Progestérone (P4).
- Des hormones peptidiques : la prolactine, FSH et l'inhibine.
- L'acide ascorbique.

3-2-4-2 Protéines et autres molécules :

La pluparts des protéines sériques sont présentes, mais en quantité moins importante, dans le fluide folliculaire :

- Albumine
- Alpha1-glycoprotéine
- Les IgG
- La β 1-globuline
- La transferrine
- L'haptoglobuline
- La céruloplasmine
- Le fibrinogène

3-2-4-3 Facteurs de croissance :

Ils sont présents dans l'ovaire et dans le follicule. Les liquides folliculaires prélevés en même temps que les ovocytes destinés à la fécondation in vitro ont permis de mettre en évidence de nombreux facteurs de croissance e cytokines dans les follicules prêts à ovuler (Ménézo et Guérin, 2001). GH, TGF α et β , PDGF-A,-B et parfois EGF sont présents. IGF1 et II et leurs protéines de transport (IGF-BP) ont été également décrits. Parmi les cytokines, les

CHAPITRE III : Le liquide folliculaire

interférons α et β , le TNF α , les IL2, IL6, le LIF, le CSF sont présents dans le liquide folliculaire pré ovulatoire.

3-2-4-4 Enzymes :

Elles sont nombreuses dans le liquide folliculaire: Peptidases, protéase, activateur du plasminogène, phosphatase acide et alcaline, hyaluronidase, alanine et aspartate aminotransférase, kallikréine, nucléotidase, thromboplastine, collagénase, plasmine, ATPase... Leurs fonctions connues concernent plutôt le follicule que l'ovocyte (Ménézo et Guérin, 2001).

4-Conclusion :

Le liquide folliculaire participe aux étapes finales de la maturation de l'ovocyte. Il contrôle avant l'ovulation, les dernières modifications de transcription qui permettront à l'embryon d'effectuer ses synthèses protéiques aux premières divisions de segmentation. Le liquide folliculaire pourrait également protéger l'ensemble ovocyte-cumulus contre les enzymes protéolytiques qui attaquent la paroi du follicule au moment de l'ovulation. Il est présent sur le site de fécondation en parallèle avec la capacitation des spermatozoïdes dans l'oviducte et le transport de l'ovocyte de l'ovaire à l'oviducte lors de l'ovulation (Hansen *et al*, 1991).

Le liquide folliculaire contiendrait des facteurs chimiotactiques, qui stimulent le métabolisme des gamètes et qui induisent l'hyper activation et la réaction acosmique des spermatozoïdes (Zhu *et al*, 1994).

Des taux élevés de vitamine C dans la sécrétion folliculaire et d'hypo taurine (Meizel *et al*, 1980) suggèrent un rôle important de ces sécrétions dans la protection des gamètes et de l'embryon contre les phénomènes d'oxydation.

Les acides aminés sont présents naturellement dans le liquide folliculaire et seraient la bonne réalisation des étapes précédant le développement embryonnaire (Waston *et al*, 2000). Parmi les différents acides aminés ; l'hypo taurine aurait des effets protecteurs sur les dommages causés par le stress oxydatifs (Guerin *et al*, 1995).

1-Introduction : Les spermatozoïdes éjaculés sont spontanément incapables de féconder l'ovocyte. La capacitation correspond à l'ensemble des modifications physiologiques post éjaculation qui va permettre au spermatozoïde d'acquérir son pouvoir fécondant, lors de son ascension dans le tractus génital femelle. C'est donc une étape de maturation indispensable à la fécondation. Elle est réversible : les spermatozoïdes capités peuvent être « décapités » (Bi et *al*, 2009) s'ils sont incubés dans le plasma séminal.

La totalité des processus qui rentrent en jeu dans ce phénomène n'est pas connue, mais certains mécanismes ont été décryptés. Ils sont ici rassemblés en 4 grandes parties :

- * Des modifications membranaires avec des réorganisations de phospholipides accompagnées d'un efflux de cholestérol induit par l'albumine et les lipoprotéines présentes dans le tractus génital femelle (Gadella et *al*, 2008) et (Lin and Kan, 1996).
- * Des modifications ioniques intracellulaires et membranaires avec hyperpolarisation de la membrane plasmique, augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et augmentation du pH interne (Arnoult et *al*, 1999).
- * Un réarrangement des protéines de la membrane plasmique accompagné de phosphorylations des protéines qui permettent la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide et de certaines protéines impliquées dans l'exocytose de la vésicule acrosomiale;
- * Une hyper activation flagellaire (Navarro et *al*, 2008).

2. Modification de la composition lipidique membranaire lors de la capacitation

Lors de la capacitation, la membrane plasmique du spermatozoïde subit des modifications et notamment des modifications lipidiques. Ces dernières correspondent à des changements dans la distribution et la composition en lipides et phospholipides, ce qui conduit à une augmentation de la fluidité membranaire et à des changements de l'architecture et de la composition de la membrane.

2.1. La membrane plasmique du spermatozoïde avant capacitation

La composition lipidique des membranes des spermatozoïdes avant la capacitation lors de la maturation épидидymaire est inhabituelle par rapport à celle des autres somatiques de mammifères en présentant notamment :

- * Un taux élevé de cholestérol, distribué uniformément au niveau des zones membranaires apicales et équatoriales de la tête du spermatozoïde.
- * Des glycérophospholipides essentiellement sous forme de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) mais aussi de plasmalogènes (choline et éthanolamine).
- * De la sphingomyéline en quantité importante.
- * Un rapport cholestérol/phospholipides élevé équivalent à 1.
- * Une quantité importante d'acides gras polyinsaturés fixés aux phospholipides.

La présence, d'une part, d'un taux élevé de cholestérol et de glycérophospholipides contribuant à former des régions membranaires non-diffusibles et, d'autre part, de la sphingomyéline interagissant avec le cholestérol, conduit à rigidifier et à stabiliser la membrane.

3. La membrane plasmique du spermatozoïde lors de la capacitation

La capacitation du spermatozoïde est associée à une diffusion augmentée des lipides au niveau de la membrane de l'acrosome, de la pièce intermédiaire et du flagelle. En revanche, cette diffusion est diminuée au niveau de la membrane de la région post-acrosomale du spermatozoïde.

3.1. Efflux de cholestérol

Bien que la séquence chronologique exacte des modifications membranaires ne soit pas encore clairement établie, plusieurs évidences suggèrent que l'efflux de cholestérol de la membrane plasmique est requis pour l'initiation de la capacitation (Flesch and Gadella, 2000), (Visconti et al, 1995) L'albumine présente dans les fluides tubaires et folliculaires stimule la capacitation et sa présence dans le milieu d'incubation est requise pour la capacitation des spermatozoïdes de nombreuses espèces de mammifères *in vitro*.

L'efflux de cholestérol constitue une des étapes essentielles dans l'initiation de la capacitation et nécessite dans des études *in vitro* la présence d'accepteurs de cholestérol comme l'albumine (connue pour éliminer notamment le cholestérol) (Figure 07) ou des lipoprotéines. Parmi ces dernières présentes dans les liquides folliculaires ou de l'oviducte

CHAPITRE IV: La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes

(notamment humains et bovins), c'est plus spécifiquement les HDL qui captent le cholestérol.

Il a également été montré que la présence de protéines liant les lipides comme les protéines de type « bovine séminal plasma » (BSP) présentes en quantité abondante dans le plasma séminal bovin et humain induisait un efflux de cholestérol et la capacitation. De plus, chez les bovins, les protéines BSP pourraient être associées à des HDL du liquide folliculaire et donc avoir un effet synergique dans la capacitation. Par ailleurs, un transporteur de stérol (ressemblant au scavenger receptor de type 1, SRB-1) et l'activation d'une sphingomyélinase seraient également impliqués dans l'efflux de cholestérol.

Récemment une nouvelle publication (Watanabe et *al*, 2014) montre l'effet d'une molécule Lipocaline2 (Lcn2) (Lcn2 est une molécule connu comme un facteur immunitaire inné qui inhibe la croissance bactérienne) qui induit la maturation des spermatozoïdes en se fixant sur les PE de la membrane plasmique, ce qui permet la réorganisation des micro-domaines (lipid raft) via un mécanisme PKA-dépendant, tout en facilitant l'efflux du cholestérol. Ceci nous montre deux voies différentes de signalisation pour induire la capacitation : albumine-dépendant et lipocaline-dépendant.

3.2. Redistribution du cholestérol

L'augmentation de la fluidité membranaire induite par l'efflux de cholestérol permet la diffusion latérale du cholestérol restant et donc sa redistribution. Ce dernier se retrouve concentré uniquement dans la zone apicale ou partie antérieure de la tête lors de la capacitation. C'est également dans cette zone que l'on observe une perte de l'asymétrie des phospholipides due à leur réorganisation (Figure 07)

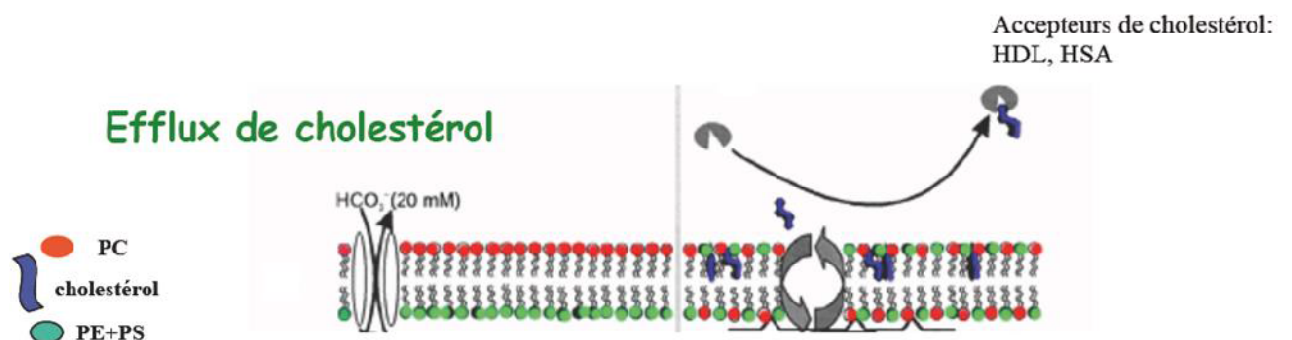


Figure 07 : Redistribution du cholestérol (vetopsy)

3.3. Réorganisation des phospholipides

La perte de cholestérol provoque une interaction entre les cavéolines-1 et les protéines de translocation de phospholipides appelées scramblases, ce qui conduit à leur activation et au passage des phospholipides d'un feuillet à un autre (« flip-flop » membranaire ou scramble). Par ailleurs, le bicarbonate présent à forte concentration dans un milieu capacitant induit une translocation de phosphatidylcholine et de sphingolipides du feuillet externe au feuillet interne sans doute via l'activation des scramblases.

La capacitation est également associée à l'augmentation de la méthylation des phospholipides et à l'origine d'une synthèse accrue de phosphatidylcholine à partir de phosphatidyléthanolamine.

L'efflux de cholestérol, conduit donc à la baisse du rapport cholestérol/phospholipides membranaire et augmente ainsi la fluidité de la membrane. Les changements de propriété de la membrane plasmique dans la zone antérieure de la tête du spermatozoïde vont ainsi affecter directement la redistribution des protéines et notamment de la cavéoline-1 et de la flotilline-1 (Travis and Kopf, 2002) suite à la modification de structure des « lipid rafts » (Figure.08) permettant ainsi la redistribution des phospholipides, ce qui favoriserait alors l'interaction de molécules de signalisation.

Ces changements font aussi apparaître des zones membranaires fusiogènes et permettent l'externalisation de récepteurs spermatiques susceptibles d'intervenir dans la liaison avec la zone pellucide de l'ovocyte. Les changements de propriété de la membrane plasmique sont aussi responsables de modifications de l'activité des canaux ioniques ou d'échangeurs d'ions augmentant ainsi la perméabilité de la membrane aux ions dont les ions bicarbonates et calciques.

Toutes ces étapes sont indispensables à l'hyperactivation transitoire du spermatozoïde et à la réalisation de la réaction acrosomique.

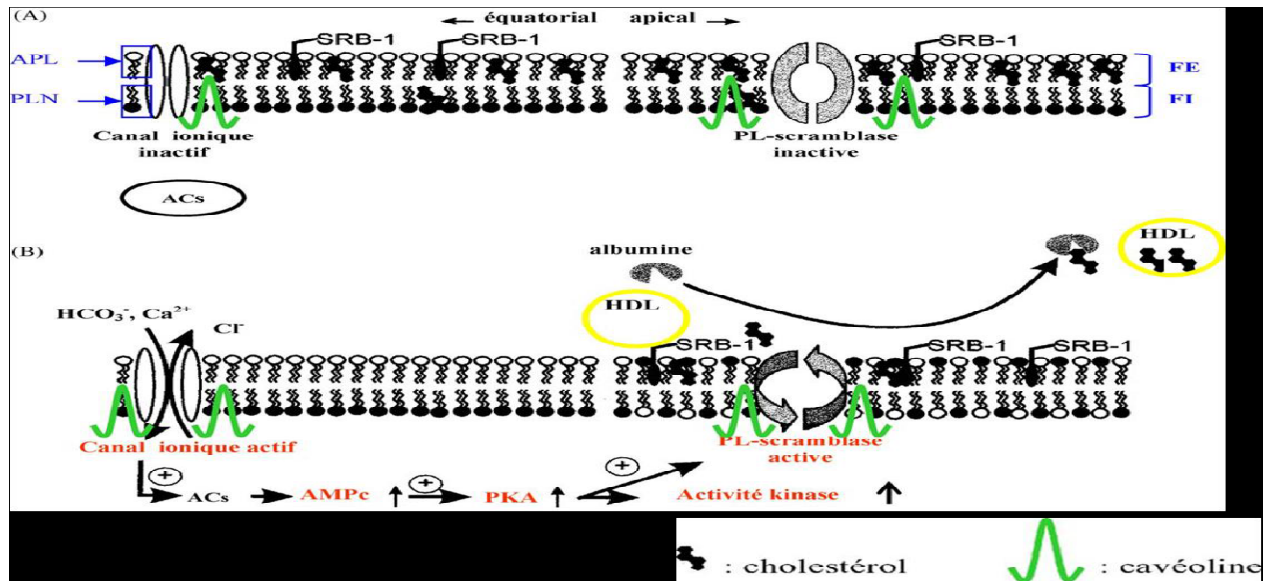


Figure 08 : Organisation des lipides et phospholipides de la membrane plasmique en conditions non capacitantes (A) et capacitantes (B). ACS: adénylate cyclase soluble ; APL : Aminophospholipides (PL) ; FE : feuillet externe ; FI : feuillet interne ; HDL : high density lipoprotein ; PLN : PL neutres ; SRB-1 : scavenger receptor de type B et de classe 1 (Travis and Kopf, 2002) modifiée.

3-4. Le bicarbonate induit des modifications lipidiques de la membrane

La capacitation des spermatozoïdes est aussi associée à une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Chez la souris, le potentiel électrique membranaire oscille entre -35 et -45 mV avant la capacitation pour atteindre environ -70 mV pendant la capacitation (Arnoult et *al*, 1999) et (Demarco et *al*, 2003).

La régulation du potentiel membranaire résulte en partie du mouvement de certains ions dont le potassium (K^+), le sodium (Na^+), l'hydrogène (H^+), le chlore (Cl^-) et le bicarbonate (HCO_3^-).

L'influx de HCO_3^- contribue à l'alcalinisation du pH intracellulaire ainsi qu'à l'hyperpolarisation de la membrane et s'effectue possiblement par transport actif via un Co-transporteur HCO_3^-/Na^+ (Demarco et *al*, 2003).

L'entrée de HCO_3^- dans le spermatozoïde est dépendante de la présence de Cl^- dans le milieu extracellulaire (Chen et *al*, 2000). l'entrée de HCO_3^- est également associée à des modifications membranaires observées au niveau de la tête et potentiellement médiées par

CHAPITRE IV: La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes

l'activation d'une scramblase qui favoriserait la redistribution du cholestérol (Flesch et *al*, 2001) et (Gadella and Harrison, 2000).

La régulation du K⁺ par des canaux ioniques spécifiques aux spermatozoïdes contribue également à l'hyperpolarisation de la membrane (Martinez-Lopez et *al*, 2009) et (Santi et *al*, 2010) et (Zeng et *al*, 1995). La délétion du gène Slo3, codant pour le canal K_{sper}, conduit à la dépolarisation de la membrane plasmique, l'altération des paramètres de motilité et l'incapacité des spermatozoïdes à subir la réaction de l'acrosome (Santi et *al*, 2010); (Zeng et *al*, 2011).

Les changements physico-chimiques que subissent les membranes des spermatozoïdes lors de la capacitation jouent deux rôles majeurs :

- Dans un premier temps, le transport des différents ions à travers la membrane plasmique régule le potentiel membranaire et le pH intracellulaire en plus de participer à la transduction de signaux intracellulaires.

-En second lieu, la réorganisation spatiale des lipides et protéines membranaires favorise la liaison à l'ovocyte et améliore le potentiel fusogénique des membranes plasmique et externe de l'acrosome. En résumé, les modifications membranaires initient la capacitation et préparent le spermatozoïde à subir la réaction de l'acrosome, une étape indispensable pour le succès de la fécondation naturelle.

4. Les différents ions

L'efflux de cholestérol de la membrane plasmique est préalable à l'alcalinisation du pH intracellulaire (Cross and Razy-Faulkner, 1997), qui résulte principalement de l'entrée massive de l'anion HCO₃⁻ dans le spermatozoïde (Demarco et *al*, 2003); (Zeng et *al*, 1995) et de la sortie des cations H⁺ (Lishko et *al*, 2011).

La capacitation est un processus dépendant du HCO₃⁻. Cet ion est très abondant dans les voies génitales femelles et sa présence dans le milieu d'incubation est nécessaire pour induire la capacitation des spermatozoïdes *in vitro*. L'entrée de HCO₃⁻ dans la cellule est directement responsable de l'activation d'une adénylate cyclase soluble (SACY) spécifique aux spermatozoïdes (Buck et *al*, 1999); (Chen et *al*, 2000) et conduit à une augmentation rapide de la concentration d'AMPc intracellulaire (Chen et *al*, 2000) En absence de HCO₃⁻, la présence de Ca²⁺ augmente l'activité de SACY de manière concentration-dépendante (Jaiswal and Conti, 2003).

CHAPITRE IV: La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes

De plus, la contribution majeure des SACYs à l'augmentation de la concentration d'AMPc est soutenue par l'inhibition de l'activité des phosphodiesterases (PDEs), enzymes qui dégradent l'AMPc en 5'-AMP, tout au long du processus de capacitation (Lefievre et *al*, 2000).

La deletion du gène codant pour SACY inhibe complètement la mobilité des spermatozoïdes, laquelle est réactivée par l'ajout d'AMPc dans le milieu d'incubation (Esposito et *al*, 2004). SACY apparaît donc comme la principale source d'AMPc dans les spermatozoïdes de mammifères et la voie dépendante de l'AMPc joue un rôle clé dans l'augmentation du contenu en phosphotyrosine de protéines spécifiques lors de la capacitation (Galantino-Homer et *al*, 1997); (Visconti et *al*, 1995).

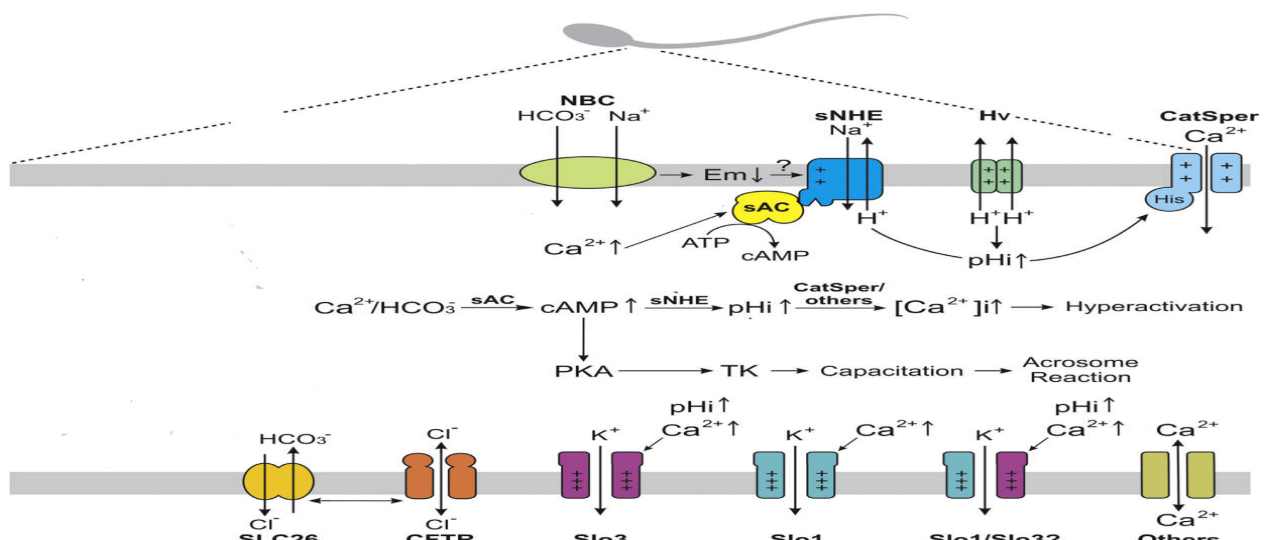


Figure09 : Schéma montrant les différents Modifications ioniques lors de la capacitation des spermatozoïdes de mammifères (Nishigaki et *al*, 2014)

Le Ca²⁺ est un second messager très important et une augmentation de la concentration de Ca²⁺ cytosolique ([Ca]_i) est observée lors de la capacitation. La [Ca²⁺]_i est élevée dans la région du flagelle suite au développement d'une mobilité hyperactive et de façon plus importante dans la tête suite à la réaction acrosomale (Suarez et *al*, 1993).

La [Ca]_i peut être augmentée par l'entrée de Ca²⁺ via des canaux calciques ou la libération du Ca²⁺ contenu dans des réservoirs intracellulaires. L'entrée des ions Ca²⁺ dans le spermatozoïde est effectuée par différents transporteurs, dont l'expression est compartimentalisée sur le spermatozoïde (Darszon et *al*, 2011); (Publicover et *al*, 2007).

CHAPITRE IV: La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes

Les deux principaux types de canaux calciques détectés sur la membrane recouvrant la tête sont les voltage-operated Calcium channels (VOCCs) et les transient receptor potential channel (TRPCs) tandis que sur le flagelle sont présents les Calcium-transient channel of spermatozoa (CatSpers) (Figure 09) et les cyclic nucleotide-gated channels (CNGs). Compte tenu du rôle clé joué par l'AMPc dans l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. De leur côté, les protéines CatSper1-4 exprimées sur la pièce principale du flagelle sont indispensables à la fertilité des gamètes mâles (Jin et *al*, 2007). Puisque la délétion de l'un ou l'autre des quatre gènes Catsper produit des phénotypes très semblables et que les protéines interagissent entre elles, la formation d'un canal tétramérique est fort probable.

Pour le maintien de l'homéostasie, le Ca^{2+} est expulsé de la cellule principalement par les Ca^{2+} -ATPases de la membrane plasmique ainsi que par des échangeurs $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCXs) situés sur la pièce intermédiaire et l'acrosome (Krasznai et *al*, 2006). En plus de l'influx en provenance du milieu extracellulaire, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peut être augmentée par la libération de Ca^{2+} accumulé dans des réservoirs intracellulaires. Les spermatozoïdes possèdent des réservoirs de Ca^{2+} au niveau de la tête et de la partie proximale du flagelle.

La présence de molécules impliquées dans l'accumulation et le relargage de Ca^{2+} a mis en évidence que la vésicule acrosomale est un réservoir de Ca^{2+} . La libération du Ca^{2+} contenu dans les réservoirs résulte principalement de l'activation du récepteur de l'inositol-3, 4, 5-phosphate (IP3R). Ce dernier est exprimé dans la région acrosomale et perdu suite à l'exocytose de l'acrosome (Kuroda et *al*, 1999). De plus, la présence du récepteur dépendant de la Ryanodine (RyR) (Figure 09) dans cette région ajoutée à celle de la Ca^{2+} -ATPase de la voie sécrétrice (SPCA) 1 sur toute la longueur de la pièce intermédiaire soutiennent l'accumulation de Ca^{2+} par un ou plusieurs réservoirs dans la portion proximale du flagelle (Harper et *al*, 2004).

Un réservoir de Ca^{2+} autre que celui formé par les mitochondries est présent à la base du flagelle, plus précisément dans la membrane nucléaire redondante, et participe à la libération de Ca^{2+} en direction de l'axonème (Ho and Suarez, 2003). La régulation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, joue un rôle primordial dans l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. L'absence de Ca^{2+} dans le milieu d'incubation compromet la mobilité des spermatozoïdes

CHAPITRE IV: La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes

ainsi que l'exocytose de l'acrosome, deux éléments indispensables à la fertilité des spermatozoïdes *in vivo*.

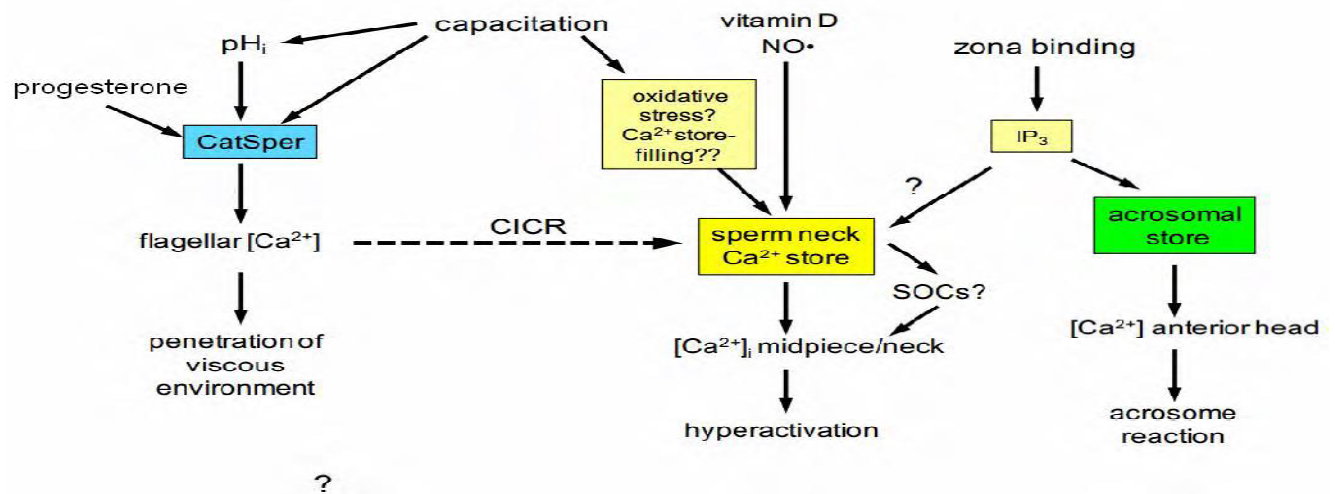


Figure 10 : Modèle de l'interaction des entrées de calcium médiées par CatSper (carré bleu) et des relâchements des stocks internes de calcium situés dans la région du cou (carré jaune).

Les stocks internes de calcium sont aussi représentés (carré vert). CatSper permet une entrée de Ca²⁺ qui induit le relâchement de Ca²⁺ (CICR) des stocks internes. La voie de signalisation pour mobiliser les stocks internes de calcium pourrait passer par les canaux SOCs.

La flèche en gris montre la mobilisation possible des stocks calciques du cou par la progestérone indépendamment des canaux CatSper (Alasmari et al, 2013). L'extrusion des ions H⁺ contribue à la hausse du pH intracellulaire et possiblement à l'activation des CatSper.

La sortie des ions K⁺ et Na⁺ contribue également de façon significative au processus de capacitation (Figure 10).

La baisse de motilité observée suite à l'incubation des spermatozoïdes dans un milieu dépourvu de Ca²⁺ serait causée par l'influx de Na⁺ (Torres-Flores et al, 2011).

En accord avec ces résultats, une diminution de la [Na⁺]_i est rapportée lors de la capacitation (Escoffier et al, 2012). De son côté, l'extrusion du K⁺ principalement via le canal K_{Sper} favorise l'hyperpolarisation de la membrane plasmique, laquelle est indispensable pour l'exocytose de la vésicule acrosomale (Santi et al, 2010).

Les milieux de culture utilisés pour la capacitation des spermatozoïdes *in vitro* contiennent tous les ions mentionnés ci-dessus. En plus de l'albumine et des substrats énergétiques.

5. Mécanisme moléculaire de la capacitation :

Dans l'épididyme la concentration du bicarbonate est de 3-4 mM et dans le tractus génital femelle est ≥ 20 mM.

Les lipoprotéines au niveau du tractus génital femelle induisent un efflux de cholestérol, l'efflux de cholestérols induit une augmentation de la fluidité membranaire et permet la diffusion latérale des cholestérols restant.

L'efflux de bicarbonate effectué par les échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ va activer l'adénylate cyclase soluble sAC qui va transformer l'ATP en AMPC, ce dernier va activer les PKA qui va phosphoryler les différentes protéines transmembranaires et intracellulaires dont les protéines Scramblases (Fig11).

La phosphorylation des protéines scramblases par la PKA va induire l'externalisation de PE et PS du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche lipidique

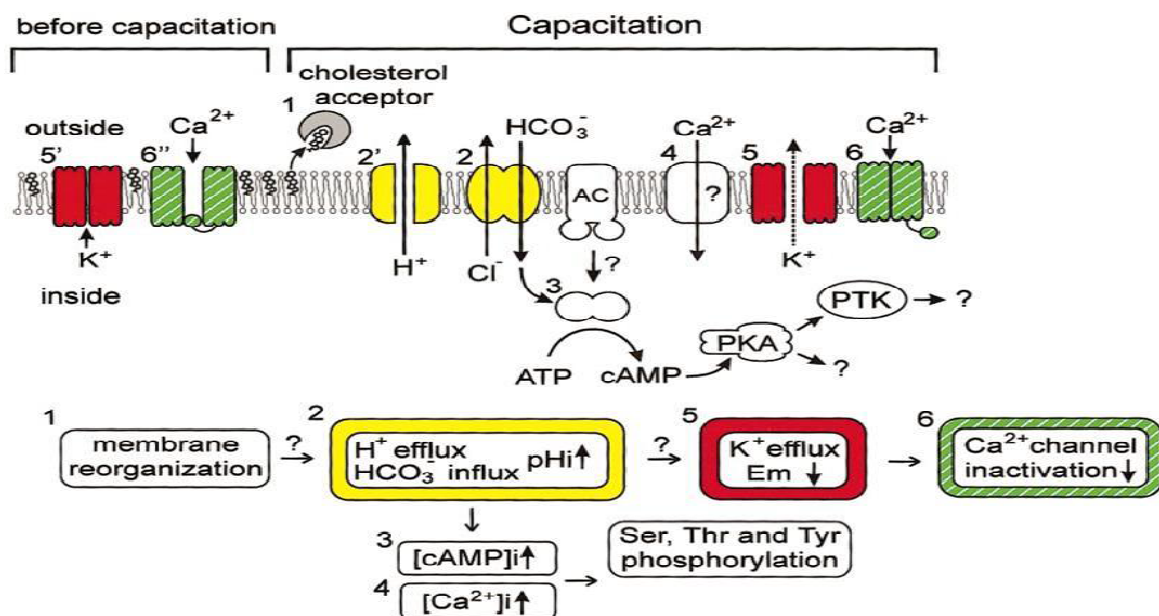


Figure11 : Schéma représentant les cascades de signalisations impliquées dans la capacitation (schéma modifié) (Darszon et al, 2001).

L'hyperpolarisation de la membrane et l'augmentation du pHi permettant aux canaux calciques de passer d'un état inactive à un état activable et finalement l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire de 70 nM à 250 nM, qui va préparer à l'étape qui suit la capacitation et qui est indispensable à la fécondation qui est la réaction acrosomique (RA).

5-1. L'hyperactivation flagellaire

À leur sortie du testicule, les spermatozoïdes bien que complètement différenciés sont très peu mobiles. L'acquisition de la mobilité se produit lors de la maturation épидидymaire. Plusieurs éléments du plasma séminal contribuent à l'initiation de la motilité dont un pH alcalin et l'abondance de fructose et de HCO₃⁻ (Okamura et al, 1985). Le HCO₃⁻ favorise l'augmentation de la fréquence du mouvement flagellaire et du calcium (Wennemuth et al, 2003). De plus, l'augmentation rapide de la concentration d'AMPc, dépendante de l'activation de SACY par le HCO₃⁻, est indispensable à la mobilité (Esposito et al, 2004). La hausse du contenu en phosphotyrosine des protéines flagellaires est également associée à l'initiation de la mobilité (Vijayaraghavan et al, 1997).

6. Mécanisme moléculaire de la mobilité spermatique après capacitation

Le mouvement flagellaire résulte notamment de l'activité des dynéines-ATPases, dont le rôle est de faire glisser les microtubules entre eux pour provoquer leur courbure. La phosphorylation dépendante de la voie de l'AMPc d'une protéine flagellaire de 36 kDa est montrée pour réguler le glissement des microtubules chez le hamster (Fujinoki et al., 2003). Tous les spermatozoïdes d'un même éjaculat ne sont pas au même stade dans le processus de maturation. La mobilité ne fait pas exception, chaque gamète se déplaçant d'une façon particulière selon son état de maturation post-éjaculatoire. La mobilité est d'abord progressive pour faciliter l'ascension des voies génitales femelles puis elle peut évoluer vers une mobilité hyperactive (Fig12), caractérisée par une augmentation marquée de l'amplitude et de la vitesse de battement du flagelle. Les systèmes d'analyse de la semence assistée par ordinateur (CASA pour Computer Assisted Semen Analysis) permettent d'évaluer la motilité en suivant le déplacement de la tête du spermatozoïde. Le déplacement latéral de la tête (ALH), la vélocité curvilinéaire (VCL), la vélocité linéaire (VSL) et la linéarité (LIN : VSL/VCL) sont autant de paramètres utilisés pour décrire le mouvement des spermatozoïdes. La motilité est considérée hyperactive lorsque l'ALH et la VCL dépassent des limites seuils préétablies et que la LIN diminue. La stringence choisie pour les différents critères varie selon les études. (Figure12).

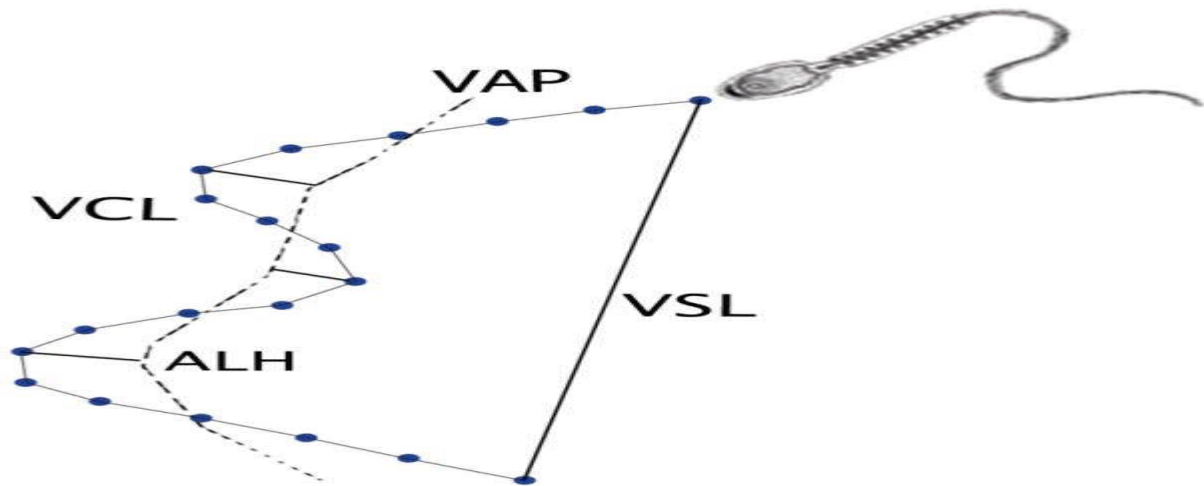


Figure12 : Illustration de la vitesse curvilinéaire (VCL), la vitesse linéaire (VSL), la vitesse moyenne du trajet (VAP), l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH).

Plus globalement, l'hyperactivation des spermatozoïdes est caractérisée par le changement de rotation symétrique en rotation asymétrique (Ho and Suarez, 2001). Ils effectuent des mouvements très vigoureux et rapides. L'hyperactivation facilite la libération physique des spermatozoïdes des cellules épithéliales de l'oviducte (Suarez and Ho, 2003). De plus, l'hyperactivation des spermatozoïdes joue un rôle vital dans la pénétration de la zone pellucide en permettant à ces derniers de traverser le cumulus et la zone pellucide (Ho and Suarez, 2001). Des facteurs physiologiques tels que le calcium, l'ATP, l'AMPc et le bicarbonate sont essentiels au maintien d'une motilité hyperactivée.

Les changements de conditions du milieu est servir à guider les spermatozoïdes lors de leur transit dans les voies génitales femelles. Les spermatozoïdes seraient guidés jusqu'au site de fécondation d'abord par un gradient thermique (Bahat and Eisenbach, 2010) de chimiotactisme à la progestérone contenue dans les sécrétions du complexe ovocyte et cellules du cumulus (COC) et de l'ovule (Oren-Benaroya et *al*, 2008). Néanmoins, la présence de progestérone dans le fluide folliculaire est requise pour le développement d'une mobilité hyperactive (Jaiswal et *al*, 1999). Les Catpers sont les principaux médiateurs de l'influx de Ca^{2+} stimulé par la progestérone (Lishko et *al*, 2011) (Strunker et *al*, 2011). Ces résultats suggèrent que la progestérone stimule l'activation des Catpers et un influx de Ca^{2+} indispensable à l'hyperactivation des spermatozoïdes.

6.1. Mécanisme moléculaire de l'hyperactivité flagellaire

Les mouvements ioniques à travers la membrane plasmique permettent les modifications de pH et de concentration de calcium intracellulaires, qui règlent l'activité des systèmes de phosphorylation/déphosphorylation actifs sur les protéines axonémales, engendrant glissement inter-tubulaire et courbure flagellaire. L'anion bicarbonate (HCO_3^-), indispensable à l'hyperactivation du spermatozoïde, déstabilise la membrane plasmique et active l'adénylyl cyclase (AC), et ainsi la synthèse d'AMP cyclique qui, active la phosphorylation de cibles, et qui augmente l'entrée de calcium extracellulaire (Figure 13).

Le pH intracellulaire (pH_i), modulé par l'entrée de bicarbonate et par l'antiport Na^+/H^+ , serait également un important régulateur du mouvement des spermatozoïdes, agissant sur le calcium intracellulaire et la synthèse d'AMPc. Des récepteurs couplés aux protéines G (R7) existent au niveau des spermatozoïdes, par exemple de type GABA et récepteurs olfactifs. Qui sont couplés aux canaux calciques et à l'adénylyl cyclase.

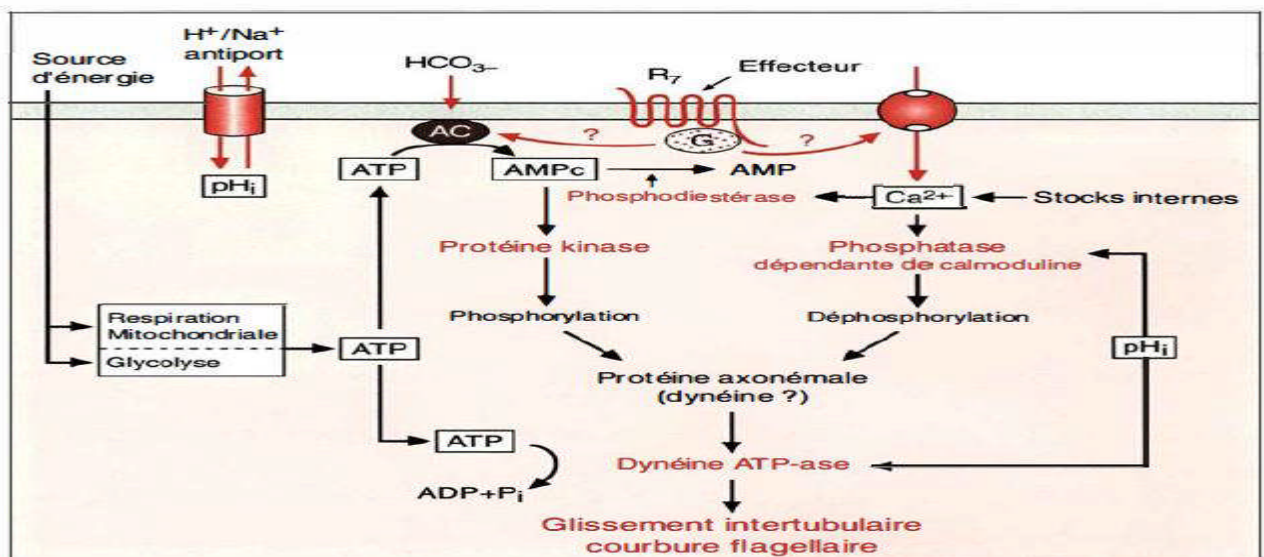


Figure13 : Schéma résumant les principaux facteurs impliqués dans la régulation du mouvement flagellaire (Pierre. J et *al*, 1995).

Bien que les mêmes molécules soient impliquées dans la régulation de la capacitation et de l'hyperactivation, les voies de signalisation impliquée sont différentes et l'hyperactivation de la mobilité n'est pas considérée comme le point terminal de la capacitation (Marquez and Suarez, 2004); (Suarez and Ho, 2003) et (Visconti et *al*, 2011).

CHAPITRE IV: La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes

Après plus de 25 ans d'effort, force est de constater que la régulation de l'hyperactivation résultant de la relation complexe qui existe entre le pH intracellulaire, le Ca^{2+} , l'AMPc et l'ATP n'est pas encore clairement définie (White and Aitken, 1989).

7-Conclusion :

La capacitation est un phénomène physiologique complexe qui permet au spermatozoïde d'accomplir sa dernière étape de maturation et ainsi d'acquérir sa fécondance. Ce mécanisme dépend de 4 paramètres principaux : la présence d'une molécule qui arrache le cholestérol comme la BSA ou l'HDL qui rend la membrane plasmique du spermatozoïde fluide, la concentration en calcium dans le milieu, la concentration en bicarbonate, anion indispensable pour déclencher les cascades biologiques et finalement, le temps de contact entre le spermatozoïde et ces molécules qui varient d'une espèce à l'autre.

CONCLUSION

D'après notre synthèse bibliographique de nombreuses études se sont focalisées sur l'action du liquide folliculaire sur la réussite de la fécondation.

Plusieurs recherches ont démontré que le liquide folliculaire et les cellules oviductales de la vache interagissent très étroitement avec les spermatozoïdes du taureau.

Le liquide folliculaire permet de finaliser la maturation du spermatozoïde et prend part au processus de reconnaissance entre l'ovule et le spermatozoïde.

Le liquide folliculaire semble contenir des substances qui améliorent la mobilité des spermatozoïdes et leur maturation nucléaire telle que des facteurs chimiotactiques, qui stimulent le métabolisme des gamètes et qui induisent l'hyper activation et la réaction acrosomique des spermatozoïdes (Zhu et *al*, 1994).

Des taux élevés de vitamine C dans la sécrétion folliculaire et d'hypo taurine (Meizel et *al*, 1980) suggèrent un rôle important de ces sécrétions dans la protection des gamètes et de l'embryon contre les phénomènes d'oxydation.

Les acides aminés sont présents naturellement dans le liquide folliculaire et seraient la bonne réalisation des étapes précédant le développement embryonnaire (Waston et *al*, 2000). Parmi les différents acides aminés ; l'hypo taurine aurait des effets protecteurs sur les dommages causés par le stress oxydatifs (Guerin et *al*, 1995).

Références bibliographiques

1. **A.R.PETERS, BA, DV et Med, Phd, FRCVS, FIBiol .,2004:** Reproduction in cattle third edition P.J.H BAHLL Bsc Phd .Page 16,17,18,19,20
2. **Alasmari, W., C.L. Barratt, S.J. Publicover, K.M. Whalley, E. Foster, V. Kay, S. Martins da Silva, and S.K. Oxenham., 2013:** The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Human reproduction*. 28:866-876
3. **Amman (R.f.), 1970 :** « sperm production rates », In « The testis », Johnson, Gomes and Vandemark, New York, Academic press, vol.1 :433-472.
4. **Arnoult, C., I.G. Kazam, P.E. Visconti, G.S. Kopf, M. Villaz, and H.M. Florman., 1999:** Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:6757-6762.
5. **Bahat, A., and M. Eisenbach., 2010:** Human sperm thermotaxis is mediated by phospholipase C and inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ channel. *Biol Reprod*. 82:606-616.
6. **Bangham, A., 1961:** Electrophoresis characteristics of ram and rabbit spermatozoa., 155, 292–305.
7. **Battelier F., 1997** Identification, purification et mécanisme d'action d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoïdes équin. Thèse présentée à l'université F. Rabelais de Tours.
8. **Bi, Y., W.M. Xu, H.Y. Wong, H. Zhu, Z.M. Zhou, H.C. Chan, and J.H. Sha., 2009.:** NYD-SP27, a novel intrinsic decapacitation factor in sperm. *Asian J Androl*. 11:229-239.
9. **BOSERET JPH.-**
10. **Buck, J., M.L. Sinclair, L. Schapal, M.J. Cann, and L.R. Levin., 1999:** Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:79-84.
11. **Chatelain. E., 1986 :** Anatomie descriptive de l'appareil génital du taureau .E1 & Ins 214 ;p5-18.

Références bibliographiques

12. **Chen, Y., M.J. Cann, T.N. Litvin, V. Iourgenko, M.L. Sinclair, L.R. Levin, and J. Buck., 2000:** Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*. 289:625-628.
13. **Chenoweth, P., 2007:** Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull., 217.
14. **CONSTANCIS P.-** Appareil génital de l'homme.
15. **Cross, J.C., Z. Werb, and S.J. Fisher., 1994:** Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*. 266:1508-1518.
16. **Cross, N.L., and P. Razy-Faulkner., 1997:** Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod*. 56:1169-1174.
17. **Dacheux, F., 2001 :** L'épididyme et les glandes annexes. 290–315.
18. **Dadoue et Demoulin A., 1991 :** Structure et fonction du testicules (Dans la reproduction chez les mammifères domestiques et l'homme, p222-253.
19. **Dadoue et Demoulin., 1991** Structure et fonction du testicules dans la reproduction des mammifères domestique et l'homme de Charles Thibault et M.C. Levasseur Edition Marketing INRA.p :221-268.
20. **Darszon, A., C. Beltran, R. Felix, T. Nishigaki, and C.L. Trevino., 2001:** Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol*. 240:1-14.
21. **Darszon, A., T. Nishigaki, C. Beltran, and C.L. Trevino., 2011:** Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*. 91:1305-1355.
22. **Delpech S.F., 1991 :** Acquisition de la fécondance du spermatozoïde (maturation épидидymaire, glandes annexes et capacitation). Reproduction chez les mammifères et l'homme, de **Charles Thibault et M.C. Levasseur**. Edition marketing. INRA, p269-275.
23. **Demarco, I.A., F. Espinosa, J. Edwards, J. Sosnik, J.L. De La Vega-Beltran, J.W. Hockensmith, G.S. Kopf, A. Darszon, and P.E. Visconti., 2003 :** Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem*. 278:7001-7009.
24. **Derivaux F. et Ectors J., 1986 :** Reproduction chez les animaux domestique. 3eme Edition cabay louvain la neuve Belgique.
25. **Eddy, E. & O'Brien, D., 1994.** The spennatozoon. *Raven Press*, 29–77.

Références bibliographiques

26. **ELAINE N.MARIEB., 2005** : Anatomie et physiologie humaines. PEARSON Education 6eme édition.
27. **Escoffier, J., D. Krapf, F. Navarrete, A. Darszon, and P.E. Visconti., 2012**: Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *J Cell Sci.* 125:473-485.
28. **Esposito, G., B.S. Jaiswal, F. Xie, M.A. Krajnc-Franken, T.J. Robben, A.M. Strik, C. Kuil, R.L. Philipson, M. van Duin, M. Conti, and J.A. Gossen., 2004**: Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:2993-2998.
29. **Esposito, G., B.S. Jaiswal, F. Xie, M.A. Krajnc-Franken, T.J. Robben, A.M. Strik, C. Kuil, R.L. Philipson, M. van Duin, M. Conti, and J.A. Gossen., 2004**. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:2993-2998.<
30. **Evan R.W. A.C, Davies ,F.J, Bowman, P, Rawlings, N.C .,1995**: Difference in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls and changes in semen characteristics at puberty. *Therio* , 43: 569-578.
31. **Flesch, F.M., and B.M. Gadella., 2000**: Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta.* 1469:197-235.
32. **Flesch, F.M., J.F. Brouwers, P.F. Nievelstein, A.J. Verkleij, L.M. van Golde, B. Colenbrander, and B.M. Gadella., 2001**: Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci.* 114:3543-3555.
33. **Fujinoki, M., T. Kawamura, T. Toda, H. Ohtake, T. Ishimoda-Takagi, N. Shimizu, S. Yamaoka, and M. Okuno., 2003**: Identification of 36-kDa flagellar phosphoproteins associated with hamster sperm motility. *J Biochem.* 133:361-369.
34. **Gadella, B.M., and R.A. Harrison., 2000**. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development.* 127:2407-2420.
35. **Gadella, B.M., P.S. Tsai, A. Boerke, and I.A. Brewis. 2008**. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol.* 52:473-480.

Références bibliographiques

36. **Galantino-Homer, H.L., P.E. Visconti, and G.S. Kopf. 1997.** Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod.* 56:707-719.
37. **Guerin, P., & Menezo, Y., 1995:** Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: De novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. 3, 333– 43.
38. **Hansen.C, Srikandakumar.A, & Downey, B., 1991:** Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development*, 30, 148–153.
39. **Ho, H.C., and S.S. Suarez., 2001:** Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction.* 122:519-526.
40. **Ho, H.C., and S.S. Suarez., 2003:** Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod.* 68:1590-1596. <http://dr-constancis-urologue.fr/content/andrologue>
41. <http://www.embryology.ch/francais/cgametogen/spermato02.html> (02/07/2018).
42. <https://www.rituel-de-retour-affectif-rapide.com> ([site web](#)) 13/06/2018.
43. **Jaiswal, B.S., and M. Conti., 2003:** Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10676-10681. defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:79-84.
44. **Jaiswal, B.S., I. Tur-Kaspa, J. Dor, S. Mashiach, and M. Eisenbach., 1999:** Human sperm chemotaxis: is progesterone a chemoattractant? *Biol Reprod.* 60:1314-1319.
45. **Jin, J., N. Jin, H. Zheng, S. Ro, D. Tafolla, K.M. Sanders, and W. Yan., 2007:**Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod.* 77:37-44.
46. **J-L ADER, F.CARRE, A.T DINH-XUAN, M.DUCLOS, N.KUBIS, J. MERCIER., 2003:** Physiologie MASSON.
47. **Knobil, E & Neill, J.,1988.** : The physiology of reproduction. *Raven Press*, 793–814.
48. **Kolb E., 1975 :** Physiologie des animaux domestique vigots frères Editeurs. P619-640.
49. **Kolb Kuroda, Y., S. Kaneko, Y. Yoshimura, S. Nozawa, and K. Mikoshiba. 1999.** Are there inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptors in human sperm? *Life Sci.* 65:135-143.La spermatogénèse.<http://www.jpboaseret.eu/index.php?page=gametogenese>

Références bibliographiques

50. **Lefievre, L., E. De Lamirande, and C. Gagnon., 2000** : The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J Androl.* 21:929-937.
51. **Lin, Y., and F.W. Kan., 1996**: Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod.* 55:1133-1146.
52. **Lishko, P.V., I.L. Botchkina, and Y. Kirichok., 2011**: Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature.* 471:387-391.
53. **Lishko, P.V., I.L. Botchkina, and Y. Kirichok., 2011**: Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature.* 471:387-391.
54. **Marquez, B., and S.S. Suarez., 2004** : Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol Reprod.* 70:1626-1633.
55. **Martinez-Lopez, P., C.M. Santi, C.L. Trevino, A.Y. Ocampo-Gutierrez, J.J. Acevedo, A. Alisio, L.B. Salkoff, and A. Darszon., 2009**: Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 381:204-209.
56. **Mc Donald ME., 1980**: Veterinary endocrinology and reproduction. Lea et Febiger ed 3rd 560p.
57. **Mckay G., 1991** : anatomie du tractus génital male (dans manuel technique d'insémination artificielle bovine, Canada, p33-36).
58. **Mckay G., 1991** : Anatomie du tractus génital male (récolte de la semence). Manuel d'insémination artificielle bovine, Edité par Peter. Prenner, Canada, p37-42.
59. **Meizel, S, & Working, P. (1980)**. Further evidence su ggesting the hormone stimulus of hamstre, 22,211–216.
60. **Meizel, S., & Working, P. (1980)**: Further evidence su ggesting the hormone stimulus of hamstre., 22,211–216.
61. **Ménézo.Y et Guérin.P., 2001** : Biochimie de l'environnement in vivo et in vitro de l'ovocyte et du jeune l'embryon. In la Reproduction chez les mammifères et l'homme, ed. C.Thibault et M.C.Levasseur. p410-424. Paris : Ellipses.
62. **Navarro, B., Y. Kirichok, J.J. Chung, and D.E. Clapham., 2008**: Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int J Dev Biol.* 52:607-613.

Références bibliographiques

63. **NGUYEN S.H., 2005** : Manuel d'anatomie et de la physiologie. 3eme édition. EDITIONS LAMARRE.
64. **Nishigaki, T., O. Jose, A.L. Gonzalez-Cota, F. Romero, C.L. Trevino, and A. Darszon., 2014**: Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and biophysical research communications*. 450:1149-1158.
65. **Noaks D. E-** The normal breeding animal in fertility and infertility in domestic animals (third edition). Edited by J.A. Lainig (Baillere Tindall-London). 1979 p 1-26.
66. **Okamura, N., Y. Tajima, A. Soejima, H. Masuda, and Y. Sugita., 1985**: Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem*. 260:9699-9705.
67. **Oren-Benaroya, R., R. Orvieto, A. Gakamsky, M. Pinchasov, and M. Eisenbach., 2008.**: The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod*. 23:2339-2345.
68. **Parez (M.), Thibier (M.), 1983** : « Contrôle de la fonction sexuelle chez le jeunes taurillon .» , Elevage et insémination, 197 :3-16.
69. **Parez . M. et Thibier.M**: “contrôle de la fonction sexuelle chez le jeune taurillon. »
70. **Parez M .et Duplan J.M., 1987** : L'insémination artificielle bovine (reproduction et amélioration génétique). Edité par I.T.E.B et U.N.C.E.A. Paris(France). p 17-82.
71. **Publicover, S., C.V. Harper, and C. Barratt., 2007**: [Ca²⁺]_i signalling in sperm--making the most of what you've got. *Nat Cell Biol*. 9:235-242.
72. **Santi, C.M., P. Martinez-Lopez, J.L. de la Vega-Beltran, A. Butler, A. Alisio, A. Darszon, and L. Salkoff., 2010**: The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett*. 584:1041-1046
73. **Soltner .D, 1993** :.La reproduction des animaux d'élevage (tome1, 2eme édition). Anatomie de l'appareil génital male (taureau). p13-14
74. Spermatogénèse <http://www.embryology.ch/francais/cgametogen/spermato02.html>.
75. **Suarez, S.S., S.M. Varosi, and X. Dai., 1993**: Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:4660-4664.
76. **Taveau, J., 2013** : *Vache - échographie - gynécologie - cycles – gestant*.
77. **Thibault C .and Levasseur, M., 2001** : La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA, Paris.

Références bibliographiques

78. **Thibault et M.C. Levasseur.**, 1992 : Edition marketing. INRA, p269-275.
79. **Torres-Flores, V., G. Picazo-Juarez, Y. Hernandez-Rueda, A. Darszon, and M.T. Gonzalez-Martinez.**, 2011: Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod.* 26:2626-2635.
80. **Travis, A.J., and G.S. Kopf.**, 2002: The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest.* 110:731-736.
81. **Vijayaraghavan, S., S.A. Goueli, M.P. Davey, and D.W. Carr.**, 1997: Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *J Biol Chem.* 272:4747-4752.
82. **Visconti, P.E., D. Krapf, J.L. de la Vega-Beltran, J.J. Acevedo, and A. Darszon.**, 2011: Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl.* 13:395-405.
83. **Visconti, P.E., G.D. Moore, J.L. Bailey, P. Leclerc, S.A. Connors, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G.S. Kopf.**, 1995: Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development.* 121:1139-1150.
84. **Watanabe, H., T. Takeo, H. Tojo, K. Sakoh, T. Berger, N. Nakagata, T.W. Mak, and G. Kondoh.**, 2014: Lipocalin 2 binds to membrane phosphatidylethanolamine to induce lipid raft movement in a PKA-dependent manner and modulates sperm maturation. *Development.* 141:2157-2164.
85. **Watson, D., Hubbard, B., & Wiese, D. (2000).** Self-other agreement in personality and affectivity: effects of acquaintanceship, trait visibility, and assumed similarity. *Journal of Personality and Social Psychology*, 78, 546–558.
86. **Watson.D, Hubbard.B, & Wiese.D., 2000:** Self-other agreement in personality and affectivity: effects of acquaintanceship, trait visibility, and assumed similarity. *Journal of Personality and Social Psychology*, 78, 546–558.
87. **Wennemuth, G., A.E. Carlson, A.J. Harper, and D.F. Babcock.**, 2003: Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺ -channel responses: initial events in sperm activation. *Development.* 130:1317-1326.
88. **White, D.R., and R.J. Aitken.**, 1989: Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res.* 22:163-177.

Références bibliographiques

89. **Zeng, X.H., C. Yang, S.T. Kim, C.J. Lingle, and X.M. Xia., 2011:** Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K⁺ current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:5879-5884.
90. **Zeng, Y., E.N. Clark, and H.M. Florman., 1995:** Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol.* 171:554-563.
91. **Zhu. W, Newton. C, Daaka. Y, Friedman.H, & Klein.T., 1994:** Tetrahydrocannabinol enhances the secretion of interleukin-1 from endotoxin-stimulated macrophage. *Pharmacol Exp Ther,* 270, 1334–1339.

Technique de récolte du liquide folliculaire

1-Introduction :

La collecte du liquide folliculaire est une phase très importante dans la préparation des spermatozoïdes pour la capacitation in vitro. Plusieurs techniques permettent de réaliser la récolte et toutes permettent d'obtenir un liquide de bonne qualité. Parmi les méthodes les plus couramment utilisées, de nos jours, on retrouve la récolte sur ovaires des vaches abattues au niveau de l'abattoir.

2- Matériels et méthodes :

2-1 Matériels :

2-1-1 Les ovaires :

Les ovaires sont collectés au niveau de l'abattoir d'ELHARRACHE. Ils sont ensuite transférés dans les 3 heures qui suivent la récolte au niveau de la station expérimentale de l'université Saad Dahleb de blida.

2-1-2 Matériels :

Le matériel utilisé pour la récolte des ovaires, la ponction des follicules comporte :

- *Ciseaux
- *Sac isotherme
- * Un thermomètre pour le contrôle de la température pendant le transport des ovaires.
- *Sérum physiologique : Nacl 9%
- *Bocal en verre avec un couvercle à visser
- *Alcool 70
- * Compresses stériles
- * Seringues stériles et aiguilles (G : 18) pour la ponction des follicules.
- * Tubes secs
- * Gants stériles
- * Centrifugeuse

*Congélateur

*Essuie tout



Figure (01) : Matériel et produits utilisés pour la préparation des ovaires à la ponction

2-2 Méthode : décrite par Bruyère., 2002 et Kumar *et al.*, 1997:

2-2-a Collecte des ovaires :

La récolte du liquide folliculaire est effectuée après récupération des ovaires à l'abattoir d'ELHARRACHE d'une façon propre. Les ovaires doivent être prélevés dans les deux heures qui suivent l'abattage de la vache, ils sont rincés à l'aide de NaCl 9% puis seront stockés dans un bocal contenant du sérum physiologique maintenus dans sac isothermique à une température comprise entre 20°C à 24°C. Le prélèvement du liquide folliculaire sera effectué dans les 4 heures suivant le prélèvement des ovaires.

2-2-b La récolte du liquide folliculaire par ponction ovarienne :

Afin d'éliminer toute trace de sang et les impuretés sur les ovaires, nous les avons rincés 2 à 3 fois avec une solution saline suivi par leur désinfection à l'aide d'une compresse imbibée d'alcool 70°.



Figure(03) et (04) : Essuyage et désinfection des ovaires.

La récolte de liquide folliculaire se fait après essuyage des ovaires à l'aide des compresses imbibées de l'alcool puis la ponction de ces derniers à l'aide de seringue, ovaire maintenu entre les 2 doigts en appliquant une légère pression pour mettre en évidence les follicules. Le liquide folliculaire récupéré est versé ensuite dans des tubes pour la centrifugation.



Figure (05) : Ponction des follicules en surface

2-2-c la centrifugation du liquide folliculaire récolté :

Les flacons seront ensuite placés dans une centrifugeuse en l'ajustant à 2000 tours pendant 10 minutes. Séparer le surnageant du culot en versant le liquide tout doucement dans un autre flacon et rinçage du flacon avec de l'eau de robinet pour se débarrasser du culot : débris ayant précipité au fond du tube. Remettre ensuite le liquide pour une deuxième centrifugation. De même, verser le liquide dans un flacon et étiqueter.

2-2-d Etiquetage et conservation du liquide folliculaire :

Le flacon doit contenir certains renseignements telle que : nom et prénom, nature du prélèvement, la date. Les flacons sont finalement mis dans un congélateur pour la conservation à -20 °C.