

N° d'ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

People's Democratic Republic of Algeria

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministry of Higher Education and Scientific Research



معهد العلوم البيطرية
Institute of Veterinary
Sciences

جامعة البليدة 1
University Blida-1



Mémoire de Projet de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Mise en évidence des indicateurs de la
capacitation des spermatozoïdes bovins par
système CASA après culture.**

Présenté par

MOUSSOUS Djouza

Soutenu le 06/07/2023

Présenté devant le jury :

Président :	KALEM A.	MCA	ISV/Blida 1
Examineur :	YAHIMI AK.	MCA	ISV/Blida 1
Promoteur :	ADEL D.	MCB	ISV/Blida 1
Co-Promoteur :	MEDJKOUNE M.	DMV	ISV/Blida 1

Année universitaire 2022/2023

N° d'ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

People's Democratic Republic of Algeria

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministry of Higher Education and Scientific Research



معهد العلوم البيطرية
Institute of Veterinary
Sciences

جامعة البليدة 1
University Blida-1



Mémoire de Projet de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Mise en évidence des indicateurs de la
capacitation des spermatozoïdes bovins par
système CASA après culture.**

Présenté par

MOUSSOUS Djouza

Soutenu le 06/07/2023

Présenté devant le jury :

Président :	KALEM A.	MCA	ISV/Blida 1
Examineur :	YAHIMI AK.	MCA	ISV/Blida 1
Promoteur :	ADEL D.	MCB	ISV/Blida 1
Co-Promoteur :	MEDJKOUNE M.	DMV	ISV/Blida 1

Année universitaire 2022/2023

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers Dieu tout-puissant pour m'avoir donné l'opportunité de mener à bien mes études et d'achever ce projet avec succès.

Je souhaite également exprimer mes remerciements au président du jury, le Dr KALEM .A, pour avoir accepté de présider cette assemblée et pour sa précieuse contribution. De plus, je tiens à remercier sincèrement monsieur l'examineur, le Dr YAHIMI .AK, pour avoir examiné mon projet avec rigueur et pour ses commentaires constructifs.

J'aimerais également adresser mes remerciements les plus chaleureux au Dr ADEL .D, mon promoteur. Votre immense gentillesse et votre écoute attentive tout au long de cette année ont été d'une valeur inestimable. Vous m'avez prodigué des conseils précieux et m'avez orienté de manière judicieuse. Je vous suis extrêmement reconnaissante pour votre soutien indéfectible.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers ma co-promotrice le Dr MEDJKOUNE .M pour son aide précieuse, pour m'avoir enseigné la manipulation des différents instruments, pour m'avoir inculqué la rigueur exigé dans un laboratoire de recherche et pour m'avoir soutenu tout au long des longues heures de l'expérimentation.

Je tiens également à remercier le Dr KEBBAL .S, directeur de la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des carnivores de l'Université de Blida -1-, pour m'avoir chaleureusement accueilli et pour avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire à la réalisation de mon expérimentation.

Une pensée va également à toute l'équipe du cabinet vétérinaire Vétocab pour leur soutien indéfectible et leur bienveillance. Je leur suis extrêmement reconnaissante pour tous les conseils prodigués et les informations transmises.

Mes remerciements vont également à tous mes amis, camarades et membres du club Ibn El Baytar pour la merveilleuse ambiance que nous avons su maintenir tout au long de ces années d'études, ainsi que pour le soutien mutuel et les conseils échangés.

Encore une fois, je souhaite exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce projet. Votre soutien et vos conseils ont été d'une importance capitale dans mon parcours.

DEDICACES

Je dédie ce travail à mes parents, qui ont mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour assurer ma réussite, ainsi qu'à mon grand-père, qui m'a transmis son amour pour les animaux et à qui je réalise le rêve de me voir obtenir mon diplôme de docteur vétérinaire. C'est en grande partie grâce à lui que j'ai pu atteindre cet objectif.

Je n'oublie pas mes sœurs et mon frère, qui m'ont soutenu de manière inconditionnelle tout au long de ce parcours. Je leur passe le flambeau, convaincue qu'ils feront encore mieux et accompliront de grandes choses.

Mes pensées vont à tous les animaux que j'ai côtoyés tout au long de ma vie, qui m'ont tant appris et qui ont fait de moi la vétérinaire que je suis aujourd'hui. Je m'engage à continuer de progresser afin d'offrir la meilleure qualité de soins à chaque animal qui croisera mon chemin.

RESUME

Cette étude a été menée pour mettre en évidence des indicateurs de la capacitation à l'aide d'analyse effectuée par le système CASA sur la semence après avoir été mise en incubation à 37°C dans à un intervalle régulier de 2h.

Cette semence a été mise en culture dans un milieu de base pour capacitation enrichie à 0, 10 et 50% en Fluide Folliculaire.

Les résultats obtenus ont permis d'affirmer avec certitude que le Fluide Folliculaire avait un effet bénéfique sur les spermatozoïdes, car au fil des analyses les résultats du milieu à 0% démontraient en majeure partie des valeurs de mobilité et de cinétique à 0 tandis que les milieux à 10 et 50% de Fluide Folliculaire affichaient des valeurs nettement supérieures, où dans certains cas elles atteignaient celle d'une semence hyperactivée qui selon Mortimer (1998) est une $VCL > 150 \mu\text{m}/\text{sec}$ un $ALH > 07 \mu\text{m}$ et une $LIN < 40\%$.

Cette hyperactivation a été observé dans 3 des 4 essais cela pourrait être imputé à la mauvaise qualité de la semence de l'essai 4, on déduit donc que la qualité de base de la semence influe de façon proportionnelle sur l'hyperactivation de la semence et donc sur la capacitation in vitro.

Mots clefs : *CASA, Capacitation, Hyperactivation, Fluide Folliculaire.*

ملخص

تم إجراء هذه الدراسة لتسليط الضوء على مؤشرات السعة باستخدام التحليل الذي أجراه نظام CASA على المنى بعد الحضانة عند 37 درجة مئوية خلال فترة 2 ساعة منتظمة.

تمت زراعة هذه المنى في وسط أساسي للقدرة المخصصة من 0 و 10 و 50% من السائل الجريبي.

تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها في التصريح على وجه اليقين أن السائل الجريبي كان له تأثير مفيد على الحيوانات المنوية، لأنه خلال التحليل، أظهرت نتائج متوسط 0% بشكل أساسي قيم التنقل والحركية عند 0 بينما كانت وسائط 10% و

50% من السائل الجريبي أعلى بكثير، حيث وصلوا في بعض الحالات إلى فرط النشاط والتي وفقاً لـ (Mortimer 1998)

هي $LIN < 40\%$ و $VCL > 150\mu\text{m}/\text{sec}$; $ALH > 07\mu\text{m}$

لوحظ هذا التنشيط المفرط في 3 الاختبارات 4 التي يمكن أن تُعزى إلى النوعية الرديئة للمنى للاختبار 4 لذلك يُستنتج

أن الجودة الأساسية للمنى له تأثير متناسب على التنشيط المفرط للمنى و بالتالي على السعة في المختبر.

الكلمات الرئيسية CASA ؛ السعة، التنشيط المفرط، السائل الجريبي.

ABSTRACT

This study was conducted to identify indicators of capacitation using analysis performed by the CASA system on semen after incubation at 37°C at regular 2-hour intervals. The semen was cultured in a base medium for capacitation enriched with 0%, 10%, and 50% Follicular Fluid. The results obtained confirmed that Follicular Fluid had a beneficial effect on spermatozoa. The analysis revealed that the 0% medium mostly showed values of zero for mobility and kinetics, while the 10% and 50% Follicular Fluid media exhibited significantly higher values. In some cases, they even reached the levels of hyperactivated semen, characterized by $VCL > 150 \mu\text{m}/\text{sec}$, $ALH > 07 \mu\text{m}$, and $LIN < 40\%$, according to Mortimer's (1998) criteria. This hyperactivation was observed in 3 out of 4 experiments and could be attributed to the poor quality of the semen in Experiment 4. Thus, it can be inferred that the baseline quality of semen proportionally influences semen hyperactivation and in vitro capacitation.

Keywords: *CASA, Capacitation, Hyperactivation, Follicular Fluid.*

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE :.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
CHAPITRE I : LE SPERME ET SES CONSTITUANTS.	4
Introduction :.....	4
1. Spermatozoïde :.....	4
1.1. Morphologie du spermatozoïde :.....	4
1.1.1. Tête :.....	5
1.1.2. Noyau :.....	5
1.1.3. Acrosome :.....	5
1.1.4. Flagelle :.....	5
1.2. Spermatogénèse:.....	8
2. Plasma séminal :.....	9
CHAPITRE II : CAPACITATION.....	12
Introduction:.....	12
1. Capacitation in vivo :.....	12
1.1. Changements membranaires :.....	13
1.2. Efflux d'ions et potentiel de la membrane plasmique des spermatozoïdes :.....	13
1.3. Calcium intra cellulaire :.....	14
1.4. Bicarbonate et PH :.....	14
1.5. Protéines kinases :.....	14
1.6. Capacitation et espèces réactives d'oxygène :.....	15
2. Capacitation in vitro :.....	16
3. Facteurs capacitants présents dans le tractus génital femelle :.....	16
4. Évaluation de la capacitation des spermatozoïdes:.....	18
4.1. Hyperactivation du mouvement flagellaire :.....	18
5. Analyse Informatique du Sperme (CASA: Computerzed Assisted Sperm Analysis) :..	20
6. Sélection et capacitation des spermatozoïdes :.....	21
6.1. Migration ascendante:.....	22
6.2. Gradient de densité:.....	22
6.3. Gradient de Percoll :.....	22
PARTIE EXPERIMENTALE	23

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODE.....	24
1. Lieu de l'expérimentation :.....	24
2. Matériel :.....	24
2.1. Matériel biologique et milieux :.....	24
2.2. Matériel d'analyse de la semence :.....	27
2.3. Matériel de laboratoire :.....	28
3. Méthode :.....	32
3.1. Préparation du fluide folliculaire :.....	32
3.2. Préparation des milieux :.....	33
3.3. Préparation de la semence :.....	35
3.3.1. Conservation :.....	35
3.3.2. Décongélation :.....	35
3.3.3. Extraction de la semence :.....	35
3.3.4. Analyse préliminaire :.....	36
3.3.5. Mise en incubation :.....	37
3.3.6. Analyse post-incubation :.....	37
CHAPITRE II : PRESENTATION DES RESULTAT.....	38
1. Essai N°01 :.....	38
2. Essai N°02.....	39
3. Essai N°03.....	40
4. Essai N°04.....	42
CHAPITRE III : Discussion.....	44
CHAPITRE IV : Conclusion.....	46
CHAPITRE V : RECOMANDATION.....	47
REFERENCES.....	48
ANNEXE 01	53

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : CONCENTRATION DES DIFFERENTS CONSTITUANTS DU PLASMA SEMINAL DU TAUREAU.(18)	11
TABLEAU 2 : REFERENCES DES PAILLETES UTILISEES.	26
TABLEAU 3 : RESULTAT DE L'ESSAI N°01.....	38
TABLEAU 4 : RESULTAT DE L'ESSAI N° 02.	39
TABLEAU 5 : RESULTAT DE L'ESSAI N°03.....	40
TABLEAU 6 : RESULTAT DE L'ESSAI N°04.....	42

Liste des figures

FIGURE 1: SCHEMATISATION D'UN SPERMATOZOÏDE.(1).....	4
FIGURE 2: SCHEMA DETAILLE DE LA TETE ET DU COL DU SPERMATOZOÏDE.(1).....	6
FIGURE 3: AXONEME ET STRUCTURES PERI-AXONEMALES SUR COUPES TRANSVERSALES DU FLAGELLE.(1).....	8
FIGURE 4: LA SPERMATOGENESE.(1).....	9
FIGURE 5: RESUME BIOCHIMIQUE DE LA CAPACITATION.(20).....	12
FIGURE 6: TRAJECTOIRES DE SPERMATOZOÏDES CAPACITES MOBILES NON HYPERACTIVES ET HYPERACTIVES.(1).....	19
FIGURE 7 : TERMINOLOGIES STANDARDS DES VARIABLES CINETIQUES MESUREES PAR LES SYSTEMES CASA.(1).....	21
FIGURE 8 : FLACON D'EASY BUFFER A.....	25
FIGURE 9 : SOLUTION STOCK POUR CAPACITATION.	25
FIGURE 10 : FLUIDE FOLLICULAIRE.	26
FIGURE 11 : PAILLETES DE SEMENCE UTILISEES LORS DE L'EXPERIMENTATION.....	27
FIGURE 12: SYSTEME CASA HAMILTON THORN IVOS II.....	27
FIGURE 13 : MICROPIPETTES.....	28
FIGURE 14 : MICROTUBES.....	28
FIGURE 15 : TUBE A ESSAI.....	29
FIGURE 16 : CENTRIFUGEUSE.....	29
FIGURE 17 : BAIN-MARIE.....	30
FIGURE 18 : PLATINE CHAUFFANTE.....	30
FIGURE 19 : VORTEX.....	31
FIGURE 20 : DECONGELATEUR A PAILLETES.....	31
FIGURE 21 : PARAMETRAGE DE LA CENTRIFUGEUSE.....	33
FIGURE 22 : ETAPES DE PREPARATION DU FLUIDE FOLLICULAIRE A L'UTILISATION.....	33
FIGURE 23 : ETAPES DE PREPARATION DES MILIEUX.....	34
FIGURE 24 : CONSERVATION DES PAILLETES.....	35
FIGURE 25 : ETAPES D'EXTRACTION DE LA SEMENCE APRES DECONGELATION DE LA PAILLETTE.....	36
FIGURE 26: REMPLISSAGE D'UNE CHAMBRE DE LA LAME LEJA AVEC DE LA SEMENCE DILUEE.....	36
FIGURE 27: ECHANTILLONS EN INCUBATION.....	37
FIGURE 28 : CLICHE INDIVIDUEL D'UN SPERMATOZOÏDE APRES INCUBATION.....	37

Liste des abréviations et des sigles

% : Pourcentage.

µg : Microgramme.

µl : Microlitre.

°C : Degré Celsius.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AKAP : A Kinase Anchoring Protein.

ALH : Amplitude of lateral Head displacement.

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique.

ATP : Adénosine triphosphate.

BCF : Beat cross frequency.

BiSV : Protéines des vésicules séminales de bison «Bison Seminal Vesicle proteins».

BSA : Albumine de Sérum Bovin.

BSP : Protéines majeures du plasma séminal bovin «Bovine Seminal Plasma proteins».

Ca²⁺ : Calcium.

CASA : Computer-Assisted Sperm Analysis.

CNIAAG : Centre National d'Insémination Artificiel et d'Amélioration Génétique.

CM : Milieu capacitant.

CpE : Corona Penetrating Enzyme.

CTC : Chlortétracycline.

FF : Fluide Folliculaire.

FSIP2 : FibrousSheath Interaction Protein 2.

g : Accélération gravitationnelle (9,81 m/sec²).

g : Gramme.

GAG : Glycosaminoglycan.

h : Heure.

HCO₃⁻ : Bicarbonate.

HDL : Lipoprotéines de haute densité «High Density Lipoprotein».

Hz : Hertz.

IA : Insémination artificielle.

IP3 : Inositol Triphosphate.

K⁺ : Potassium.

L-NAME : N-omega-nitro-L-arginine méthyl ester.

LDL : Lipoprotéine de faible densité «Low Density Lipoprotein».

M : Molaire (mole/litre).

m : Mètre.

mg : Milligramme.

min : Minute.

ml : Millilitre.

mM : Millimolaire.

n : Nombre de répétition.

Na⁺ : Sodium.

NCM : Milieu non capacitant.

PKA : Protéine Kinase A.

PMOT : Pourcentage des spermatozoïdes progressifs.

PS : Plasma séminal.

PSA-fITC : Agglutinine Pisum sativum couplé à la fluorescéine «Fluorescein labeled Pisum sativum agglutinin».

PSP : Protéines du plasma séminal porcin «Porcine Seminal Plasma protein».

ROS : Espèces réactives de l'oxygène.

sec : Seconde.

spz : Spermatozoïde.

TMOT : motilité totale.

V : Volume.

VAP : Velocity average pathway.

VCL : Velocity curvilinear.

VSL : Velocity straight line.

INTRODUCTION GENERALE :

Les progrès des biotechnologies de la reproduction ont ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de la médecine vétérinaire, avec des conséquences significatives sur la santé et la productivité du cheptel bovin en Algérie. Face aux défis spécifiques liés à la reproduction dans ce pays, tels que les contraintes environnementales, les maladies infectieuses et les facteurs génétiques, il est essentiel de développer des techniques innovantes de reproduction.

Dans ce contexte, notre projet vise à explorer les effets de l'enrichissement des milieux d'incubation avec du liquide folliculaire sur la capacitation in vitro des spermatozoïdes bovins, tout en identifiant les indicateurs de capacitation grâce à l'utilisation de la technologie Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA).

La capacitation in vitro des spermatozoïdes est une étape clé de la reproduction assistée, où les spermatozoïdes sont préparés pour acquérir les caractéristiques nécessaires à une fécondation réussie. Parmi les facteurs influençant ce processus, le choix du milieu d'incubation joue un rôle crucial en impactant la mobilité, la morphologie et la fonctionnalité des spermatozoïdes.

Dans notre étude, nous allons enrichir les milieux d'incubation avec du liquide folliculaire, une substance naturellement présente dans l'environnement folliculaire qui entoure l'ovule. Cette inclusion du liquide folliculaire vise à recréer des conditions plus proches de l'environnement physiologique, favorisant ainsi la capacitation des spermatozoïdes bovins in vitro.

À l'aide de la technologie CASA, une méthode avancée d'analyse automatisée des spermatozoïdes, nous évaluerons les paramètres de capacitation tels que l'hyperactivité, les altérations de la membrane acrosomique et d'autres indicateurs de maturation. En comparant les résultats obtenus avec l'enrichissement du milieu d'incubation enrichi en liquide folliculaire à ceux obtenus sans cet enrichissement, nous pourrions déterminer les effets de cette substance sur la capacitation des spermatozoïdes.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet auront des implications significatives pour l'optimisation des protocoles de capacitation in vitro et l'amélioration des taux de fécondation assistée. En enrichissant les milieux d'incubation avec du liquide folliculaire, nous espérons favoriser une capacitation plus efficace des spermatozoïdes bovins, améliorant ainsi les chances de succès de la reproduction assistée.

En conclusion, notre projet vise à étudier les effets de l'enrichissement des milieux d'incubation avec du liquide folliculaire sur la capacitation in vitro des spermatozoïdes bovins, en utilisant la technologie CASA pour identifier les indicateurs de capacitation. Ces recherches visent à améliorer les techniques de reproduction assistée en recréant des conditions physiologiques plus favorables, contribuant ainsi à la santé et à la productivité du cheptel bovin en Algérie.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LE SPERME ET SES CONSTITUANTS.

Introduction :

Le sperme est un produit de sécrétion élaboré durant le transit des spermatozoïdes le long du tractus génital mâle, il est composé des spermatozoïdes et du plasma séminale. Ces derniers ne se mélangent qu'au moment de l'éjaculation. L'émission de l'éjaculat dans les conditions naturelles est obtenue lors de l'éjaculation qui fait suite à l'érection. Ce sont des phénomènes réflexes contrôlés par les centres nerveux médullaires. Les voies sensibles afférentes sont assurées par le nerf honteux innervant les zones érogènes du tractus génital.

1. Spermatozoïde :

Le spermatozoïde est le gamète mâle produit dans les testicules le long de la vie reproductive de l'animal, ce dernier est issu de diverses étapes de division et de différenciation nommé la spermatogenèse.

1.1. Morphologie du spermatozoïde :

Le spermatozoïde est composé de 2 segments bien distincts ; la tête qui porte l'information génétique en son noyau et le flagelle qui lui permet de se mouvoir et ainsi remonté les voies génitales de la femelle à la rencontre de l'ovocyte ; ce dernier s'articule grâce à la pièce intermédiaire également appelée col (figure 01).

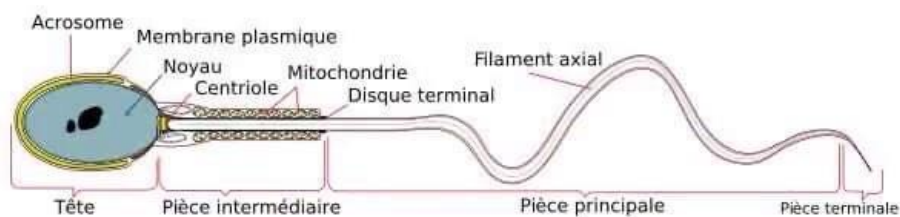


Figure 1: Schématisation d'un spermatozoïde.(1)

1.1.1. Tête :

La tête est composée d'une vésicule nommée l'acrosome et d'un noyau dense et volumineux qui lui confère cette forme ovale aplatie caractéristique.

1.1.2. Noyau :

Pendant la spermiogénèse, l'ADN (Acide désoxyribonucléique) spermatique est condensé via le remplacement graduel des histones par des protéines de transition spécifiques au testicule, puis par des protamines offrant un état de compaction six fois plus dense que celui de la chromatine nucléosomale des cellules somatiques(2). Cette compaction entraîne une impossibilité de transcription et de traduction au sein du noyau mais offre une protection adéquate du matériel génétique lors de son transit dans les tractus génitaux. Durant sa fabrication, le gamète mâle perd la majeure partie de son cytoplasme, lui conférant sa forme hydrodynamique d'ovoïde légèrement aplati (3).

1.1.3. Acrosome :

L'acrosome est formé à partir de l'appareil de Golgi durant la spermiogénèse. Il contient de nombreuses enzymes hydrolytiques et protéolytiques qu'il libère lors de son exocytose qui est appelée la réaction acrosomique: glycuronidase, hyaluronidase, phosphate acide, N-acétylglycosaminidase, protéinase neutres (acrosine) et acides, Corona Penetrating Enzyme (CpE) etc. La réaction acrosomique permet entre autres de faciliter la progression du spermatozoïde dans les cellules du cumulus grâce à l'action de l'hyaluronidase (4) permettre l'adhésion et la pénétration de la zone pellucide grâce à l'acrosine (5), ou encore permettre le démasquage de la protéine IZUMO qui va jouer un rôle essentiel en s'arrimant à son récepteur ovocytaire Juno et induire la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte (6).

1.1.4. Flagelle :

Pour progresser dans le tractus génital féminin à la rencontre de l'ovocyte et traverser les cellules du cumulus, un système de propulsion est nécessaire au spermatozoïde. Celui-ci se présente sous la forme d'un flagelle, composé de 3 segments : une pièce intermédiaire, une pièce principale et une pièce terminale.

- a. Col : Le flagelle s'insère dans la face postérieure de la tête formant une région de jonction nommée le col (figure 02) qui comprend deux centrioles et neuf colonnes segmentées. Le centriole proximal se dédoublera lors de la fécondation pour former le premier fuseau mitotique. Le centriole distal est le point de départ dans la formation de l'axonème, structure

complexe essentielle à la mobilité du flagelle. Les colonnes sont à l'origine des fibres denses qui entourent l'axonème.

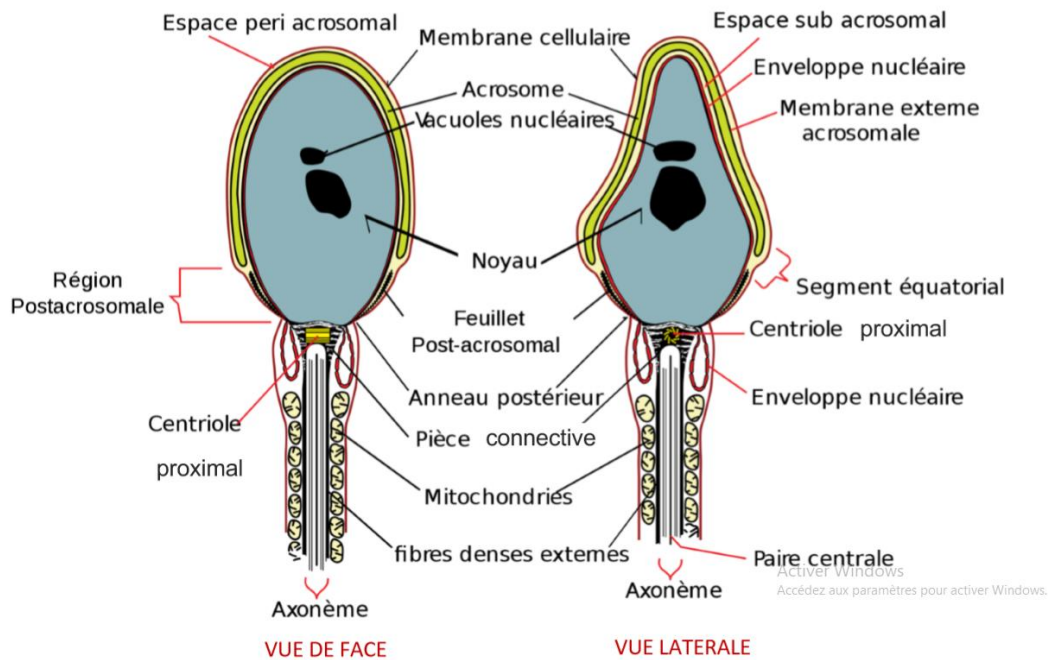


Figure 2: Schéma détaillé de la tête et du col du spermatozoïde.(1)

- b. Axonème : L'axonème est la partie axiale et motrice d'un cil ou d'un flagelle d'une cellule eucaryote. Cette structure complexe s'étend sur toute la longueur du flagelle et est le principal responsable de l'activité motrice du spermatozoïde. L'axonème est composé de 9 doublets de microtubules organisés autour de deux singlets de microtubule (paire centrale). L'ensemble est organisé dans une conformation dite 9 + 2 (7). Chaque doublet met en association un microtubule A et un microtubule B. Ces paires de microtubules sont reliées par des ponts de nexine qui permettent un rôle de maintien structural tout en conservant une élasticité nécessaire à la propulsion. Chaque microtubule A possède deux bras de dynéine tendant vers le microtubule B voisin. La paire centrale est enveloppée d'un complexe protéique vers lequel tendent les ponts radiaires des doublets extérieurs (figure 03). L'oscillation est due à un mouvement des bras de dynéines qui font glisser les doublets les uns par rapport aux autres. La paire centrale (via les ponts radiaires, à un rôle de centre organisateur du mouvement).
- c. Fibres denses : Issues des colonnes segmentées du col, les fibres denses sont des structures protéiques au nombre de neuf présentes sur toute la longueur du spermatozoïde à l'exception de la pièce terminale. Disposées en regard de chaque microtubule, elles possèdent à la fois un rôle structural et une fonction mécanique. La rigidité des fibres denses

permet une protection du flagelle lors de son parcours dans les voies génitales mâle puis femelle, et leur disposition asymétrique permet une contrainte structurelle qui va favoriser la transformation du battement flagellaire en un mouvement de type hélicoïdal (8).

- d. Gaine mitochondriale : La gaine mitochondriale est une structure hélicoïdale dont la formation débute lors de la spermiogénèse (9). Chez l'humain onze à treize tours de mitochondries sont organisées en spirale autour de la pièce intermédiaire et forment une gaine qui va générer sous forme d'ATP (Adénosine triphosphate) une partie de l'énergie nécessaire à la mobilité spermatique via le processus de phosphorylation oxydative. Bien que l'importance de l'activité mitochondriale dans la fécondation, la gaine mitochondriale n'est pas l'unique pourvoyeur d'énergie du spermatozoïde, la gaine fibreuse remplissant également cette fonction (10).
- e. Gaine fibreuse : A l'image de la gaine mitochondriale qui enserre la pièce intermédiaire, la gaine fibreuse est une structure protéique qui entoure l'axonème et les fibres denses au niveau de la pièce principale. La gaine est structurée sous la forme d'un manchon composé de deux colonnes longitudinales reliées par des stries de fibres. Au-delà de son rôle mécanique essentiel à une mobilité spermatique normale(11), la gaine fibreuse possède également de nombreuses protéines impliquées dans les processus de signalisation du spermatozoïde, dont les plus abondantes sont les protéines AKAP4 et AKAP3 (A Kinase Anchoring Protein). Elle possède ainsi une fonction de production énergétique par génération d'ATP qui sera essentielle pour les processus de phosphorylation des protéines, de capacitation et d'hyperactivation flagellaire (11,12). Elle joue aussi un rôle de régulation des voies de signalisation via l'interaction des protéines AKAP avec d'autres protéines impliquées dans la physiologie spermatique et principalement les protéines kinases AMP-cycliques dépendantes (PKA). Les protéines AKAP interagissent également avec les protéines CABYR, SPA17, ROPN1L (Rhopilin Associated Tail Protein 1 Like), ROPN1. Plus récemment, les travaux de notre équipe ont aussi démontré une interaction des protéines AKAP avec FSIP2 (FibrousSheath Interaction Protein 2)(13).

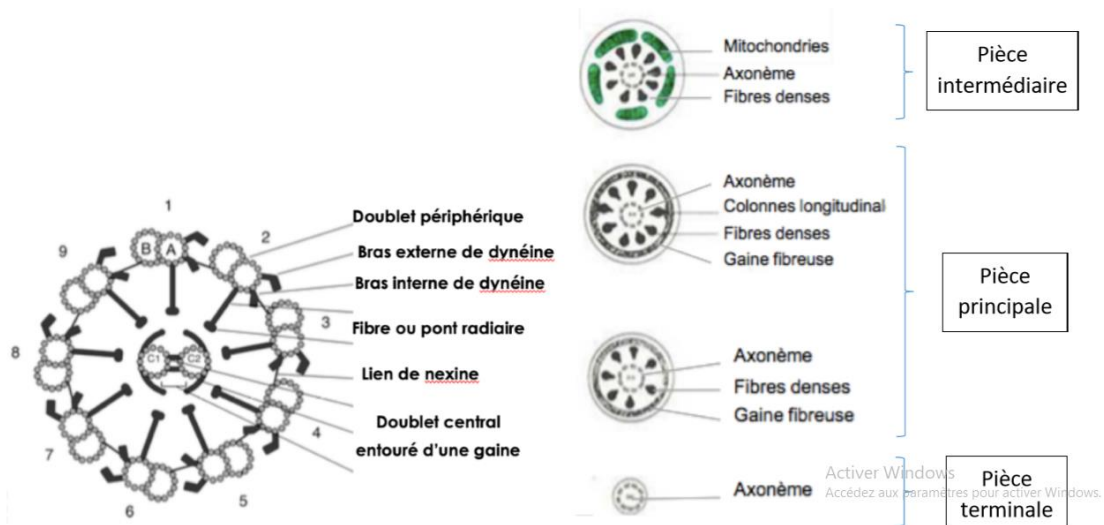


Figure 3: Axonème et structures péri-axonémales sur coupes transversales du flagelle.(1)

1.2. Spermatogénèse:

La spermatogénèse (figure 04) se déroule en trois phases comme suit :

- La phase de multiplication qui concerne les spermatogonies ces cellules diploïdes subissent une série de mitose dont le dernier abouti à la formation de spermatocytes primaire également diploïdes. Ce processus se fait à intervalle régulier de 13.5 jours chez le taureau.
- La phase de maturation au cours de laquelle les spermatocytes I entre en méiose engendrant des spermatocytes II qui à leur tour subissent une deuxième division qui aboutit à la formation de spermatides haploïde.
- La phase de différenciation (la spermiogénèse) durant laquelle les spermatides subissent divers remaniement cytoplasmique et se différencient en spermatozoïdes.

La durée de la spermatogénèse est d'environ 54 jours chez le taureau. La durée moyenne de transit dans l'épididyme est de 8 jours (14).

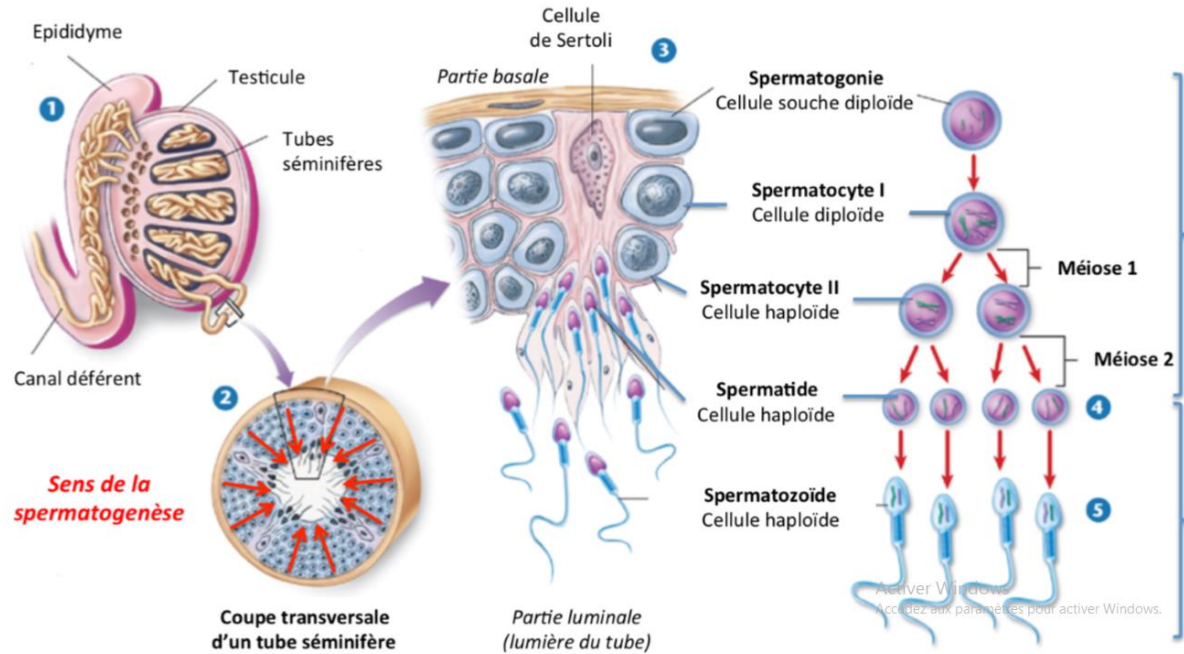


Figure 4: La spermatogenèse.(1)

2. Plasma séminal :

Les principales fonctions du plasma séminal (liquide séminal) sont hydrodynamiques et énergétique. Celui-ci étant essentiellement constitué d'eau, il permet le déplacement et la survie des spermatozoïdes dans le tractus génital de la femelle après l'éjaculation.

Les vésicules séminales sont les principales glandes annexes à l'origine de la sécrétion de fructose, principal substrat énergétique des spermatozoïdes. Les concentrations en fructose sont particulièrement élevées dans le plasma séminal du taureau et du bélier. La synthèse de fructose, comme beaucoup d'autres produits de sécrétion des glandes accessoires est étroitement régulée par les hormones androgènes. Les glandes vésiculaires produisent également de l'inositol et de l'acide citrique en quantité importante. L'acide citrique comme d'autres acides organiques présents dans le plasma séminal est aussi un substrat énergétique des spermatozoïdes. Chez le taureau, des concentrations élevées en sodium, potassium calcium et magnésium sont observées. Le pH alcalin des sécrétions des glandes vésiculaires est dû à une concentration importante en bicarbonates (15).

La prostate sécrète un liquide riche en élément minéraux, zinc principalement puis calcium, magnésium et potassium. Les sécrétions prostatiques contiennent de nombreuses protéines dont la plupart présentent une activité protéasique. Le pH du liquide prostatique est acide ; il contient de l'acide citrique et une protéine spécifique, la spermine, qui intervient dans les mécanismes de défense immunitaire. La prostate est également source de vésicules lipidiques qui peuvent transférer des lipides par fusion membranaire avec les spermatozoïdes (16).

Le principal composant de la sécrétion des glandes bulbo-urétrales est la sialomucine qui est responsable de la gélification de la semence après son émission. Les sécrétions des glandes bulbo-urétrales permettent de lubrifier le pénis et le vagin mais surtout de protéger l'urètre pénien des constituants délétères (ions, acides et bases) contenus dans les sécrétions prostatiques et les glandes vésiculaires. Elles contiendraient aussi des phéromones jouant un rôle dans l'attraction des femelles (17).

Les spermatozoïdes présents dans le liquide séminal entraînent la formation de nouveaux métabolites, comme l'acide lactique produit par la glycolyse anaérobie du fructose. Cependant, de nombreux composants présents dans le liquide séminal ne semblent pas jouer de rôle particulier, comme l'acide citrique, l'inositol, les ions zinc et de nombreuses protéinases et enzymes hydrolytiques. Ils contribuent cependant à rendre le liquide séminal iso-osmotique avec le plasma sanguin.

Les concentrations des différents constituants du plasma séminal du taureau sont présentées dans le *Tableau 1*.

Tableau 1 : Concentration des différents constituants du plasma séminal du taureau.(18)

Plasma séminal (PS)	Composition chez le taureau
Volume (ml)	2-10
Concentration en spermatozoïdes (10^6 /ml)	300-2
Sodium (Na^+) (mmol/ml)	65-161
Potassium (K^+) (mmol/ml)	13-97
Calcium (Ca^{2+}) (mmol/ml)	6-15
Magnésium (Mg^{2+}) (mmol/ml)	3.3
Chlorures (mmol/ml)	42-110
Phosphates (mmol/ml)	2.8
Bicarbonates (HCO_3^-) (mmol/ml)	7
Fructose (mmol/ml)	17-56
Sorbitol (mmol/ml)	0.6-7.5
Inositol (mmol/ml)	1.3-2.6
Acide Lactique (mmol/ml)	2.2-5.6
Acide Pyruvique (mmol/ml)	0.6
Acide Citrique (mmol/ml)	18-52
Acide Glutamique (mmol/ml)	1-8
Glycerophosphocholine (mmol/ml)	4-18
Acide Ascorbique (mmol/ml)	0.3
Glycerophosphoinositol (mmol/ml)	1.4
Spermine (mmol/ml)	0.1
Creatine (mmol/ml)	0.9
Arginine (mmol/ml)	0.2
Ergothionéine (mmol/ml)	Trace
Protéines (mg/ml)	55

CHAPITRE II : CAPACITATION.

Introduction:

Les spermatozoïdes des mammifères sont incapables de féconder l'ovule tant qu'ils n'ont pas subi un processus appelé "capacitation". Ce processus est induit par les sécrétions des voies génitales femelles dans lesquelles ils doivent séjourner quelques heures pour que cela s'accomplisse. La capacitation n'entraîne aucun changement morphologique. Elle consiste en l'enlèvement d'un facteur décapacitant, de nature vraisemblablement glycoprotéique, déposé à la surface du spermatozoïde lors de son transit épидидymaire. Ce facteur aurait pour fonction de stabiliser la membrane plasmique en interagissant avec les phospholipides membranaires.

1. Capacitation in vivo :

La capacitation est composée d'une série de modifications biologiques telles que des changements membranaires; lipidiques, au niveau de la charge nette, d'influx d'ions, de la fluidité membranaire, augmentation du métabolisme et d'enlèvement de facteurs anti-capacitants (figure 05) contenus dans le plasma séminal ou fixés au spermatozoïdes(19) lors de la traversé de la glaire cervicale, puis par l'action de certains actifs capacitants produits par le tractus génitale féminin.

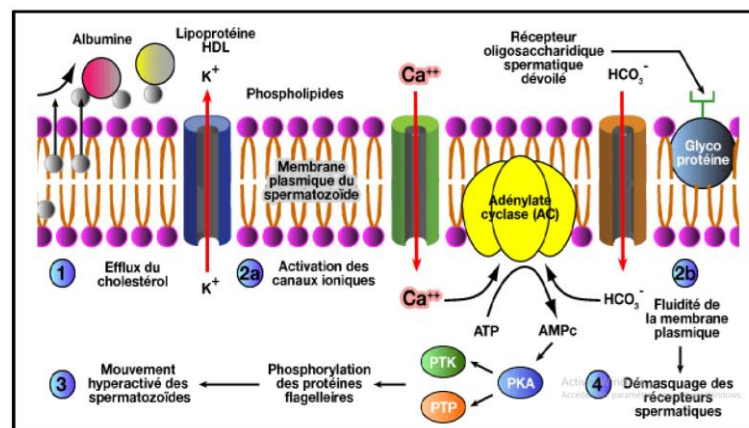


Figure 5: Résumé biochimique de la capacitation.(20)

1.1. Changements membranaires :

Les premières interactions plasma séminal-spermatozoïde-oviducte permettent d'abord la perte de facteurs anti-capacitants cette action entraîne également l'enlèvement de stérols à la surface de la membrane. Ce phénomène est associée à la présence d'accepteur de stérol dans le fluide de l'oviducte, particulièrement les lipoprotéines de haute densité (HDL) (19).

Un des facteurs anti-capacitant le plus caractérisés est sans aucun doute la famille des lieurs de spermatozoïdes, en anglais : « Binder of SPerm family » (BSP) préalablement connue comme Bovine Sperm Proteins (19). La présence de BSP et de ses homologues a été identifiée chez diverse espèces tel que le taureau, l'homme, le verrat, l'étalon, le bouc, le bélier et le bison et a comme rôle l'adsorption du cholestérol membranaire, la formation du réservoir de spermatozoïdes dans l'oviducte et la liaison avec l'épithélium de l'oviducte (21). Son mode d'action est d'abord de se lier à la choline des phospholipides pour ensuite être retiré suite à l'attachement à l'épithélium de l'oviducte (21).

D'après Langlais la perte de cholestérol engendre indirectement une diminution du ratio cholestérol sur phospholipides de la membrane des spermatozoïdes ce qui résulte d'une diminution de la charge nette négative de la membrane (22). Cette baisse du rapport cholestérol sur phospholipides entraîne un changement au niveau de la fluidité de la membrane augmentant la réorganisation des protéines au travers de celle-ci la rendant plus fluide et ainsi perméable (22) , engendrant un important flux d'ions, dont le calcium et le bicarbonate (21).

1.2. Efflux d'ions et potentiel de la membrane plasmique des spermatozoïdes :

Lorsque les spermatozoïdes épидидymaires sont entreposés dans la queue des épидидymes, ils baignent dans un milieu aqueux qui est riche en ions K^+ , mais qui possède peu d'ions Na et très peu de HCO_3^- . Pendant l'éjaculation, la concentration de ces ions change de façon radicale lorsque les spermatozoïdes entrent en contact avec le PS, puis ensuite avec les fluides du système reproducteur femelle. Les changements de la concentration des ions du milieu entraînent une modification de la concentration intracellulaire de plusieurs ions

chez les spermatozoïdes. Plus précisément, la concentration intracellulaire de K^+ diminue et celle du Na^+ et du HCO_3^- augmente de façon significative (23).

1.3. Calcium intra cellulaire :

La communication entre le spermatozoïde et son milieu se fait par échanges ioniques et cationiques au travers de différentes pompes à ions et transporteurs (24). Avec l'efflux de cholestérol, les canaux ioniques de calcium s'ouvrent et le calcium pénètre à l'intérieur du spermatozoïde (25). Le calcium serait également stocké dans des réservoirs de calcium au sein du spermatozoïde et ceux-ci s'ouvriraient lors de la capacitation (24).

Les responsables de l'influx de calcium extérieur seraient les canaux CatSper, les échangeurs Na^+/Ca^+ , la pompe à ATP pour Ca^{2+} ainsi que des nouveaux canaux. Tandis que les responsables pour la libération de calcium entreposé seraient les récepteurs inositol triphosphate (IP3), les récepteurs ryanodine, et les pompes à ATP (24).

Chez le bovin et la souris, la capacitation est accompagnée par une hyperpolarisation de la membrane plasmique qui est probablement causée par la variation de la concentration intracellulaire des ions, principalement à la diminution du K^+ et possiblement à l'augmentation du Ca^{2+} (26).

1.4. Bicarbonate et PH :

Bien des études démontrent que la capacitation est un phénomène dépendant de la présence du bicarbonate. A l'ovulation le PH des oviductes est alcalin la concentration en ion bicarbonates est à son paroxysme contrairement au plasma séminal ce qui favorise une pénétration massive du bicarbonate dans le spermatozoïde (27). L'augmentation de la charge d'ions négatifs (HCO_3^-) favorise une augmentation du pH interne (28).

1.5. Protéines kinases :

L'activation de l'adénylyl cyclase soluble par le bicarbonate résulte en la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Cette dernière stimule la protéine kinase A (dépendante de l'AMPC) ainsi que d'autres kinases telles que la kinase C (21). Ces dernières

vont engendrer une phosphorylation en résidus de tyrosine, sérine et thréonine de certaines protéines clés (29).

Plusieurs études démontrent la corrélation entre l'augmentation de la phosphorylation en résidu de tyrosine et l'aptitude d'un spermatozoïde à pouvoir féconder et ce chez plusieurs espèces (30).

Il a été démontré que l'utilisation d'analogues à l'AMP cyclique permet d'augmenter la phosphorylation des protéines en résidu de tyrosine. L'inverse est également vrai; l'ajout d'inhibiteurs d'AMP cyclique empêche la phosphorylation des protéines en milieu capacitant(31).

Cette voie est aussi responsable de l'hyperactivation des spermatozoïdes (31).

1.6. Capacitation et espèces réactives d'oxygène :

Les espèces réactives d'oxygène (ROS) possèdent un rôle déterminant chez les spermatozoïdes. Ils sont reconnus comme un joueur important de la phosphorylation des protéines et de l'enclenchement du processus de capacitation. L'addition de ROS exogène entraîne une augmentation de la phosphorylation des protéines en résidu de tyrosine tandis que l'addition d'inhibiteurs comme l'oxyde nitrique synthase ou de capteurs de ROS comme le superoxyde dismutase; empêche la capacitation (32).

Chez l'étalon, l'activité des ROS sur la capacitation fut beaucoup étudiée étant donné que leur ajout favorise la capacitation in vitro (33). Cependant, le processus par lequel les ROS agissent sur le spermatozoïde n'est pas encore complètement élucidé. L'hypothèse la plus courante est que les ROS permettraient de délier des facteurs anti-capacitants à la surface de la membrane (34).

L'oxyde nitrique est particulièrement identifiable durant la capacitation chez l'équin. Il a plusieurs rôles importants dans la fonction reproductive telle que dans la spermatogénèse, l'érection, la folliculogénèse et l'ovulation (33). Pour ce qui est de son rôle chez les spermatozoïdes, en forte concentration, elle affecte négativement la motilité et la viabilité du spermatozoïde tandis qu'en faible quantité elle améliore la motilité et la viabilité des spermatozoïdes postcongélation. De plus, l'utilisation d'inhibiteur d'oxyde nitrique, N-omega-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) diminue le taux de succès de la fécondation

in vitro chez le bovin (35). Les spermatozoïdes produisent en faible quantité de l'oxyde nitrique et que cette production contribue à aider à la capacitation (36).

2. Capacitation in vitro :

In vivo, la capacitation a lieu dans le tractus génital de la femelle. La majorité des études ayant pour but d'étudier ce phénomène ont été effectuées in vitro, étant donné qu'il est difficile d'étudier ce processus in vivo. La capacitation des spermatozoïdes est possible in vitro lorsqu'ils sont incubés dans un milieu de culture qu'on appelle «milieu capacitant». La capacitation des spermatozoïdes in vitro est dépendante de la température à laquelle les spermatozoïdes sont incubés (15). Chez la plupart des espèces, les spermatozoïdes peuvent être capités à des températures variant entre 37°C et 38°C. Le milieu capacitant a une composition qui permet de recréer un environnement qui s'apparente à celui retrouvé dans le tractus génital femelle. Il contient généralement une source d'énergie (glucose, pyruvate, lactate), du Ca^{2+} , du HCO_3^- , un facteur capacitant, tel l'héparine, ainsi qu'un accepteur de cholestérol, tel que l'albumine de sérum (15). La concentration de chacun des composants utilisés dans le milieu capacitant varie selon l'espèce.

L'albumine de sérum habituellement l'albumine de sérum bovin (BSA) est un composant important du milieu capacitant utilisé pour les expériences de capacitation in vitro des spermatozoïdes de souris, de rat, d'hamster, de bovin ainsi que d'humain et sert d'accepteur du cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes (37). La BSA peut être remplacée dans des expériences de capacitation in vitro par d'autres accepteurs de cholestérol, tels que les lipoprotéines de haute densité (38) et par la β -cyclodextrine (39).

3. Facteurs capacitants présents dans le tractus génital femelle :

Les fluides oviductal et folliculaire possèdent des éléments qui sont nécessaires pour induire la capacitation. Ils contiennent les ions nécessaires à la capacitation (Ca^{2+} , HCO_3^- , K^+) et plusieurs facteurs capacitants qui diffèrent selon les espèces. Il a été démontré que les spermatozoïdes éjaculés deviennent capités après avoir été en contact avec du fluide

oviductal ou folliculaire. Deux groupes prédominants de facteurs capacitants sont retrouvés au niveau du tractus génital femelle bovin les glycosaminoglycans (GAGs) semblables à l'héparine, tels que l'héparane sulfate et la chondroïtine sulfate ainsi que les accepteurs de cholestérol tels les HDL (40).

Les GAGs sont de longues chaînes de polysaccharides qui sont habituellement attachés à un corps protéique, formant ainsi les protéoglycans (41). Les GAGs sont composés d'unités de disaccharides qui sont répétées. L'un des deux résidus est toujours un sucre aminé (N-acétylglucosamine), et au moins un des deux sucres est chargé négativement à cause de la présence de groupements carboxyle ou sulfate. Chez la vache, la concentration totale des GAGs du fluide varie selon les différentes parties du tractus génital femelle et selon le cycle œstral. En effet, la concentration est de 34 mg/100 mg de protéines au niveau du col de l'utérus, 20 mg/100 mg de protéines au niveau de l'utérus et de 9 mg/100 mg de protéines au niveau des oviductes (42). La concentration de chondroïtine sulfate et de GAGs semblables à l'héparine est plus élevée dans le mucus cervical de la vache qui est en œstrus.

Chez l'espèce bovine, l'héparine (qui est un GAG utilisé pour la capacitation in vitro) et les GAGs (héparane sulfate et chondroïtine sulfate) qui sont présents dans le tractus génital femelle jouent un rôle très important dans la capacitation des spermatozoïdes. En effet, l'héparine induit in vitro la capacitation des spermatozoïdes d'humain (43), de bovin (44), de cheval (45) et de bison (46). Chez le bovin, la capacitation des spermatozoïdes éjaculés bovins peut être induite in vitro en 9 h lorsqu'ils sont incubés avec les GAGs isolés du fluide folliculaire bovin ou avec l'héparine, et en 22 h pour des spermatozoïdes épидидyrmaires (47). Les GAGs qui sont les plus sulfatés possèdent un pouvoir inducteur de la capacitation plus grand que ceux qui sont moins sulfatés. Ainsi, l'héparine (30% de sulfatation) est le meilleur GAG inducteur de la capacitation (47).

Les HDL sont retrouvés dans le tractus génital femelle et sont la seule classe de lipoprotéines présente dans les fluides oviductal et folliculaire bovin, porcin et humain. Les HDL ont la capacité de capter le cholestérol de la membrane des spermatozoïdes et sont impliqués dans l'efflux de cholestérol observé pendant la capacitation des spermatozoïdes. L'incubation des spermatozoïdes bovins avec du fluide oviductal pendant 2h cause un transfert net de 25% du cholestérol de la membrane plasmique des spermatozoïdes vers les HDL (48).

4. Évaluation de la capacitation des spermatozoïdes:

Des techniques basées sur l'observation de l'intégrité de l'acrosome ont été développées pour évaluer la capacitation des spermatozoïdes. La population de spermatozoïdes qui a été incubée dans un milieu capacitant possède toujours un petit nombre de spermatozoïdes qui a subi la réaction de l'acrosome et ils sont considérés comme des spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome spontanément(49). La réaction de l'acrosome peut être induite chez des spermatozoïdes capités par divers agents naturels, tel que la zone pellucide solubilisée (50) ou par des agents pharmacologiques, tel que l'ionophore calcique A23187 (51). Ainsi, afin d'évaluer le % de spermatozoïdes capités, il faut soustraire le % de spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome spontanément au % de spermatozoïdes ayant subi la réaction de l'acrosome induite par un agent.

L'intégrité de l'acrosome est observée grâce à la coloration au chlortétracycline (CTC). L'antibiotique CTC est un composé fluorescent qui permet d'obtenir différents patrons qui dépendent du statut acrosomal et de la capacitation des spermatozoïdes. Le CTC entre dans les compartiments intracellulaires qui contiennent beaucoup de Ca^{2+} . Sous forme d'anion, il lie le Ca^{2+} ce qui le rend plus fluorescent (52). Le complexe CTC- Ca^{2+} lie de façon préférentielle les régions hydrophobiques de la membrane cellulaire, créant les différents patrons observés chez les spermatozoïdes.

D'autres méthodes sont employées pour évaluer l'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes porcins, comme l'utilisation de lectines fluorescentes telle que PSA-fITC (Agglutinine *Pisum sativum* couplé à la fluorescéine) «Fluorescein labeled *Pisum sativum* agglutinin» (37), ou encore l'utilisation d'une triple coloration (53).

4.1. Hyperactivation du mouvement flagellaire :

Le mouvement hyperactif est déterminant pour la progression du spermatozoïde dans le tractus génital féminin mais aussi au sein du complexe cumulo-ovocytaire afin de pouvoir pénétrer la zone pellucide et féconder l'ovocyte (54) à travers :

- Le développement des forces nécessaires pour détacher des spermatozoïdes ayant adhéré au revêtement épithélial.

- La facilitation des échanges des métabolites et des autres facteurs stimulants par une agitation du fluide réalisant le microenvironnement local du spermatozoïde.
- La prévention du piégeage des spermatozoïdes dans les portions étroites et contournées du tractus par une migration facilitée.
- L'augmentation de la probabilité de rencontre avec le complexe cumulus-ovocyte par un volume balayé plus important.
- La pénétration au travers de la masse du cumulus et de la zone pellucide par une poussée accrue au niveau de la tête du spermatozoïde.

Il existe deux types d'hyperactivation du spermatozoïde : progressive et non progressive.

Le mouvement hyperactif non progressif décrit un trajet qualifié classiquement « en étoile » et ne s'exprime que de manière transitoire pour un spermatozoïde donné, entre des phases où le mouvement est progressif.

La particularité de ce mouvement est une grande vélocité, associée à des mouvements céphaliques latéraux de Grande amplitude, et à des mouvements flagellaires importants et asymétriques, cette mobilité hyperactive semble faciliter le détachement des spermatozoïdes de l'épithélium tubaire et la pénétration ultérieure de la zone pellucide, Notons que seuls les spermatozoïdes capités pourront pénétrer le complexe cumulo-ovocytaire en conservant un acrosome intact.

Des systèmes d'analyse vidéomicrographique (système CASA pour computer sperm analysis) permettent une mesure automatisée, rapide, fine et objective de cette mobilité spermatique, un logiciel permet de retracer la trajectoire suivie par la tête des spermatozoïdes (figure 06) (55) .

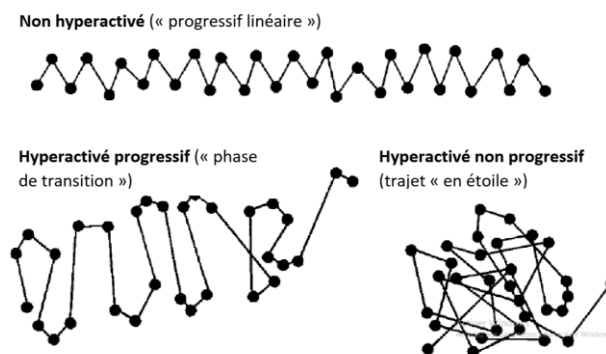


Figure 6: Trajectoires de spermatozoïdes capités mobiles non hyperactivés et hyperactivés.(1)

5. Analyse Informatique du Sperme (CASA: Computerzed Assisted Sperm Analysis) :

Le système est composé d'un microscope optique à contraste de phase négatif relié à un logiciel informatique par l'intermédiaire d'une caméra permettant la digitalisation des images, c'est-à-dire la transformation des images capturées par la caméra en images numériques (56).

Cette méthode informatisée permet d'obtenir des informations objectives et précises sur la proportion de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement (57).

Les paramètres pouvant être calculés avec cette technique sont nombreux : la mobilité massale et individuelle, les mouvements lents, moyens et rapides, la fréquence des battements des flagelles. Ainsi, les spermatozoïdes ayant déjà effectué leur capacitation sont reconnus à leur mouvement hyperactif.

Cette méthode permet l'analyse d'un grand nombre de spermatozoïdes en un temps limité.

Cependant, cette méthode coûte chère et elle nécessite une standardisation des appareils Avant leur utilisation.

Il calcule plusieurs paramètres de mobilité à savoir :

* la motilité totale TMOT : ce paramètre représente le pourcentage des gamètes qui bougent indépendamment de leur qualité de mouvement par rapport à la population totale.

*le pourcentage des spermatozoïdes progressifs (PMOT) : ce paramètre inclut tous les spermatozoïdes ayant une VAP < 50 µm/seconde et une linéarité (VSL/VAP) supérieure à 75%.

*le pourcentage des spermatozoïdes statiques : il représente tous les spermatozoïdes qui ne bougent pas pendant l'analyse.

*les mouvements rapides, moyens et lents des spermatozoïdes.

* les différentes vitesses de progression (figure 07) :

- VCL (Velocity Curvilinear) : cette vitesse prend en considération la totalité de la distance (point par point) parcourue par le spermatozoïde pour un temps donné.

-VSL (Velocity Straight Line) : cette vitesse prend en considération, pour un temps donné, les points de départ et d'arrivée sur spermatozoïdes, indépendamment de son trajet.

-VAP (Velocity Average Pathway):cette vitesse correspond à la VCL, mais après lissage de son trajet.

-ALH : (Amplitude of Lateral Head displacement) : ce paramètre correspond à la distance, en μm balayé par la tête des spermatozoïdes durant le mouvement de battement.

-BCF : (Beat Cross Frequency) il mesure en Hz la fréquence de battement de la tête des spermatozoïdes en mouvement (nombre de battement par unité de temps).

-LIN : (Linearity) ou linéarité du chemin curviligne, définie comme le rapport VSL/VCL .

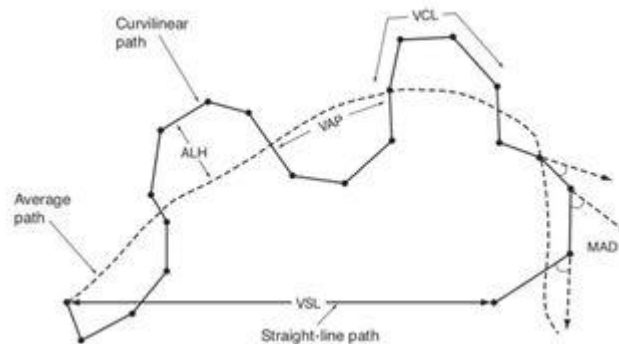


Figure 7 : Terminologies standards des variables cinétiques mesurées par les systèmes CASA.(1)

6. Sélection et capacitation des spermatozoïdes :

La sélection des spermatozoïdes peut être réalisée in vitro par différentes méthodes. Cette sélection permet d'enrichir la préparation en spermatozoïdes mobiles et normaux et d'optimiser ainsi les chances de fécondation.

6.1. Migration ascendante:

Le principe de cette méthode repose sur la capacité des spermatozoïdes les plus mobiles de traverser, depuis le fond du tube vers la partie supérieure, un milieu capacitant, ce milieu comporte de l'albumine, protéine de captation du cholestérol; du pyruvate, substrat énergétique, et du glucose. Cette méthode de sélection présente les avantages d'être facile à réaliser et permet l'obtention d'une fraction pure enrichie en spermatozoïdes mobiles toutes fois, les spermatozoïdes présentant un défaut de condensation de la chromatine ne sont pas éliminés, le rendement obtenu est également moindre qu'avec la méthode de sélection par gradient de densité, Ainsi, Cette approche est réservée aux spermatozoïdes normaux avec une forte mobilité progressive (58).

6.2. Gradient de densité:

Le principe de cette méthode repose sur la capacité des spermatozoïdes les plus mobiles et normaux à migrer aux travers d'un gradient de macromolécules. Ce milieu contient de la silice recouverte de silane et dont l'osmolarité est ajustée avec des polysucres. Il présente l'avantage d'être peu toxique, après centrifugation, le gradient présente plusieurs phases les phases supérieures contiennent le plasma séminal, les cellules rondes et les spermatozoïdes morts ou anormaux, les spermatozoïdes les plus normaux morphologiquement sont dans le culot (59).

6.3. Gradient de Percoll :

Différentes techniques sont utilisées pour la préparation du sperme pour les procréations médicalement assistés. Parmi elles, la migration ascendante est utilisée en routine par de nombreux laboratoires de biologie de la reproduction. Cependant, cette technique ne permet pas d'obtenir un nombre suffisant de spermatozoïdes lorsque l'oligoasthénospermie est importante. La centrifugation sur gradient de Percoll discontinu a permis d'améliorer les succès de la fécondation in-vitro (60). Cette technique est actuellement utilisée surtout en cas d'asthénospermie ou de leucospermie importante. Elle permet d'obtenir une bonne concentration en spermatozoïdes à morphologie normale et de bonne mobilité.

PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODE.

1. Lieu de l'expérimentation :

Notre expérimentation a eu lieu au niveau de la Plateforme Biotechnologique en Reproduction des carnivores (PBRC) de l'Université de Blida -1-.

2. Matériel :

2.1. Matériel biologique et milieux :

- Milieux de dilution « EasyBuffer A » :

L'EasyBuffer A, fabriqué par IMV Technologies, est une solution utilisée dans le domaine de la reproduction animale, en particulier pour le traitement et la conservation des échantillons de sperme. Cette solution est spécifiquement conçue pour améliorer la qualité et la survie des spermatozoïdes lors de la manipulation, du transport et de la congélation.

L'EasyBuffer A (figure 08) contient des ingrédients qui fournissent un environnement optimal pour les spermatozoïdes, leur permettant de maintenir leur viabilité et leur fonctionnalité. Les composants de la solution sont généralement des sels, des tampons, des agents protecteurs et des nutriments, soigneusement équilibrés pour préserver les spermatozoïdes pendant les différentes étapes de traitement.

Cette solution est utilisée pour diluer le sperme avant la congélation ou pour préparer des échantillons pour des procédures de laboratoire spécifiques, telles que la sélection de spermatozoïdes ou la préparation pour l'insémination artificielle.



Figure 8 : Flacon d'Easy buffer A.

- Milieu de base « Solution Stock pour capacitation -Minitube- » :

La société Minitube propose des solutions prêtes à l'emploi spécifiquement conçues pour la capacitation des spermatozoïdes bovins. Leur solution stock, connue sous le nom de "Solution de Capacitation Minitube" (figure 09), est une préparation optimisée pour favoriser la capacitation efficace des spermatozoïdes, formulée avec des ingrédients spécifiques qui contribuent à la survie et à la fonction des spermatozoïdes pendant l'incubation.

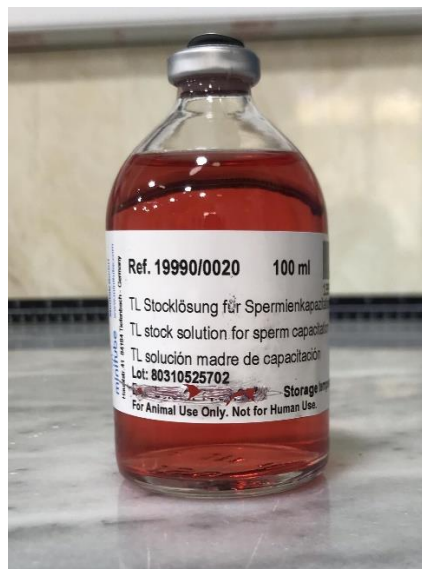


Figure 9 : Solution stock pour capacitation.

- Enrichissement « Fluide Folliculaire » :

Le Fluide Folliculaire (figure 10) a été prélevé dans le cadre d'une étude ultérieure.

Il nous servira d'enrichissement à notre milieu de base (le Stock Minitube) à différentes concentrations 0%, 10%, 50%.



Figure 10 : Fluide folliculaire.

- Semence :

Notre expérimentation a été réalisée sur de la semence congelée de bovin conservée dans de l'azote liquide. Le Tableau 2 ci-dessous regroupe les références des paillettes (figure 11) qui ont été utilisées.

Tableau 2 : Références des paillettes utilisées.

CNIAAG : Centre National d'Insémination Artificiel et d'Amélioration Génétique.

N° de paillettes	Lieu de production	Date de production	Numéro de lot	Race	Nom du taureau
1	CNIAAG	03 /11/2022	2672	Montbéliard (Monb)	JUCKER
2	CNIAAG	20/11/2022	378.8966.828	Fleckvieh (FLECKVIE)	SERUUS
3	CNIAAG	26/11/2016	2921404700	Holstein (Hol PN)	JETSKY
4	CNIAAG	25/05/2021	2921404700	Holstein (Hol PN)	JETSKY

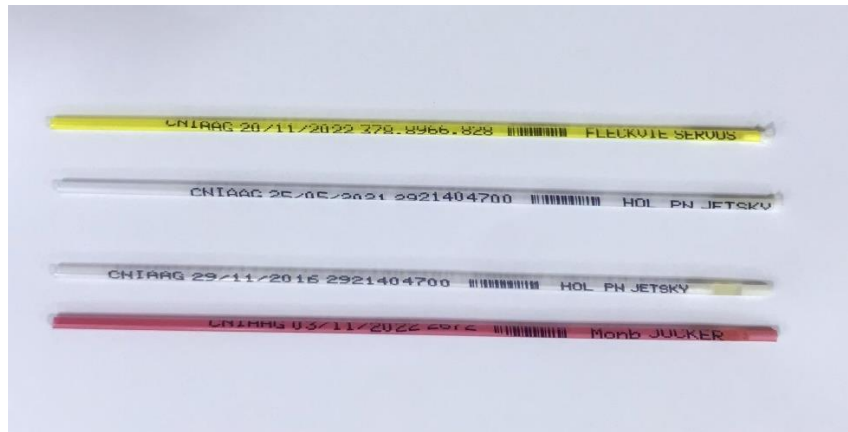


Figure 11 : Paillettes de semence utilisées lors de l'expérimentation.

2.2. Matériel d'analyse de la semence :

- Spermogramme (CASA: Computerzed Assisted Sperm Analysis) :

Le système CASA Hamilton Thorn IVOS II (figure 12) offre une analyse précise et objective des spermatozoïdes à l'aide d'une caméra haute résolution et d'un logiciel spécialisé. Il permet de mesurer différents paramètres du sperme, tels que la concentration des spermatozoïdes, leur mobilité, leur vitesse, leur morphologie et d'autres caractéristiques essentielles.



Figure 12: Système CASA Hamilton Thorn IVOS II.

2.3. Matériel de laboratoire :

- Micropipettes et embouts :

Les micropipettes (figure 13) sont de fines pipettes utilisées pour prélever et transférer des volumes très précis de liquides. Nous avons à disposition des embouts à usage unique en plastique.



Figure 13 : Micropipettes.

- Microtubes :

Les microtubes (figure 14), sont des petits récipients cylindriques utilisés pour stocker, transporter et manipuler de petits volumes de liquides ou d'échantillons biologiques. Ils sont munis de couvercles étanches qui assurent la fermeture hermétique du tube pour prévenir les fuites, la contamination et l'évaporation.

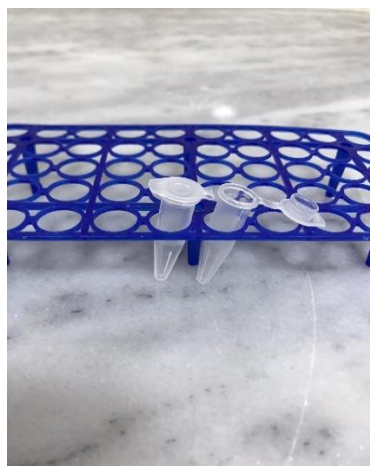


Figure 14 : Microtubes.

- Tube à essai :

Les tubes à essai (figure 15) sont des récipients cylindriques faciles à manier, leur transparence facilite l'observation des différents changements macroscopique au court de l'expérimentation, tels que la formation d'un culot et d'un surnagent.

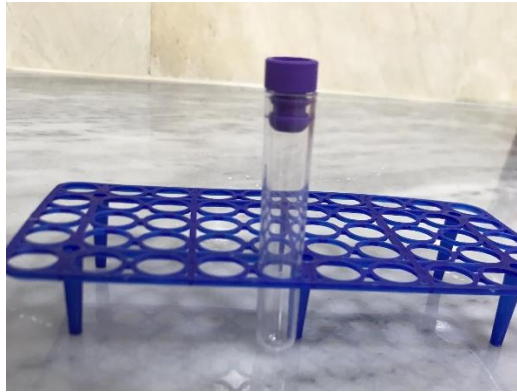


Figure 15 : Tube à essai.

- Centrifugeuse :

La centrifugeuse (figure 16) est utilisée en laboratoire pour séparer les différents composants d'un échantillon en fonction de leur densité ou de leur masse. Elles fonctionnent selon le principe de la force centrifuge, qui provoque la séparation des substances en les soumettant à une accélération radiale élevée.



Figure 16 : Centrifugeuse.

- Bain-marie :

Le bain-marie de laboratoire (figure 17) est un appareil utilisé pour chauffer ou maintenir une température constante des échantillons ou des milieux utilisés dans le cadre de cette expérience, l'eau sera chauffée à 56°C qui est la température optimale pour le maintien du Fluide Folliculaire.



Figure 17 : Bain-marie.

- Platine chauffante :

Platine chauffante (figure 18) est un appareil utilisé en laboratoire pour maintenir une température constante et contrôlée dans des récipients contenant des échantillons liquides. Il sera réglé à 37°C.



Figure 18 : Platine chauffante.

- Vortex :

Le vortex (figure 19) est un appareil de laboratoire utilisé pour agiter et mélanger des échantillons liquides. Il est principalement composé d'une base stable sur laquelle repose un support vertical avec une tête de mélange constituée d'un plateau circulaire en caoutchouc qui permet de fixer les tubes à essai ou les récipients contenant les échantillons. Lorsque le vortex est activé, le plateau effectue un mouvement de rotation rapide et irrégulier, créant ainsi une agitation vigoureuse dans les échantillons.



Figure 19 : Vortex.

- Décongélateur à paillettes :

Le décongélateur à paillettes (figure 20) est une sorte de mini bain-marie cylindrique adapté à la taille des paillettes qui ne sera pas complètement submergé car l'eau est spermicide. Ce dernier est maintien la température de l'eau à 37°C ce qui fait en sorte que lorsque la paillette y est plongée à l'intérieur les spermatozoïdes subissent une décongélation optimal.

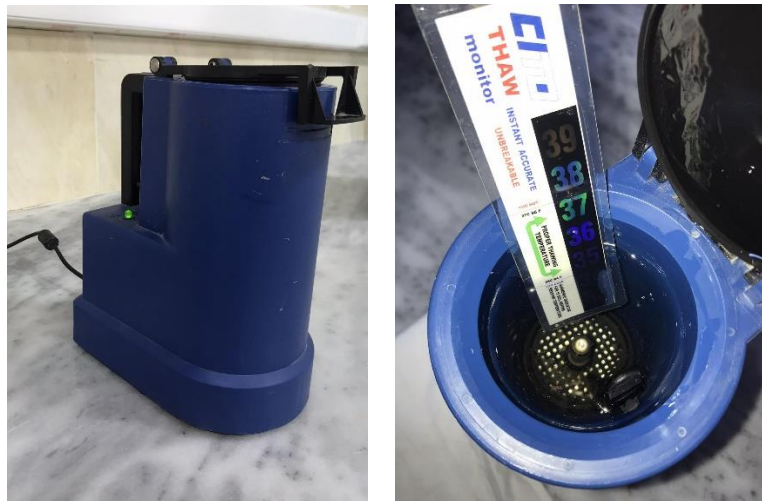


Figure 20 : Décongélateur à paillettes.

3. Méthode :

3.1. Préparation du fluide folliculaire :

- Récolte d'ovaires sur des carcasses bovines au niveau des abattoirs.
- Les ovaires sont de suite plongés dans de l'eau bouillante.
- Transport de ces derniers vers le laboratoire dans une boîte en plastique pleine de solution saline isotonique stérile à une concentration de 0.9% d'NaCl.
- Désinfection du poste de travail avant et après chaque manipulation.
- Lavage des ovaires avec une solution saline stérile (NaCl 0.9%), puis désinfection avec de l'alcool 70° à l'aide d'une compresse stérile.
- Ponctions des follicules d'un diamètre de plus de 5mm à l'aide d'une aiguille (18G) monté sur une seringue rempli au préalable avec 0.5 ml de PBS (phosphate Buffered Saline) ou de milieu de rinçage des ovocytes MOFA.
- Le liquide obtenu est mis dans des tubes secs puis centrifuger à 2000t/min pendant 10min (figure 21), le surnagent récolté et centrifugé de la même manier, le 2^{ème} surnagent est prélevé et mis dans des tubes puis conservé à -20°C.
- Le jour de l'expérimentation le tube est retiré du congélateur puis plongé dans un bain-marie à 52°C pendants 30min (figure 22A), ensuite le fluide folliculaire est distribué de manier équitable sur 4 microtubes (figure 22B) puis centrifugé selon les même procédé à fin de l'utilisé dans nos milieux.



Figure 21 : Paramétrage de la centrifugeuse.

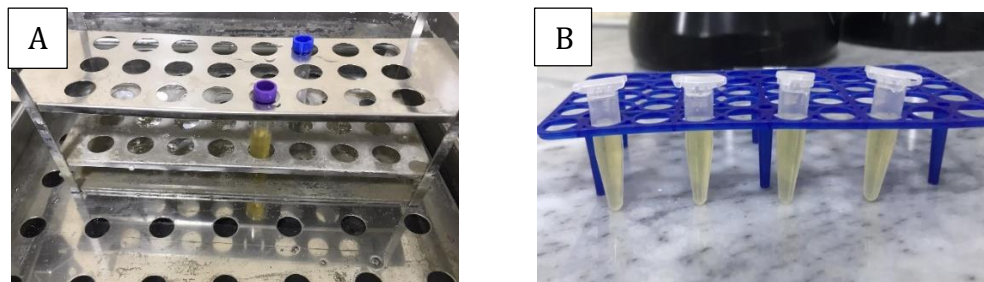


Figure 22 : Etapes de préparation du fluide folliculaire à l'utilisation.
 A : Décongélation du fluide folliculaire.
 B : répartition du fluide folliculaire sur 4 microtubes à parts égales.

3.2. Préparation des milieux :

Dans notre expérimentation nous aurons besoin de 4 milieux différent.

- 1- Solution de dilution pour effectuer une analyse classique au spermogramme qui est constitué de 360 μ l d'Easy Buffer A (par analyse) contenue dans un microtube déjà identifié.
- 2- Solution mère pour les milieux de culture **M1** constituée de 1ml de solution Stock (figure 23A), cette dernière n'est pas enrichie au fluide folliculaire (0%). Grace à une micropipette on en pipette 360 μ l que l'on déverse dans des microtubes qui ont été préalablement identifié.
- 3- Solution mère pour les milieux de culture **M2** constituée de 900 μ l de solution Stock et enrichie avec 100 μ l de fluide folliculaire (10%). On en pipette 360 μ l que l'on déverse dans des microtubes qui ont été préalablement identifié.
- 4- Solution mère pour milieux de culture **M3** constituée de 500 μ l de solution Stock enrichie avec 500 μ l de fluide folliculaire (50%). On en pipette 360 μ l que l'on déverse dans des microtubes qui ont été préalablement identifié (figure 23).

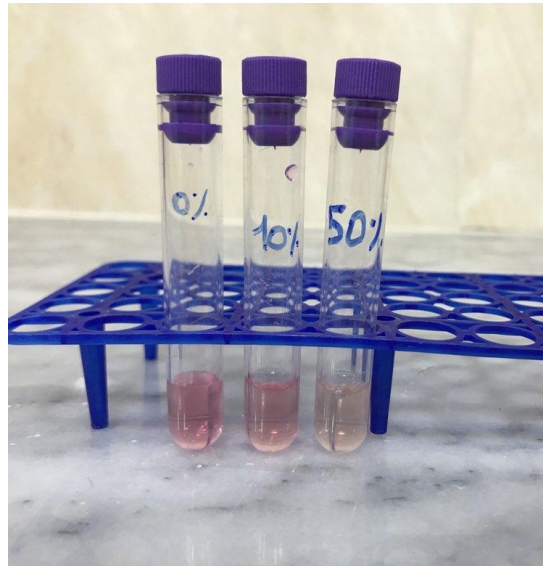


Figure 23 : Milieux M1, M2, M3.

-Chacun des tubes ont été mélangés avec un vortex (figure 24B) 10sec pour homogéniser les échantillons.

La quantité des solutions mères suffisent pour effectuer 2 essais par jour. De nouvelles sont préparée chaque nouveau jour d'essai.

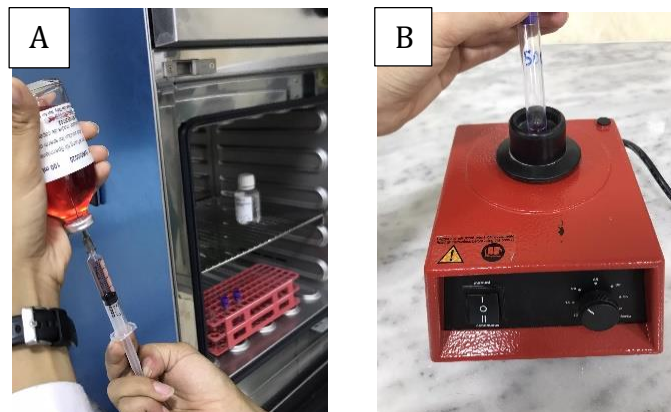


Figure 24 : Etapes de préparation des milieux.

A : Aspiration d'une quantité suffisante de solution Stock.
B : Agitation des tubes à l'aide d'un vortex après adition des 2 milieux.

3.3. Préparation de la semence :

3.3.1. Conservation :

Les paillettes de semence bovine ont été conservées dans un BT d'azote liquide jaugé (figure 25) et remis à niveau d'une façon régulière pour maintenir la semence dans des conditions de conservation optimum.



Figure 25 : Conservation des paillettes.

3.3.2. Décongélation :

Les paillettes sont retirées individuellement du BT puis plonger directement de leur extrémité soudée dans un décongélateur rempli d'eau maintenue à 37°C (figure 26B), après un bain de 30sec la paillette est retirée puis séchée à l'aide d'un papier absorbant (figure 25C).

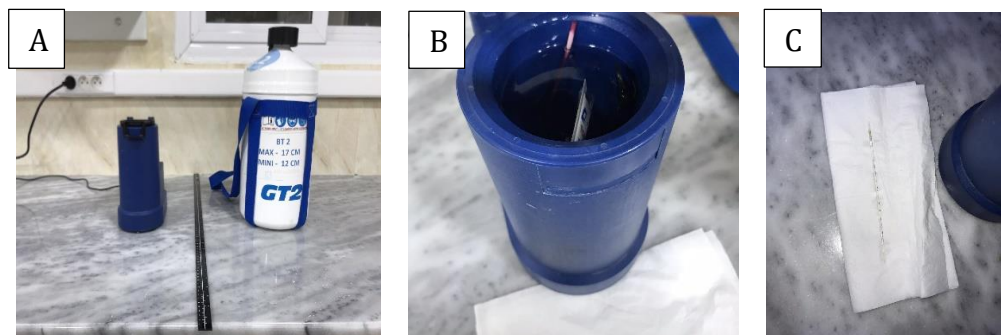


Figure 25: Décongélation des paillettes.

A : Poste de décongélation.

B : Paillette immergée dans une eau à 37°C.

C : Séchage d'une paillette à l'aide d'un papier absorbant.

3.3.3. Extraction de la semence :

Après séchage, à l'aide d'une paire de ciseau on rompt la partie soudée (figure 27B) pour permettre au sperme de s'échapper. On utilise alors un mandrin de pistolet d'insémination (figure 27C) qu'on insert au niveau de l'extrémité bouchée par du coton, puis on pousse et

on déverse le sperme dans un microtube qui se trouvait déjà dans un des fausses du bain-marie à platine chauffante (37°C).

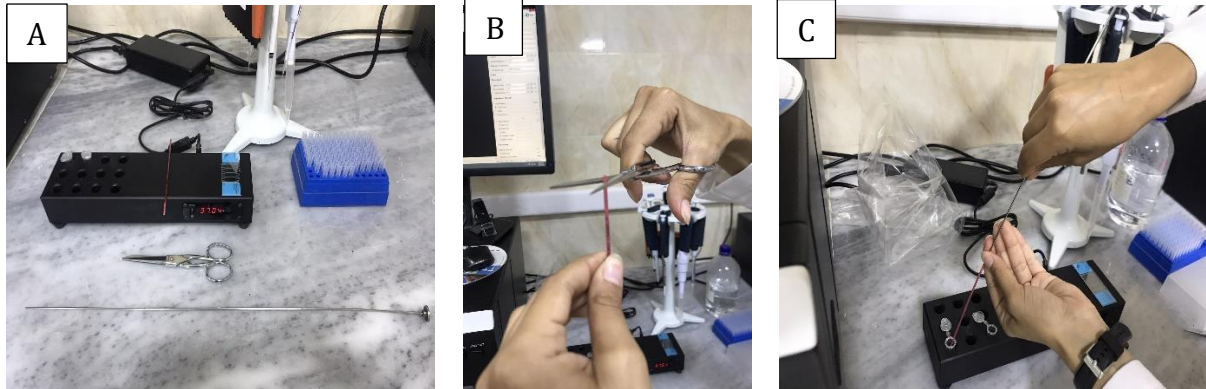


Figure 26 : Etapes d'extraction de la semence après décongélation de la paillette.

A : Poste d'extraction de la semence.

B : Ouverture de la paillette grâce à une paire de ciseaux.

C : Déversement du sperme dans un microtube.

3.3.4. Analyse préliminaire :

-On pipette 40 μ l de semence pure que l'on rajoute au 360 μ l d'Easy Buffer puis on mélange le tout 10sec à l'aide pour homogénéiser l'échantillon.

-On en prend 3 μ l que l'on injecte dans l'une des 4 chambres (A, B, C ou D) de la lame Leja (figure 27), le mélange est aspiré par capillarité et diffuse d'une façon homogène dans la chambre.

- On lance l'analyse et on récolte les résultats (voir Annexe 1).



Figure 27: Remplissage d'une chambre de la lame LEJA avec de la semence diluée.

3.3.5. Mise en incubation :

Après avoir pris 360 μ l de chaque milieux et les avoir mis dans des microtubes différent tous bien identifiés (figure 28) selon la composition du milieu et le numéro de l'essai, on y rajoute dans chacun 40 μ l de sperme. On incube le tout dans une étuve à 37°c dans laquelle on a rajouté un récipient avec un fond d'eau à température.



Figure 28: Echantillons en incubation.

3.3.6. Analyse post-incubation :

4 temps d'analyse au CASA post-incubation sont effectués à 2h d'intervalle sur chacun des microtubes et 30min d'intervalle entre le 1er et le 2ème essai de la journée, les données sont ainsi récoltées à chaque fois.

Pour déterminer que les spermatozoïdes ont été hyperactivés nous nous sommes basés sur des paramètres de référence prédéterminés par Mortimer (1998) (61).

La figure 29 démontre le cliché individuel d'un spermatozoïde hyperactif post incubation.

En somme les spermatozoïdes ont été incubés dans des milieux à différentes concentrations de fluide folliculaire allant de 0%, 10% à 50% sur une durée qui frôle les 9h.

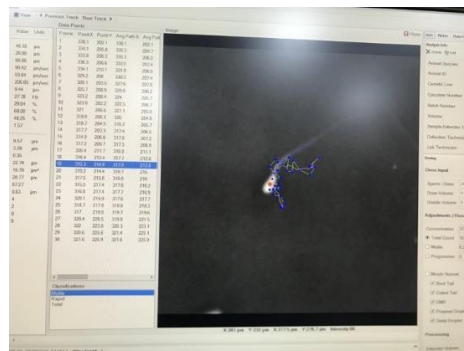


Figure 29 : Cliché individuel d'un spermatozoïde après incubation.

CHAPITRE II : PRESENTATION DES RESULTAT.

1. Essai N°01 :

Tableau 3: Résultat de l'essai N°01.

Essai N°01									
Observation	Milieux	Motilité					Cinématique		
T0	analyse préliminaire	Nb Total	%Statique	%Progressif	%Mobile	%Lent	VCL (µm/s)	ALH (µm)	LIN %
		203	93,10	3,90	6,90	0,00	243,45	11,20	48,85
T1	M1	177	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	370	98,90	1,10	1,10	0,00	164,00	6,02	58,99
	M3	270	98,60	1,40	1,40	0,00	163,28	6,56	65,21
T2	M1	133	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	233	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M3	283	99,30	0,40	0,70	0,00	152,76	10,18	35,54
T3	M1	93	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	40	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M3	283	99,30	0,00	0,70	0,40	136,53	6,53	24,08
T4	M1	367	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	266	99,60	0,00	0,40	0,40	95,34	10,12	6,11
	M3	219	99,50	0,00	0,50	0,50	62,38	2,99	13,24

- **Analyse préliminaire :**

Les résultats de l'analyse préliminaire (Tableau 03) démontrent que la paillette N° 01 présente un taux de spermatozoïdes avec une mobilité fléchante (Progressifs) de 3.90% et 6.90% de mobile.

Les paramètres cinétiques qui atteignent les normes d'une semence hyperactivé avec une VCL à 243.45µm/sec une ALH à 11.20µm et une LIN à 48.85% sachant que les valeurs références d'après Mortimer (1998) sont : VCL > 150µm/sec ; ALH > 07µm ; LIN < 50% (61).

- **Résultats après mise en incubation :**

Suite à la mise en incubation, l'essai N°01 atteint encore une fois les valeurs d'une semence hyperactivé durant le T2 en milieu M3, soit après 4h d'incubation et dans un milieu avec une concentration de 50% en fluide folliculaire, présentent une

VCL=152,76 μ m/sec ; ALH=10.18 μ m ; LIN=35.54% ; pour des valeurs de référence de VCL > 150 μ m/sec ; ALH > 07 μ m ; LIN < 50%.

2. Essai N°02.

Tableau 4 : Résultat de l'essai N° 02.

Essai N° 02

Observation	Milieux	Motilité					Cinématique		
		Nb Total	%Statique	%Progressif	%Mobile	%Lent	VCL (μ m/s)	ALH (μ m)	LIN %
T0	analyse préliminaire	167	80,80	12,00	19,20	1,80	234,93	10,05	46,51
		M1	264	97,30	0,80	2,70	0,80	141,32	6,26
T1	M2	357	90,50	4,80	9,50	2,50	151,34	7,75	49,24
	M3	334	95,50	3,00	4,50	0,60	225,24	11,43	40,65
T2	M1	293	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	209	94,70	2,90	5,30	1,40	141,50	7,28	48,69
	M3	89	95,50	4,50	4,50	0,00	141,71	6,57	59,68
T3	M1	139	97,80	0,00	2,20	2,20	187,36	9,40	2,91
	M2	212	93,90	3,30	6,10	1,90	154,67	8,30	35,77
	M3	72	86,10	2,80	13,90	4,20	107,55	5,46	50,28
T4	M1	297	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	229	96,90	1,70	3,10	0,40	140,66	8,60	42,61
	M3	197	97,50	1,00	2,50	0,00	130,52	6,84	47,31

- **Analyse préliminaire :**

Les résultats de l'analyse préliminaire (Tableau 04) démontrent que la paille N° 02 présente un taux de spermatozoïdes progressifs de 12% et 19.20% de mobile.

Les paramètres cinétiques qui atteignent les normes d'une semence hyperactivée avec une VCL à 234,93 μ m/sec une ALH à 10.05 μ m et une LIN à 46,51% sachant que les valeurs références d'après Mortimer(1988) sont : VCL > 150 μ m/sec ; ALH > 07 μ m ; LIN < 50% (61).

- **Résultats après mise en incubation :**

Suite à la mise en incubation, l'essai N°02 présente des signes d'hyperactivation durant le **T1** et le **T3** pour les deux milieux **M1**, **M2** et **M3**.

- Milieu **M1** : Après 6h d'incubation (**T3**) dans un milieu de base (solution Stock) qui n'est pas enrichie en fluide folliculaire un pourcentage infime de spermatozoïdes ont survécu soit

2.20% ces dernier ont subi une hyperactivation en atteignant une VCL=187.36 μ m/sec ; ALH=940 μ m ; LIN=2,91%.

- Milieu **M2** : la semence subit une légère hyperactivation après 2h d'incubation (**T1**) dans un milieu enrichie à 10% soit des valeurs qui avoisinent les seuils de référence avec une VCL=151,34 μ m/sec ; ALH=7.75 μ m ; LIN=49.24%. Ces derniers augmente légèrement après avoir séjournés 4h de plus dans l'étuve pour atteindre VCL=154,67 μ m/sec ; ALH=8,30 μ m ; LIN=35,75%.
- Milieu **M3** : Suite à une incubation de 2h (**T1**) dans un milieu concentré à 50% en fluide folliculaire la semence présente des signe d'hyperactivation avec une VCL=225,24 μ m/sec ; ALH=11,43 ; LIN=40,65%. En revanche pour cette essaie le milieu **M3** ne montrera plus de signe d'hyperactivation avec l'allongement de la durée d'incubation.

3. Essai N°03.

Tableau 5 : Résultat de l'essai N°03.

Essai N° 03									
Observation	Milieux	Motilité					Cinématique		
T0	analyse préliminaire	Nb Total	%Statique	%Progressif	%Mobile	%Lent	VCL (μ m/s)	ALH (μ m)	LIN %
		183	81,50	15,00	18,50	0,50	273,68	10,62	43,24
T1	M1	176	84,70	9,70	15,30	1,70	164,43	7,02	44,91
	M2	125	80,00	14,40	20,00	1,60	189,67	8,10	46,34
	M3	144	73,60	18,10	26,40	6,30	181,11	8,20	46,81
T2	M1	87	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	209	92,80	4,80	7,20	0,50	197,05	9,41	40,72
	M3	81	72,80	21	27,20	3,70	164,01	6,69	50,98
T3	M1	134	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	189	95,80	1,60	4,20	1,60	122,42	6,20	37,56
	M3	147	84,40	6,10	15,60	3,40	141,78	7,06	41,52
T4	M1	271	91,10	0,00	8,90	8,90	17,21	0,99	73,22
	M2	104	98,10	0,00	1,90	1,90	17,29	1,00	47,55
	M3	139	91,40	1,40	8,60	4,30	96,48	4,97	32,11

- **Analyse préliminaire :**

Les résultats de l'analyse préliminaire (Tableau 05) démontrent que la paillette N°03 présente un taux de spermatozoïdes progressifs de 15% et 18.50% de mobile.

Les paramètres cinétiques qui atteignent les normes d'une semence hyperactivée avec une VCL à 273,68 $\mu\text{m}/\text{sec}$ une ALH à 10.62 μm et une LIN à 43,24% sachant que les valeurs références d'après Mortimer (1998) sont : VCL > 150 $\mu\text{m}/\text{sec}$; ALH > 07 μm ; LIN < 50% (61).

• **Résultats après mise en incubation :**

Suite à la mise en incubation, l'essai N°03 présentes des signes d'hyperactivation durant le **T1** en milieu **M1** ; **M2** et **M3** puis en **T2** uniquement avec le milieu **M2**.

- Le milieu **M1** (0% de FF) en **T1** soit après 2h d'incubation démontre des signe d'hyperactivation avec une VCL=164,43 $\mu\text{m}/\text{sec}$; ALH=7,02 μm ; LIN=44,91%.
- Pour les milieux **M2** (10%) et **M3** (50%) eux deux présente des résultats sensiblement ressemblants ; avec pour le **M2** une VCL=189,67 $\mu\text{m}/\text{sec}$; ALH=8,10 μm ; LIN=46,34% et pour le **M3** une VCL=181,11 $\mu\text{m}/\text{sec}$; ALH=8,20 μm ; LIN=46,81%.
- Pour les milieux **M1** et **M3** les valeurs n'ont pas évoluées positivement dans le temps sauf pour le milieu **M2** qui a été enrichi à 10% de FF après avoir prolongé l'incubation de 2h supplémentaire soit en **T2** (4h) nous avons obtenu les résultats suivant : VCL=197,05 $\mu\text{m}/\text{sec}$; ALH=9,41 μm ; LIN=40,72% qui sont des résultats qui rentre dans les normes d'une semence hyperactivé selon Mortimer (1998) (61) .

4. Essai N°04.

Tableau 6 : Résultat de l'essai N°04.

Essaie N° 04									
Observation	Milieux	Motilité					Cinématique		
T0	annalyse préliminaire	Nb Total	%Statique	%Progressif	%Mobile	%Lent	VCL (µm/s)	ALH (µm)	LIN %
		301	96,30	1,00	3,70	0,70	197,64	10,23	31,86
T1	M1	108	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	131	93,90	0,80	6,10	3,80	81,33	4,93	55,74
	M3	125	95,20	0,80	4,80	2,40	67,26	4,72	50,76
T2	M1	169	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	140	97,90	0,00	2,10	2,10	14,88	0,84	50,79
	M3	226	98,20	0,00	1,80	1,80	17,31	1,27	52,21
T3	M1	223	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	115	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M3	138	98,60	0,00	1,40	1,40	80,39	4,92	5,51
T4	M1	141	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M2	318	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	M3	70	100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

- **Analyse préliminaire :**

Les résultats de l'analyse préliminaire (Tableau 06) démontrent que la paillette N°04 présente un taux faible de spermatozoïdes progressifs soit 1% et 3,70% de mobile.

Les paramètres cinétiques qui atteignent les normes d'une semence hyperactivée avec une VCL à 197,64µm/sec une ALH à 10,23µm et une LIN à 31.86% sachant que les valeurs références d'après Mortimer (1998) sont : VCL > 150µm/sec ; ALH > 07µm ; LIN < 50% (61).

- **Résultat après mise en incubation :**

Suite à une mise en incubation de la semence dans des milieux avec différentes concentrations en fluide folliculaire (0% ; 10% ; 50%) et des observations à intervalle régulier de 2h entre chacune d'elles, aucun des milieux ne démontre des signes d'hyperactivation.

- Dès la première observation à **T1** (2h) en **M1** (0%) tous les spermatozoïdes ont perdu leurs motricité et affichent des paramètres cinétiques qui sont tous à 0.00 ; pareil en **T2** (4h).

- Pour le **T3** (6h) il n'y a que les spermatozoïdes incubés en **M3** (50% de FF) qui démontrent des signes de vie.
- Par contre lorsque l'on pousse l'incubation au **T4** soit à plus de 8H à 37°C dans les différents milieux **M1** ; **M2** et **M3** les analyses démontrent qu'aucun des milieux ne contient des spermatozoïdes mobile, ces derniers affichent des paramètres de mobilité et cinétique tous égale à 0.00.

CHAPITRE III : Discussion

Les résultats de nos essais démontrent une large variation dans la mobilité spermatique, les valeurs de mobilité représentent le pourcentage de spermatozoïdes progressivement mobiles et des paramètres cinétique représenté par la VCL l'ALH et la LIN.

Comme exposé dans les tableaux 03, 04, 05 et 06 le pourcentage de spermatozoïdes avec une mobilité dite fléchante (Progressif) baisse dès les premiers heurs d'incubation comme l'explique McNutt (1991) et al. Le fluide folliculaire bovin (FF) a eu un effet significativement négatif sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles pendant les 6 heures d'incubation. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles était significativement plus élevé dans les témoins négatifs MTM (Modified Tyrode's Medium) et positifs MTM-H (Modified Tyrode's Medium-Heparine) que dans les traitements contenant des concentrations de FF de 20% ou plus. Les valeurs de mobilité pour les spermatozoïdes témoins et les spermatozoïdes traités avec 5% et 10% de FF n'étaient pas différentes. Les concentrations de FF étaient négativement corrélées à la mobilité des spermatozoïdes selon un schéma dépendant de la dose (62).

En comparaison avec nos résultats le témoin négatif composé uniquement de la solution Stock pour capacitation affiche des valeurs de mobilité nettement plus basses en comparaisant avec celles des analyses préliminaires des semences et celles des deux autres milieux supplémenté à 10 et 50% de FF.

Toujours d'après McNutt (1991) et al. par rapport aux témoins, ils ont observé une influence bénéfique à la fois du fluide oviductal non lutéal et lutéal sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, bien que le fluide oviductal non lutéal maintienne un pourcentage plus élevé de spermatozoïdes mobiles au fil du temps que le fluide oviductal lutéal. Dès 2 heures, le fluide oviductal non lutéal a maintenu un pourcentage plus élevé de spermatozoïdes mobiles que le fluide oviductal lutéal, et cette tendance s'est maintenue tout au long des 6 heures d'incubation restantes (62).

Concernant le temps d'incubation Parrish (1988) a prouvé que si les spermatozoïdes été incubé dans des milieux supplémenté en héparine durant 4h les spermatozoïdes été capacité et donc la durée de mise en contact des spermatozoïdes et des ovocytes dans le but d'avoir une fécondation été considérablement réduite (63).

Dans notre cas la semence après incubation a démontrée des signes d'hyperactivation conforme au norme imposé par Mortimer 1998 qui sont une VCL >150 $\mu\text{m}/\text{sec}$ une LIN<50% et une ALHmax>7.0 μm dès le **T1** soit les 2 premiers heures post incubation les résultats se sont même améliorés dans certains cas au **T2** comme pour l'essai N°01 et 03 avec le milieu **M3** enrichie à 50% en FF soit après 4h d'incubation et au **T3** pour l'essai N°02 avec les milieux **M1** à 10% et **M2** à 50% suite à une incubation de 6h à 37°C(61).

Pour ce qui est du reste des résultats obtenue au **T3** et au **T4** qui ne cesse de baissé et qui atteint même des valeurs nulles, cela pourrait être imputé à l'épuisement du substrat énergétique car comme en le remarque les valeurs pour le **M2** à 10% de FF s'annulent plus tôt que pour celles du **M3** qui lui contient plus de FF donc plus d'élément nutritifs.

En revanche pour l'essai N°04 les résultats ne démontre aucun signe d'hyperactivation ce que l'on pourrait imputer à la mauvaise qualité de la semence utilisée pour ce dernier qui présente un pourcentage de spermatozoïdes progressif de 1% ce qui est considéré comme le résultat le plus faible quand on compare avec les résultats de l'analyse préliminaire des 3 autres essais.

CHAPITRE IV : Conclusion

En conclusion les différents essais démontre que le Fluide Follicule apporte réellement des avantages en termes de viabilité des spermatozoïdes. Cette amélioration de la viabilité peut être attribuée à la présence d'éléments nutritifs dans le FF, qui fournissent les ressources nécessaires aux spermatozoïdes pour maintenir leur fonctionnalité et leur survie.

De plus en se basant sur l'évolution des paramètres cinétique tout au long de l'incubation le FF semble favoriser l'hyperactivation des spermatozoïdes, ce qui est essentiel pour leur capacité à féconder un ovule.

CHAPITRE V : RECOMMANDATION

Nous recommandons, pour des études futures, d'envisager des améliorations concernant les milieux de culture afin d'optimiser divers aspects tels que le temps d'incubation, la qualité de la semence et la viabilité des spermatozoïdes. Nous suggérons d'ajouter les éléments suivants :

- L'héparine (Glycosaminoglycanes) en raison de ses propriétés d'accepteur de cholestérol.
- Du bicarbonate pour son effet alcalinisant sur le milieu.
- Du calcium pour optimiser l'hyperactivation du mouvement flagellaire.
- Des antioxydants tels que la vitamine E ou la vitamine C afin de réduire le stress oxydatif.
- Du pyruvate qui servira de substrat énergétique facilement assimilable par les spermatozoïdes.

Il est également recommandé d'utiliser un équipement approprié, comme une étuve à dioxyde de carbone (CO₂), pour assurer une incubation optimale des spermatozoïdes. De plus, il convient de combiner cet équipement avec d'autres outils d'analyse de la semence, tels que la cytométrie en flux, afin de réduire les marges d'erreur et de surmonter les limites imposées par le système CASA.

Il est essentiel de sélectionner des paillettes de semence de bonne qualité, avec un pourcentage élevé de spermatozoïdes mobiles, pour les essais. De plus, il est recommandé de travailler sur le contrôle des différentes étapes du processus de production de la semence bovine. En complément, l'utilisation de méthodes de sélection des spermatozoïdes, comme la technique du Swim Up, peut permettre d'enrichir les milieux de culture avec des spermatozoïdes mobiles.

REFERENCES

1. Post L. Validation de méthode du CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Hamilton Thorne CEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de spermologie. 11 oct 2019.
2. Braun RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet.* mai 2001;28(1):10-2.
3. Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldan ERS. Sperm design and sperm function. *Biol Lett.* 22 juin 2006;2(2):246-9.
4. Ponce RH, Urch UA, Yanagimachi R. Inhibition of sperm-egg fusion in the hamster and mouse by carbohydrates. *Zygote.* août 1994;2(3):253-62.
5. Ferrer M, Rodriguez H, Zara L, Yu Y, Xu W, Oko R. MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization. *Cell Tissue Res.* 1 sept 2012;349(3):881-95.
6. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature.* avr 2014;508(7497):483-7.
7. Gibbons IR. Downloaded from jcb.rupress.org on August 28, 2017.
8. Oko R. Comparative Analysis of Proteins from the Fibrous Sheath and Outer Dense Fibers of Rat Spermatozoa. *Biol Reprod.* 1 août 1988;39(1):169-82.
9. Phillips DM. Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J Ultrastruct Res.* févr 1977;58(2):144-54.
10. Narisawa S, Hecht NB, Goldberg E, Boatright KM, Reed JC, Millán JL. Testis-Specific Cytochrome *c* -Null Mice Produce Functional Sperm but Undergo Early Testicular Atrophy. *Mol Cell Biol.* 1 août 2002;22(15):5554-62.
11. Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 1 mai 2003;61(1):103-15.
12. Burgos C, Maldonado C, Gerez De Burgos NM, Aoki A, Blanco A. Intracellular Localization of the Testicular and Sperm-Specific Lactate Dehydrogenase Isozyme C4 in Mice. *Biol Reprod.* 1 juill 1995;53(1):84-92.
13. Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD, Eddy EM. Targeted Disruption of the Akap4 Gene Causes Defects in Sperm Flagellum and Motility. *Dev Biol.* 15 août 2002;248(2):331-42.
14. Hochereau MT, Courrot M, Ortavant R, Buré C, Boivineau L, de FONTAUBERT Y. MARQUAGE DES CELLULES GERMINALES DU BÉLIER ET DU TAUREAU PAR INJECTION DE THYMIDINE

TRITIÉE DANS L'ARTÈRE SPERMATIQUE. *Ann Biol Anim Biochim Biophys.* 1964;4(2):157-61.

15. Knobil, E. et Neill, J. D. *The Physiology of Reproduction* Raven Press. New York, 1988.
16. Dacheux, Françoise et Dacheux, J. L. *L'épididyme et les glandes annexes.* 2001.
17. Setchell, B. P. Male reproductive organs and semen. *Reproduction in domestic animals*, vol. 4, p. 221-249,1991.
18. Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol.* 1 juill 2008;52(5-6):463-72.
19. Bailey JL. Factors Regulating Sperm Capacitation. *Syst Biol Reprod Med.* oct 2010;56(5):334-48.
20. Zekraoui N. Intérêt des paramètres cinétiques spermatiques (CASA) liée à l'hyperactivation des spermatozoides après capacitation in vitro. 2020.
21. Langlais J, Kan FWK, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete Res.* juin 1988;20(2):185-201.
22. Manjunath P, Sairam MR. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J.* 1 févr 1987;241(3):685-92.
23. Visconti, P. E., D. Krapf, J. L. de la Vega-Beltran, J. J. Acevedo et A. Darszon. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl.* 13: 395-405.
24. Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. Intracellular Calcium Accumulation and Responsiveness to Progesterone in Capacitating Human Spermatozoa. *J Androl.* 1991;12(5):323-30.
25. Meizel S, Turner KO. Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of previously capacitated hamster sperm. *J Exp Zool.* janv 1986;237(1):137-9.
26. Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez JM, et al. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology.* janv 2005;63(2):514-35.
27. Handrow RR, First NL, Parrish JJ. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool.* nov 1989;252(2):174-82.
28. Leclerc P, Kopf GS. Evidence for the Role of Heterotrimeric Guanine Nucleotide-Binding Regulatory Proteins in the Regulation of the Mouse Sperm Adenylyl Cyclase by the Egg's Zona Pellucida. *J Androl.* 1999;20(1):126-34.
29. Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci.* 3 déc 2001;68(3):249-65.

30. Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MAM, Robben TJAA, Strik AM, et al. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci.* 2 mars 2004;101(9):2993-8.
31. Travert C, Carreau S, Galeraud-Denis I. La capacitation in vitro. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* juin 2009;37(6):523-8.
32. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. *J Androl.* 2000;21(6):895-902.
33. Pons-Rejraji H, Sion B, Saez F, Brugnon F, Janny L, Grizard G. Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* juin 2009;37(6):529-35.
34. Leal ACMS, Caldas-Bussiere MC, Carvalho CSPD, Viana KS, Quirino CR. Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced in vitro capacitation. *Anim Reprod Sci.* nov 2009;116(1-2):38-49.
35. Perez Martinez S, Viggiano M, Franchi A, Herrero M, Ortiz M, Gimeno M, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovum transport and oviductal smooth muscle activity in the rat oviduct. *Reproduction.* 1 janv 2000;118(1):111-7.
36. Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol.* 28 avr 2003;1(1):39.
37. Cross NL. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation1. *Biol Reprod.* 1 juill 1998;59(1):7-11.
38. Thérien I, Soubeyrand S, Manjunath P. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Modulate Sperm Capacitation by High-Density Lipoprotein1. *Biol Reprod.* 1 nov 1997;57(5):1080-8.
39. Choi YH, Toyoda Y. Cyclodextrin Removes Cholesterol from Mouse Sperm and Induces Capacitation in a Protein-Free Medium1. *Biol Reprod.* 1 déc 1998;59(6):1328-33.
40. Lenz RW, Ax RL, Grimek HJ, First NL. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 juin 1982;106(4):1092-8.
41. Ax RL, Lenz RW. Glycosaminoglycans as Probes to Monitor Differences in Fertility of Bulls. *J Dairy Sci.* juill 1987;70(7):1477-86.
42. Lee CN, Ax RL. Concentrations and Composition of Glycosaminoglycans in the Female Bovine Reproductive Tract. *J Dairy Sci.* sept 1984;67(9):2006-9.
43. Valencia A, Wens MA, Merchant H, Reyes R, Delgado NM. Capacitation of human spermatozoa by heparin. *Arch Androl.* 1 janv 1984;12 Suppl:109-13.
44. Lane ME, Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Heparin and High-Density Lipoprotein Mediate Bovine Sperm Capacitation by Different Mechanisms1. *Biol Reprod.* 1 janv 1999;60(1):169-75.

45. Varner DD, Bowen JA, Johnson L. Effect of Heparin on Capacitation/Acrosome Reaction of Equine Sperm. *Arch Androl.* janv 1993;31(3):199-207.
46. Chauhan MS, Singla SK, Manik RS, Madan ML. Increased capacitation of buffalo sperm by heparin as confirmed by electron microscopy and in vitro fertilization. *Indian J Exp Biol.* 1 oct 1997;35(10):1038-43.
47. Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.* 31 août 1982;107(4):1326-32.
48. Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev.* févr 1990;25(2):195-204.
49. Berger T, Turner KO, Meizel S, Hedrick JL. Zona Pellucida-Induced Acrosome Reaction in Boar Sperm. *Biol Reprod.* 1 mars 1989;40(3):525-30.
50. Aitken RJ, Ross A, Hargreave T, Richardson D, Best F. Analysis of Human Sperm Function Following Exposure to the Ionophore A23187: Comparison of Normospermic and Oligozoospermic Men. *J Androl.* 10 sept 1984;5(5):321-9.
51. Tsien RY. Chapter 5 Fluorescent Indicators of Ion Concentrations. In: *Methods in Cell Biology* [Internet]. Elsevier; 1989 [cité 11 juin 2023]. p. 127-56.
52. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* nov 1986;15(3):213-26.
53. Talbot P, Summers RG, Hylander BL, Keough EM, Franklin LE. The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A23187. *J Exp Zool.* 1976;198(3):383-92.
54. Mortimer S, Horst GD, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J Androl.* 2015;17(4):545.
55. Oehninger S. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 1 mars 2000;6(2):160-8.
56. Mortimer ST. CASA—Practical Aspects. *J Androl.* 2000;21(4):515-24.
57. Martínez AIP. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci.* juill 2004;82-83:209-24.
58. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol.* 14 nov 2003;1(1):108.
59. De Mateo S, Ramos L, van der Vlag J, de Boer P, Oliva R. Improvement in chromatin maturity of human spermatozoa selected through density gradient centrifugation. *Int J Androl.* juin 2011;34(3):256-67.
60. Guérin JF, Mathieu C, Lornage J, Pinatel MC, Bouliou D. Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa in an IVF programme by selection on discontinuous Percoll gradients. *Hum Reprod.* oct 1989;4(7):798-804.

61. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. Hum Reprod. 1 août 1998;13(8):2139-46.
62. McNUTT TL, Killian GJ. Influence of Bovine Follicular and Oviduct Fluids on Sperm Capacitation In Vitro. J Androl. 1991;12(4):244-52.
63. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin1. Biol Reprod. 1 juin 1988;38(5):1171-80.

ANNEXE 01

Animal species: Bull.Frozen Mini.str
 Animal ID: JETSKY
 Genetic Line: CNIAAG 29.11.2016
 Ejaculate number: 001 HOL PN
 Batch number: 2921404700
 Analysis Date: 7/18/2022 22:9:59

University of Blida 1 / ALGERIA

Carnivore Reproductive
 Biotechnologies Platform

Quality Control Report

**Motility**

	Count	Sample M	Concentration M/ml	Percent Of Total
Total	189	13	55.08	100
Static	154	10	44.88	81.50
Progressive	29	2	8.45	15.30
Motile	35	2	10.20	18.50
Slow	1	0	0.29	0.50

Morph

	Count	Sample M	Concentration M/ml	Percent Of Total
Bent Tail	5	0	1.46	2.60
Coiled Tail	2	0	0.58	1.10
DMR	3	0	0.87	1.60
Distal Droplet	8	1	2.33	4.20
Proximal Droplet	34	2	9.91	18
Normal Fraction:			74.60	%

Kinematics

VCL Curvilinear velocity (um/s):	273.68	LIN % :	43.24
VAP Average path velocity(um/s):	137.21	WOB % :	50.73
VSL Straightline velocity (um/s):	116.30	ALH (um):	10.62
STR % :	84.53	BCF (Hz) :	29.78

ABSTRACT

Title : Highlithing indications of capacitation of bovine spermatozoa using CASA system after culture.

LITERATURE REVIEW

Introduction:

Mammalian spermatozoa are unable to fertilize the egg until they undergo a process called "capacitation." This process is induced by secretions from the female genital tract, where the spermatozoa must reside for several hours for it to occur. Capacitation does not involve any morphological changes but rather the removal of a decapacitating factor, likely a glycoprotein, deposited on the surface of the spermatozoa during their epididymal transit. This factor is believed to stabilize the plasma membrane by interacting with the membrane phospholipids.

1. In vitro Capacitation:

In vivo, capacitation takes place in the female genital tract. The majority of studies aiming to investigate this phenomenon have been conducted in vitro since studying this process in vivo is challenging. Spermatozoa capacitation is possible in vitro when they are incubated in a culture medium called "capacitating medium." In vitro spermatozoa capacitation depends on the temperature at which spermatozoa are incubated. In most species, spermatozoa can be capacitated at temperatures ranging between 37°C and 38°C. The capacitating medium has a composition that recreates an environment similar to that found in the female genital tract. It usually contains an energy source (glucose, pyruvate, lactate), Ca²⁺, HCO₃⁻, a capacitating factor such as heparin, and a cholesterol acceptor, such as serum albumin. The concentration of each component used in the capacitating medium varies depending on the species.

2. Capacitating Factors Present in the Female Genital Tract:

The oviductal and follicular fluids contain elements that are necessary to induce capacitation. They contain ions necessary for capacitation (Ca^{2+} , HCO_3^- , K^+) and several capacitating factors that vary among species. It has been demonstrated that ejaculated spermatozoa become capacitated after contact with oviductal or follicular fluid. Two predominant groups of capacitating factors are found in the bovine female genital tract: glycosaminoglycans (GAGs) similar to heparin, such as heparan sulfate and chondroitin sulfate, and cholesterol acceptors such as HDL.

3. Hyperactivation of Flagellar Movement:

Hyperactive movement is crucial for the progression of spermatozoa in the female genital tract and within the cumulus-oocyte complex in order to penetrate the zona pellucida and fertilize the oocyte.

There are two types of spermatozoa hyperactivation: progressive and non-progressive. Non-progressive hyperactive movement describes a trajectory that is typically characterized as "star-like" and is transient for a given spermatozoon, occurring between phases of progressive movement. The characteristic of this movement is high velocity, associated with large lateral head movements and significant asymmetrical flagellar movements. This hyperactive mobility appears to facilitate detachment of spermatozoa from the tubal epithelium and subsequent penetration of the zona pellucida. It is worth noting that only capacitated spermatozoa can penetrate the cumulus-oocyte complex while retaining an intact acrosome. Videomicrographic analysis systems (Computer-Assisted Sperm Analysis, CASA) enable automated, rapid, precise, and objective measurement of sperm mobility. Software allows the tracing of the trajectory followed by the spermatozoa head.

4. Computerized Assisted Sperm Analysis (CASA):

The system consists of a negative phase contrast optical microscope connected to computer software through a camera, allowing the digitization of images, which means transforming the images captured by the camera into digital images. This computerized method provides objective and precise information about the proportion of motile spermatozoa and their movement. Numerous parameters can be calculated using this technique, including total motility, individual motility, slow, medium, and fast movements, and flagellar beat

frequency. Capacitated spermatozoa are recognized by their hyperactive movement. This method allows the analysis of a large number of spermatozoa in a limited time. However, this method is expensive and requires standardization of the equipment before use. It calculates several mobility parameters, including:

- Static spermatozoa: represents all spermatozoa that do not move during the analysis.
- Fast, medium, and slow movements of spermatozoa.
- Different progression velocities :
- Velocity Curvilinear (VCL): considers the total distance (point by point) traveled by the spermatozoon within a given time.
- Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH): represents the distance, in μm , covered by the head of the spermatozoon during the beating movement.
- Linearity (LIN): defined as the linearity of the curvilinear path, calculated as the ratio of VSL to VCL.

MATERIALS AND METHODS

1. Semen analysis equipment:

- Spermogram (CASA: Computerized Assisted Sperm Analysis):

The CASA system Hamilton Thorn IVOS II provides precise and objective analysis of sperm using a high-resolution camera and specialized software. It allows for the measurement of various sperm parameters, such as sperm concentration, motility, velocity, morphology, and other essential characteristics.

2. Preparation of media:

In our experiment, we will need four different media.

1- Dilution solution for performing a conventional spermogram analysis, consisting of 360 μl of Easy Buffer A (per analysis) contained in a pre-labeled microtube.

2- Mother solution for M1 culture media, consisting of 1ml of Stock solution (Figure 23A), which is not enriched with follicular fluid (0%). Using a micropipette, transfer 360µl of this solution into pre-labeled microtubes.

3- Mother solution for M2 culture media, consisting of 900µl of Stock solution enriched with 100µl of follicular fluid (10%). Transfer 360µl of this solution into pre-labeled microtubes.

4- Mother solution for M3 culture media, consisting of 500µl of Stock solution enriched with 500µl of follicular fluid (50%). Transfer 360µl of this solution into pre-labeled microtubes.

- Each tube was vortexed for 10 seconds to homogenize the mixture.

The amount of mother solution is sufficient for conducting 2 tests per day. New solutions are prepared each testing day.

3. Incubation:

After taking 360µl of each medium and transferring them into separate, properly labeled microtubes, based on the medium composition and trial number, add 40µl of sperm to each tube. Incubate the tubes in a 37°C incubator, with a container of water at the bottom to maintain the temperature.

4. Analysis :

Post-incubation CASA analysis is performed on each of the microtubes at 2-hour intervals.

PRESENTATION OF RESULTS AND DISCUSSION

The results of our experiments demonstrate a wide variation in sperm mobility, with mobility values representing the percentage of progressively mobile sperm and kinetic parameters represented by VCL, ALH, and LIN.

As shown in Tables 03, 04, 05, and 06, the percentage of sperm with progressive mobility decreases in the early hours of incubation, as explained by McNutt (1991) et al. Bovine follicular fluid (FF) had a significantly negative effect on the percentage of mobile sperm

during the 6-hour incubation period. The percentage of mobile sperm was significantly higher in the negative control MTM (Modified Tyrode's Medium) and positive control MTM-H (Modified Tyrode's Medium-Heparin) than in treatments containing FF concentrations of 20% or higher. The mobility values for control sperm and sperm treated with 5% and 10% FF were not different. FF concentrations were negatively correlated with sperm mobility in a dose-dependent pattern.

In comparison with our results, the negative control composed only of Stock solution for capacitation displayed significantly lower mobility values compared to those of the preliminary semen analysis and the two other media supplemented with 10% and 50% FF.

According to McNutt (1991) et al., compared to controls, they observed a beneficial influence of both non-luteal and luteal oviductal fluid on the percentage of mobile sperm, although non-luteal oviductal fluid maintained a higher percentage of mobile sperm over time than luteal oviductal fluid. From 2 hours onwards, non-luteal oviductal fluid maintained a higher percentage of mobile sperm than luteal oviductal fluid, and this trend continued throughout the remaining 6 hours of incubation.

Regarding the incubation time, Parrish (1988) demonstrated that if sperm were incubated in media supplemented with heparin for 4 hours, the capacitation of sperm was achieved, and the duration of sperm-oocyte contact for fertilization purposes was significantly reduced.

In our case, after incubation, the semen demonstrated signs of hyperactivation in accordance with the standards imposed by Mortimer (1998), which are VCL >150 $\mu\text{m}/\text{sec}$, LIN <50%, and ALHmax >7.0 μm , starting from T1, which is the first 2 hours post-incubation. The results even improved in some cases at T2, such as for trial No. 01 and 03 with M3 medium enriched with 50% FF after 4 hours of incubation, and at T3 for trial No. 02 with M1 medium at 10% and M2 medium at 50% after 6 hours of incubation at 37°C.

As for the rest of the results obtained at T3 and T4, they continue to decrease and even reach zero values, which could be attributed to the depletion of energy substrates. As observed, the values for M2 at 10% FF become null earlier than those for M3, which contains more FF and therefore more nutrients.

However, for trial No. 04, the results show no signs of hyperactivation, which could be attributed to the poor quality of the semen used, with a progressive sperm percentage of 1%, which is considered the lowest result compared to the results of the preliminary analysis of the other three trials.

Conclusion:

In conclusion, the various trials demonstrate that Follicular Fluid (FF) indeed provides advantages in terms of sperm viability. This improvement in viability can be attributed to the presence of nutrients in FF, which provide the necessary resources for sperm to maintain their functionality and survival.

Furthermore, based on the evolution of kinetic parameters throughout incubation, FF appears to promote sperm hyperactivation, which is essential for their ability to fertilize an egg.

MOUSSOUS Djouza.

Université de Blida- 1 / Institut des Sciences Vétérinaires

Promoteur : Dr. ADEL Djallal.

Mise en évidence des indicateurs de la capacitation des spermatozoïdes bovin par le système CASA après culture.

Résumé :

Cette étude a été menée pour mettre en évidence des indicateurs de la capacitation à l'aide d'analyse effectuée par le système CASA sur la semence après avoir été mise en incubation à 37°C dans à un intervalle régulier de 2h.

Cette semence a été mise en culture dans un milieu de base pour capacitation enrichie à 0, 10 et 50% en Fluide Folliculaire.

Les résultats obtenus ont permis d'affirmer avec certitude que le Fluide Folliculaire avait un effet bénéfique sur les spermatozoïdes, car au fil des analyses les résultats du milieu à 0% démontraient en majeure partie des valeurs de mobilité et de cinétique à 0 tandis que les milieux à 10 et 50% de Fluide Folliculaire affichaient des valeurs nettement supérieures, où dans certains cas elles atteignaient celle d'une semence hyperactivée qui selon Mortimer (1998) est une $VCL > 150 \mu\text{m}/\text{sec}$ un $ALH > 07 \mu\text{m}$ et une $LIN < 40\%$.

Cette hyperactivation a été observé dans 3 des 4 essais cela pourrait être imputé à la mauvaise qualité de la semence de l'essai 4, on déduit donc que la qualité de base de la semence influe de façon proportionnelle sur l'hyperactivation de la semence et donc sur la capacitation in vitro.

Mots clefs : *CASA, Capacitation, Hyperactivation, Fluide Folliculaire.*