



HAL
open science

Évaluation de la corrélation entre la concentration en proAKAP4 dans le sperme et la qualité du développement embryonnaire à J7 après fécondation in vitro chez les bovins

Justine Palard-de Meyer

► To cite this version:

Justine Palard-de Meyer. Évaluation de la corrélation entre la concentration en proAKAP4 dans le sperme et la qualité du développement embryonnaire à J7 après fécondation in vitro chez les bovins. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04906830

HAL Id: dumas-04906830

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04906830v1>

Submitted on 22 Jan 2025

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

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

Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation

ANNEE 2024 - Thèse n° 119

**EVALUATION DE LA CORRELATION ENTRE LA
CONCENTRATION EN PROAKAP4 DANS LE SPERME ET
LA QUALITE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE A
J7 APRES FECONDATION *IN VITRO* CHEZ LES BOVINS**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement

devant l'UFR de Médecine de

l'Université de Nantes

le 7 novembre 2024

par

Justine, Marion PALARD-DE MEYER

Sous la direction de

Lamia BRIAND-AMIRAT et Alline DE PAULA REIS

Président du jury : Monsieur Thomas FREOUR, Professeur de la faculté de Médecine de Nantes

Membres du jury : Madame Lamia BRIAND-AMIRAT, Professeur à Oniris,
École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation

Madame Alline DE PAULA REIS, Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort

Monsieur Jean-François BRUYAS, Professeur à Oniris,
École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation

Monsieur Nicolas SERGEANT, Directeur de recherche INSERM UMRS 1172
Équipe Alzheimer et Tauopathies

Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation

ANNEE 2024 - Thèse n° 119

**EVALUATION DE LA CORRELATION ENTRE LA
CONCENTRATION EN PROAKAP4 DANS LE SPERME ET
LA QUALITE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE A
J7 APRES FECONDATION *IN VITRO* CHEZ LES BOVINS**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement

devant l'UFR de Médecine de

l'Université de Nantes

le 7 novembre 2024

par

Justine, Marion PALARD-DE MEYER

Sous la direction de

Lamia BRIAND-AMIRAT et Aline DE PAULA REIS

Président du jury : Monsieur Thomas FREOUR, Professeur de la faculté de Médecine de Nantes

Membres du jury : Madame Lamia BRIAND-AMIRAT, Professeur à Oniris,
École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation

Madame Aline DE PAULA REIS, Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort

Monsieur Jean-François BRUYAS, Professeur à Oniris,
École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation

Monsieur Nicolas SERGEANT, Directeur de recherche INSERM UMRS 1172
Équipe Alzheimer et Tauopathies

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment

Responsable :

Emmanuel JAFFRES

Adjoint :

Frédérique NGUYEN

| | |
|--|--|
| Pharmacologie et Toxicologie | Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Hervé POULIQUEN (Pr) Antoine ROSTANG (MC) |
| Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire | Jean-Marie BACH (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Lionel MARTIGNAT (Pr) Grégoire MIGNOT (MC) |
| Histologie et Anatomie Pathologique | Jérôme ABADIE (MC) Marie-Anne COLLE (Pr) Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC) Marine ROHEL (CEC) |
| Biochimie alimentaire industrielle | Clément CATANEO (MC) Joëlle GRUA (MC) Laurent LE THUAUT (MC) Carole PROST (Pr) Ali KHALIL (MC) |
| Microbiotech | Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC) Emmanuel JAFFRES (MC) Mathilde MOSSER (MC) Hervé PREVOST (Pr) Raouf TAREB (MC) Boris MISERY (MC) Quentin PRUVOST (CEC) |

Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique

Responsable :

Raphaël GUATTEO

Adjoint :

Jean-Michel CAPPELIER

Elevage, nutrition et santé des animaux domestiques

Juan Manuel ARIZA CHACON (MC)
Nathalie BAREILLE (Pr)
François BEAUDEAU (Pr)
Ségolène CALVEZ (MC)
Christine FOURICHON (Pr)
Aurélien MADOUASSE (MC)
Nora NAVARRO-GONZALES (MC)

Infectiologie

Albert AGOULON (MC)
Suzanne BASTIAN (MC)
Alain CHAUVIN (Pr)
Léa LOISEL (AERC)
Pauline MAISONNASSE (CERC)
Emmanuelle MOREAU (Pr)
Kenny OBERLE (MC)
Nadine RAVINET (MC)
Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr)

Médecine des animaux d'élevage

Sébastien ASSIE (MC)
Catherine BELLOC (Pr)
Isabelle BREYTON (MC)
Christophe CHARTIER (Pr émérite)
Raphaël GUATTEO (Pr)
Mily LEBLANC MARIDOR (MC)
Anne RELUN (MC)
Maud ROUAULT (AERC)

Hygiène et qualité des aliments

Jean-Michel CAPPELIER (Pr)
Louis DELAUNAY (CERC)
Bruno LE BIZEC (Pr)
Marie-France PILET (Pr)
Sofia STRUBBIA (MC)

Département DSC Sciences Cliniques

Responsable :

Catherine IBISCH

Adjoint :

Marion FUSELLIER

| | |
|--|---|
| Anatomie comparée | Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MC stagiaire) |
| Pathologie chirurgicale et anesthésiologie | Eric AGUADO (Pr) Claire DE FOURMESTRAUX MC) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR) Caroline TESSIER (MC) Gwenola TOUZOT-JOURDE (MC) Pierre MAITRE (MC) |
| Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie | Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass) Jacques GUILLOT (Pr) Maria Dolores SANCHEZ (AERC) Sabrina VIEU (AERC) |
| Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire | Nora BOUHSINA (CERC) Nicolas CHOUIN (MC) Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (MC) Catherine IBISCH (MC) Françoise ROUX (Pr) Odile SENECAAT (MC) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) |
| Biotechnologies et Pathologie de la reproduction | Djemil BENCHARIF (MC HDR) Lamia BRIAND (MC HDR) Jean-François BRUYAS (Pr) Francis FIENI (Pr) |

Département GPA Génie des Procédés Alimentaires

Responsable :

Vanessa JURY

Adjoint :

Cyril TOUBLANC

Lionel BOILLEREAUX (Pr)
Kévin CROUVISIER-URION (MC)
Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr)
Marie DE LAMBALLERIE (Pr)
Francine FAYOLLE (Pr)
Michel HAVET (Pr)
Vanessa JURY (Pr)
Emilie KORBEL (MC)

Alain LEBAIL (Pr)
Jean-Yves MONTEAU (MC HDR)
Eve-Anne NORWOOD (MC)
Laurence POTTIER (MC)
Raphaël PORYLES (MC)
Olivier ROUAUD (Pr)
Cyril TOUBLANC (MC)

Département MSC Management, Statistiques et Communication

Responsable :

Samira ROUSSELIERE

Adjoint :

Véronique CARIOU

Responsable administratif :

Horacio ACAKPO-ADDRA

Contact :

secretariat.msc@oniris-nantes.fr

Mathématiques, Statistiques,
Informatique

Resp. : V. CARIOU

Véronique CARIOU (MC HDR)
Jean-Michel GALHARRET (MC stagiaire)
Mohamed HANAFI
Benjamin MAHIEU
El Mostafa QANNARI (Pr émérite)
Michel SEMENOU (MC)
Chantal THORIN (Pr Ag.)
Evelyne VIGNEAU (Pr)

Economie, Gestion, Législation
Resp. : S. DUCHAINE

EQUIPE MANAGEMENT SCIENCE DE L'ALIMENTATION

Ibrahima BARRY (MC)
Pascal BARILLOT (MC)
Sibylle DUCHAINE (MC)
Jean-Marc FERRANDI (Pr)
Sonia MAHJOUB (MC)
Samira ROUSSELIERE (MC)

EQUIPE PRACTICE MANAGEMENT

Florence BEAUGRAND (MC)
Franck INSIGNARES
Christophe PAPINEAU

Langues Communication
Resp. L. MORRIS/M.BRIDOU

Marc BRIDOU (PLPA)
Nathalie GOODENOUGH (PCEA)
David GUYLER (Ens. cont.)
Patricia JOSSE (Ens. Cont.)
Shaun MEEHAN (Ens. cont.)
Linda MORRIS (PCEA)
Ian NICHOLSON (Ens. cont.)

NORMES DE CITATION

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénom de l'auteur : Palard-De Meyer Justine
- Année de soutenance : 2024
- Titre de la thèse : Évaluation de la corrélation entre la concentration en proAKAP4 dans le sperme et la qualité du développement embryonnaire à J7 après fécondation *in vitro* chez les bovins
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes
- École de soutenance : Oniris : École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation Nantes Atlantique
- Nombre de pages : 122 p.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| Normes de citations | 9 |
| REMERCIEMENTS..... | 10 |
| TABLE DES MATIÈRES | 12 |
| LISTE DES ANNEXES | 14 |
| LISTE DES FIGURES..... | 15 |
| LISTE DES TABLEAUX..... | 17 |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 19 |
| INTRODUCTION | 21 |
| PREMIÈRE PARTIE : Étude bibliographique | 23 |
| I. Le transfert embryonnaire chez les bovins après ponction ovocytaire échoguidée (Ovum Pick Up) et fécondation <i>in vitro</i> | 24 |
| A. Préparation des gamètes femelles | 24 |
| a. Collecte des ovocytes | 24 |
| b. Sélection | 26 |
| c. Maturation <i>in vitro</i> | 27 |
| B. Préparation des gamètes mâles et FIV | 27 |
| C. Développement embryonnaire précoce | 29 |
| D. Évaluation de la qualité du développement embryonnaire | 31 |
| E. Transfert de l'embryon | 32 |
| F. Cryopréservation des embryons | 33 |
| G. Différences entre les embryons produits <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> | 33 |
| H. Résultats obtenus lors de transferts embryonnaires | 34 |
| II. Le spermatozoïde : genèse et structure | 37 |
| A. La spermatogénèse | 37 |
| B. Étapes de maturation des spermatozoïdes | 38 |
| C. Structure générale du spermatozoïde | 39 |
| D. Structure du flagelle | 39 |
| a. Axonème | 39 |
| b. Pièce intermédiaire | 40 |
| c. Pièce principale | 41 |
| d. Pièce terminale | 41 |
| E. Bases structurelles et moléculaires de la motilité spermatique | 42 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| III. | Le sperme en routine : conservation et évaluation de la qualité | 43 |
| A. | Cryoconservation du sperme | 43 |
| | a. Modalité de la cryoconservation | 43 |
| | b. Conséquences de la cryoconservation sur les spermatozoïdes | 44 |
| B. | Méthodes conventionnelles d'analyse de la qualité spermatique | 45 |
| | a. Analyse macroscopique | 45 |
| | b. Évaluation de la concentration | 46 |
| | c. Évaluation de la motilité spermatique | 46 |
| | d. Évaluation de la morphologie | 49 |
| C. | Limites des méthodes conventionnelles | 52 |
| D. | Intérêt de la protéomique dans l'analyse de la qualité spermatique | 52 |
| | | |
| IV. | proAKAP4/AKAP4 : biomarqueur de la qualité spermatique | 54 |
| A. | Biochimie de la proAKAP4/AKAP4 | 54 |
| | a. Synthèse dans l'espace et le temps | 54 |
| | i. Localisation et expression du gène | 54 |
| | ii. Assemblage au sein de la gaine fibreuse | 56 |
| | iii. Localisation dans les spermatozoïdes | 56 |
| | b. Domaines et sites de fixation | 57 |
| | c. Une protéine présente chez de nombreuses espèces | 59 |
| | d. Coordination de la réponse intracellulaire au sein du spermatozoïde | 61 |
| B. | Rôles de proAKAP4/AKAP4 et conséquences d'une défection ou d'une diminution de la proAKAP4/AKAP4 sur la fertilité | 62 |
| | a. Spermatogénèse et maturation des spermatozoïdes | 63 |
| | b. Structure des spermatozoïdes et anomalies morphologiques | 64 |
| | c. Motilité des spermatozoïdes | 66 |
| | d. Stress oxydatif | 66 |
| C. | Quantification de la proAKAP4 | 69 |
| | a. Intérêts | 69 |
| | b. Valeurs de référence | 69 |
| | | |
| | DEUXIÈME PARTIE : Étude expérimentale – Travaux de thèse | 71 |
| | CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES | 98 |
| | LISTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 99 |

LISTE DES ANNEXES

| | |
|---|-----|
| Annexe 1 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez le taureau | 113 |
| Annexe 2 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez le chien | 114 |
| Annexe 3 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez le porc | 115 |
| Annexe 4 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez le bélier | 116 |
| Annexe 5 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez l'étalon et l'âne..... | 117 |
| Annexe 6 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez les camélidés | 118 |
| Annexe 7 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez l'homme | 119 |
| Annexe 8 : Liste et caractéristiques des échantillons envoyés pour quantification de la proAKAP4 | 120 |
| Annexe 9 : Données recueillies dans le cadre des Études 1 et 2 (avant traitement des données) | 121 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Représentation schématique de la technique d' <i>Ovum Pick Up</i> | 25 |
| Figure 2 : Illustration de la classification des ovocytes de bovin selon les critères de l'IETS | 26 |
| Figure 3 : Schéma de la disposition des spermatozoïdes avant et après la centrifugation en gradient de densité bi-couche | 28 |
| Figure 4 : Étapes du développement embryonnaire précoce | 29 |
| Figure 5 : Représentation schématique des étapes du développement « normal » des embryons bovins | 30 |
| Figure 6 : Schéma d'un embryon bovin au stade blastocyste (J7)..... | 30 |
| Figure 7 : Photographie du dispositif PrimoVision® (Time Lapse) | 32 |
| Figure 8 : Représentation schématique du déroulement de la spermatogénèse au sein du tissu épithélial des tubes séminifères | 38 |
| Figure 9 : Représentation schématique d'un spermatozoïde bovin..... | 39 |
| Figure 10 : Représentation schématique du complexe axonémal de la queue du spermatozoïde | 40 |
| Figure 11 : Représentation schématique de la gaine fibreuse | 41 |
| Figure 12 : Illustration des différentes composantes de la motilité analysée par la méthode CASA | 48 |
| Figure 13 : Anomalies majeures et mineures des spermatozoïdes dans l'espèce bovine | 50 |
| Figure 14 : Identification et localisation du gène AKAP4 chez l'Homme sur le chromosome X, au locus Xp11.2 | 54 |
| Figure 15 : Représentation schématique de l'apparition de l'AKAP4 au cours de la spermatogénèse | 55 |
| Figure 16 : Représentation schématique de la protéine AKAP4 et de son précurseur..... | 55 |
| Figure 17 : Immunolocalisation de l'AKAP4 par microscopie électronique chez la souris..... | 57 |
| Figure 18 : Représentation schématique de la structure des AKAPs | 58 |

| | |
|---|----|
| Figure 19 : Rappels phylogénétiques | 60 |
| Figure 20 : Représentation schématique du complexe AKAP/PKA/AMPc | 61 |
| Figure 21 : Coupes longitudinales de pièces principales de flagelles vues au microscope électronique à transmission (x40000) chez des souris de type sauvage (WT) et knock-out (KO) pour le gène AKAP4 montrant le développement incomplet de la gaine fibreuse (FS) chez les souris KO | 64 |
| Figure 22 : Comparaison de la morphologie du spermatozoïde normal de souris de type sauvage avec celui de souris AKAP4 knock-out | 65 |
| Figure 23 : Représentation schématique de la méthodologie générale | 74 |
| Figure 24 : Représentation schématique du protocole de préparation des donneuses..... | 75 |
| Figure 25 : Déroulement d'une séance de production d'embryons <i>in vitro</i> | 76 |
| Figure 26 : Photographie time-lapse d'embryons bovins obtenues à l'aide du dispositif Primovision® (proportions conservées) | 79 |
| Figure 27 : Format du tableau des annotations du développement embryonnaire et de la classification morphocinétique | 80 |
| Figure 28 : Représentation schématique du prélèvement des différents matériels biologiques pour quantification en proAKAP4 lors des étapes de préparation de la semence en vue de la FIV | 82 |
| Figure 29 : Format du tableau des résultats relatifs à la quantification de proAKAP4 dans les différents échantillons P, Sp et Cul | 83 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I : Principales différences dans le développement embryonnaire précoce entre les embryons produits <i>in vitro</i> et leurs homologues <i>in vivo</i> | 34 |
| Tableau II : Tableau des résultats obtenus lors des transferts embryonnaires à partir d'embryons produits <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> | 35 |
| Tableau III : Grille d'interprétation du test de Schalm | 46 |
| Tableau IV : Grille d'évaluation de la motilité massale de la semence dans l'espèce bovine | 47 |
| Tableau V : Grille d'évaluation de la qualité du sperme selon la motilité individuelle observée au microscope optique | 47 |
| Tableau VI : Analyses conventionnelles de la semence réalisées chez le taureau..... | 51 |
| Tableau VII : Découverte de proAKAP4/AKAP4 chez différentes espèces | 59 |
| Tableau VIII : Tableau récapitulatif des corrélations mises en évidence entre la proAKAP4/AKAP4 et les paramètres corrélés à la fertilité (toutes espèces confondues)..... | 68 |
| Tableau IX : Valeurs de référence de la concentration en proAKAP4 | 70 |
| Tableau X : Présentation du nombre de fécondations <i>in vitro</i> réalisées au cours de chaque séance pour chacun des cinq taureaux de l'Étude 2 | 85 |
| Tableau XI : Concentrations en proAKAP4 obtenues dans les paillettes des cinq taureaux de l'étude ainsi que la moyenne et le coefficient de variation (CV) | 86 |
| Tableau XII : Concentrations en proAKAP4 obtenues dans les échantillons sans préparation (Sp) des cinq taureaux de l'étude ainsi que le coefficient de variation (CV) entre les deux séances de FIV..... | 87 |
| Tableau XIII : Concentrations en proAKAP4 obtenues dans les culots (Cul) des cinq taureaux de l'étude ainsi que le coefficient de variation (CV) entre les deux séances de FIV | 87 |
| Tableau XIV : Comparaison des concentrations en proAKAP4 obtenues dans les paillettes (P) et les échantillons sans préparation (Sp) des cinq taureaux utilisés dans l'étude | 88 |
| Tableau XV : Comparaison des concentrations en proAKAP4 obtenues dans les échantillons sans préparation (Sp) et les culots (Cul) des cinq taureaux utilisés dans l'étude | 88 |

| | |
|--|----|
| Tableau XVI : Comparaison des concentrations en proAKAP4 obtenues dans les paillettes (P) et les culots (Cul) des cinq taureaux utilisés dans l'étude | 89 |
| Tableau XVII : Répartition des sessions de FIV en deux groupes (proAKAP4 inf et proAKAP4 sup) en fonction de la concentration en proAKAP4 des deux paillettes analysées..... | 90 |
| Tableau XVIII : Comparaison de la production embryonnaire entre les groupes proAKAP4 inf et proAKAP4 sup sur un total de 57 FIV analysées | 90 |
| Tableau XIX : Répartition des taureaux en deux groupes (proAKAP4 inf et proAKAP4 sup) en fonction de la concentration moyenne en proAKAP4 des deux paillettes analysées..... | 91 |
| Tableau XX : Effectifs bruts de la production embryonnaire (nombre de zygotes mis en culture, nombre de segmentés, nombre de blastocystes totaux à J7, nombres d'embryons transférables) | 91 |
| Tableau XXI : Comparaison de la production embryonnaire entre les groupes proAKAP4 inf et proAKAP4 sup sur un total de 164 FIV analysées..... | 92 |
| Tableau XXII : Effectifs bruts de chaque catégorie morphocinétique (catégorie A, B, C, D, clivés) | 92 |
| Tableau XXIII : Comparaison de la qualité des embryons obtenus entre les groupes proAKAP4 inf et proAKAP4 sup (analyse morphocinétique) | 93 |
| Tableau XXIV : Bilan des résultats obtenus dans les études 1, 2 et 2bis | 93 |

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : adénylyl cyclase

AKAP3 : A-kinase anchor protein 3

AKAP4 : A-kinase anchor protein 4

ATP : Adénosine tri-phosphate

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

AMPC: Adénosine Monophosphatase cyclique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BRA : Biotechnologies de la reproduction animale

CABYR : Calcium-binding tyrosin phosphorylation regulated protein

CASA : Computer Assisted Sperm Analysis

CNE : Confédération nationale de l'élevage

COC : Cumulus Oocyte Complex

DFS : Dysplasia of the fibrous sheath

eCG : gonadotrophine chorionique équine

ERK : Extracellular signal-Regulated kinases

FISH : Fluorescence in situ hybridization

FIV : Fécondation in vitro

FSC1 : Fibrous Sheath Component 1

FSH : Hormone de stimulation folliculaire

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

HK1 : Hexokinase 1

IA : Insémination artificielle

ICSI : Intra cytoplasmic sperm injection

IETS : International Embryo Technology Society

IIU : Insémination intra utérine

IST : Infection sexuellement transmissible

KO : Knock Out

LH : Hormone lutéinisante

LIN : Linéarité de la trajectoire curvilinéaire

LOS : Large Offspring Syndrome

MIV : Maturation in vivo

Mr : Masse moléculaire relative

OPU: Ovum Pick Up

PA : Phosphatase

PDE : Phosphodiesterase

PIV : Produits *in vitro*

PKA : Protéine kinase A

PMA : Procréation médicalement assistée

SOF : Fluide d'Oviducte Synthétique

STR : Rectitude de la trajectoire moyenne

VAP : Vitesse moyenne

VSL : Vitesse de progression linéaire

INTRODUCTION

Après des décennies de recherches, le premier « bébé-éprouvette » est né en 1978 en Grande Bretagne. Il était le « fruit » du travail d'un physiologiste de l'Université de Cambridge : Robert G. Edwards. A ce titre, il a reçu le prix Nobel de Médecine en 2010 « pour le développement de la fécondation *in vitro* ». Depuis, les techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) n'ont cessé d'évoluer permettant de proposer une véritable thérapeutique à l'infertilité en médecine humaine.

En médecine vétérinaire, et plus particulièrement pour les animaux de rente, la finalité de la fécondation *in vitro* (FIV) est différente. Il ne s'agit pas en premier lieu de traiter l'infertilité mais plutôt de répondre à de nouveaux enjeux zootechniques dont la réduction de main d'œuvre et l'amélioration génétique par la voie femelle. En effet, cette année, la Confédération nationale de l'élevage (CNE) a publié des chiffres concernant l'emploi en élevage. Il en ressort respectivement une diminution de 26,7% et 16,5% des équivalents temps plein en élevage bovin laitier et bovin viande ; traduisant une perte d'attractivité des métiers de l'élevage et une difficulté de recrutement [1]. Cette réduction de main-d'œuvre [1], notamment qualifiée, associée à des élevages de plus en plus grands, sont des facteurs de risque de chute des performances reproductives. En effet, les taux de réussite à l'insémination artificielle (IA) sont directement dépendants de facteurs zootechniques tels que la détection des chaleurs ou la qualité de réalisation de l'insémination. Dans ce contexte, la production d'embryons *in vitro* en vue de leur transfert apparaît comme une solution potentielle pour maintenir de bonnes performances reproductives au sein du troupeau : Un vétérinaire collecte les ovocytes d'une vache donneuse. Ils les emmènent dans un laboratoire où sera réalisée la FIV et la culture embryonnaire. Puis le vétérinaire revient avec les embryons qu'il transfère dans les vaches receveuses préalablement soumises à un protocole de synchronisation des chaleurs. Le rôle de l'éleveur ou de l'ouvrier se limite donc à préparer les animaux en respectant un protocole fourni par le vétérinaire.

Par ailleurs, le transfert à partir d'embryons produits *in vitro* (PIV) présente de nombreux intérêts par rapport au transfert embryonnaire (TE) classique. En effet, la méthode dite MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) implique le traitement des animaux avec des hormones gonadotrophiques. Ces traitements de superovulation permettent d'augmenter de 1 à 10 le nombre d'ovules libérés par cycle [2]. La procédure est répétable en moyenne cinq fois par an et par vache. Cela permet l'obtention d'une centaine d'embryons sur la vie de l'animal [2]. La réserve ovocytaire étant estimée à 100.000 ovocytes, il existe donc un important gaspillage du potentiel génétique femelle [2]. Quant à elle, l'OPU est répétable à raison de deux fois par semaine. Cela permet donc l'obtention d'embryons à un rythme plus rapide que par la méthode MOET. De plus, la technique d'OPU ne nécessite pas de traitement de superovulation. Elle peut donc être réalisée sur de jeunes animaux, permettant ainsi de réduire l'intervalle intergénérationnel [2]. Enfin, l'OPU-FIV permet de réaliser des « accouplements *in vitro* » [2]. Cela permet une grande valorisation du potentiel génétique des meilleures femelles puisque le nombre de mâles accouplés à la même femelle peut être augmenté par rapport au TE classique. Toutes ces raisons expliquent la tendance mondiale actuelle en faveur des transferts d'embryons PIV au détriment des transferts à partir d'embryons récoltés *in vivo*. Selon les chiffres de l'International Embryo Technology Society (IETS), le nombre de TE à partir d'embryons PIV a

augmenté d'une manière record (+32,8%) entre 2020 et 2021 [3]. Le rapport de 2022 confirme cette tendance.

Reste que la promesse est partiellement remplie. Malgré de nombreuses recherches visant à améliorer la technique de FIV, la procédure reste encore peu efficace et de très nombreux embryons transférés sont incapables de conduire à une gestation [4]. En effet, après collecte des ovocytes et fécondation *in vitro*, le nombre d'embryons transférables avoisine les 30% [5]. Après transfert, seulement 50% des vaches sont gestantes. Ces taux de gestation sont 10 à 40% inférieurs à ceux observés après transferts d'embryons obtenus *in vivo* [2], [6]. Aussi, il apparaît essentiel de rechercher tous les moyens permettant d'améliorer les rendements de la technique [4].

Le succès de l'OPU-FIV dépend de l'optimisation des facteurs mâles, femelles et opérationnels [4], [6]. La qualité des gamètes est un facteur déterminant du développement embryonnaire. Le rôle central de l'ovocyte n'est plus discuté. Le spermatozoïde assure la fécondation de l'ovocyte et détermine donc en partie le développement embryonnaire précoce et l'implantation dans l'utérus [2]. Un enjeu majeur est donc l'appréciation de la fertilité de la semence.

Depuis plusieurs années, la recherche se tourne vers de nouveaux biomarqueurs protéiques de la fertilité. Chez le taureau, une étude récente a retenu 125 protéines comme de potentiels candidats [7]. Parmi elles : L'A-Kinase Anchor Protein 4 (AKAP4). Cette protéine est exclusivement présente dans la gaine fibreuse des spermatozoïdes. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur : la proAKAP4. De nombreux travaux ont mis en lumière des corrélations entre les niveaux de proAKAP4/AKAP4 et la fertilité *in vivo* (motilité, vitalité, morphologie des spermatozoïdes notamment).

Ainsi, la proAKAP4/AKAP4 étant pressentie comme un biomarqueur de la fertilité mâle *in vivo*, si elle s'avérait aussi être un bon biomarqueur de la fertilité mâle *in vitro*, elle pourrait devenir un atout important dans la sélection de taureaux pour la FIV. En effet, une bonne fertilité *in vivo* n'est pas garantie d'une bonne fertilité *in vitro*. C'est pourquoi, dans ce projet nous avons choisi d'évaluer la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la fertilité *in vitro* chez les bovins. Notre objectif est de répondre à la question suivante :

La teneur en proAKAP4 de la semence est-elle pronostique de la qualité du développement embryonnaire *in vitro* chez les bovins ?

Pour mener à bien ce projet, une collaboration tripartite, initiée par le Dr. Lamia Briand-Amirat, a vu le jour entre Oniris, l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) et l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA). Cette association complémentaire a permis de construire une synergie entre l'expertise des pathologies de la reproduction et l'évaluation de la qualité du sperme du Dr. Lamia Briand-Amirat, l'expérience du développement embryonnaire *in vitro* du Dr. Alline Reis, et celle du domaine de la technologie protéomique du Dr. Nicolas Sergeant.

Ce manuscrit se décompose en deux parties. Dans un premier temps, nous présenteront une revue de la littérature reprenant les notions fondamentales nécessaires à la compréhension du sujet. La partie expérimentale de notre projet est présentée dans un second temps sous la forme d'un article scientifique en préparation.

PREMIÈRE PARTIE : Étude bibliographique

La partie bibliographique de ce manuscrit se décompose en quatre temps. D'abord, nous présenterons brièvement l'art du transfert embryonnaire chez les bovins après ponction ovocytaire et fécondation *in vitro*. Nous ferons ensuite des rappels concernant la genèse et la structure des spermatozoïdes. Dans un troisième temps, nous nous intéresserons aux modalités de l'utilisation de la semence en routine et notamment aux différentes méthodes d'évaluation de la qualité spermatique chez les bovins. Enfin, les connaissances sur la proAKAP4/AKAP4, protéine d'intérêt pour notre travail, seront regroupées dans une quatrième partie.

I. Le transfert embryonnaire chez les bovins après ponction ovocytaire échoguidée (*Ovum Pick Up*) et fécondation *in vitro*

A. Préparation des gamètes femelles

a. Collecte des ovocytes

Il existe plusieurs méthodes permettant la récolte des ovocytes. Certaines méthodes sont réalisées *in vivo*. C'est le cas de la laparoscopie par voie paralombaire, première technique développée dans les années 1980. Elle a l'avantage de posséder un bon rendement (77%) en revanche elle entraîne la formation de tissu cicatriciel et d'adhérences au niveau des ovaires de la donneuse [8]. Des techniques moins invasives ont donc été développées en prenant exemple sur les techniques réalisées en médecine humaine. La plus utilisée est l'*Ovum Pick Up* (OPU), mise en place par Pieterse et al. en 1988 [9].

La manipulation se fait sur une femelle tranquilisée et sous anesthésie épidurale. Les matières fécales sont évacuées du rectum. Au besoin, la vessie peut être vidangée. La ponction est réalisée par voie transvaginale avec une sonde échographique munie d'une aiguille de prélèvement. Par voie transrectale, un manipulateur maintient les ovaires contre la sonde échographique. Les follicules présents sur l'ovaire apparaissent sur l'échographe comme des zones noires anéchogènes. Le déplacement de la sonde et/ou de l'ovaire permet d'ajuster la position du follicule à ponctionner sur le trajet de l'aiguille de ponction, identifié par une ligne sur l'écran de l'échographe. Lorsque le follicule à ponctionner est correctement placé en face de la sonde, l'opérateur introduit l'aiguille dans le follicule à travers la paroi vaginale puis à travers celle du follicule. L'aspiration est déclenchée. Le liquide folliculaire est aspiré. Cela se matérialise à l'échographie par la disparition progressive de la zone anéchogène folliculaire. Certains auteurs recommandent un curetage du follicule par des mouvements circulaires de l'aiguille de ponction [9]. Chaque follicule de diamètre supérieur à 2mm est ainsi ponctionné de manière individuelle. Les ovocytes sont récupérés dans des tubes contenant un milieu de culture spécifique [2] (Figure 1).

Le rendement de l'OPU varie en fonction des auteurs entre 19% et 70% [9]. Par rapport au nombre de follicules ponctionnés, le pourcentage moyen d'ovocytes récoltés est de 57% [2]. Ainsi, dans l'espèce bovine, au cours d'une session d'OPU le nombre moyen de follicules ponctionnables est compris entre 5 et 7 [2]. Le nombre moyen d'ovocytes récupérés est compris entre 3 et 4 [2].

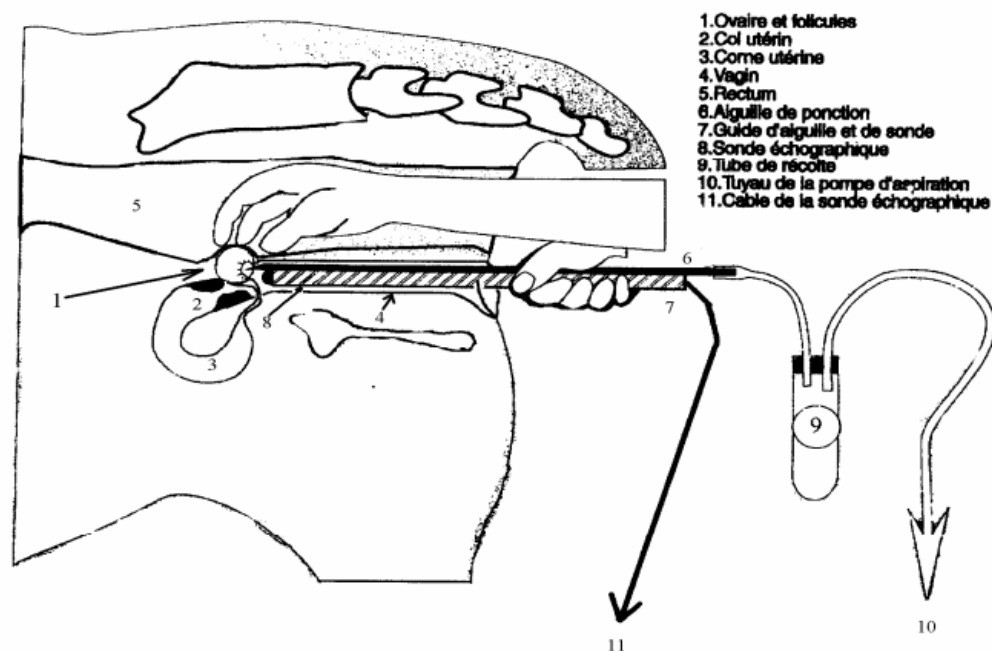
L'OPU est une technique pouvant être réalisée plusieurs fois au cours d'un même cycle chez la donneuse. Des ponctions peuvent donc être réalisées de manière hebdomadaire voir bihebdomadaire [2]. Le nombre moyen de follicules ponctionnés en début de cycle (4,9) est plus élevé que celui obtenu au milieu (3,4) ou en fin de cycle (3,9) [2]. En revanche, le taux de récupération des ovocytes reste stable au cours du cycle [2].

L'effet du stade de reproduction a été étudié en comparant la pratique de cette technique sur des génisses et des vaches taries, en lactation ou gestantes. Chez les

vaches gestantes, l'OPU n'est réalisable qu'au cours des 3 premiers mois du fait de l'inaccessibilité de l'ovaire le reste de la gestation [2]. En 1995, Bungartz et al. ont observé un nombre moyen de follicules ponctionnables significativement plus élevé chez les vaches en lactation (10,6) et tarées (9,3) que chez les vaches non gestantes (7,3) ou les génisses (8,1) [2]. Le nombre d'ovocytes récoltés n'est cependant pas significativement différent [2]. Le pourcentage d'ovocytes récoltés est significativement plus élevé chez les vaches tarées [2].

En tant que telle, l'OPU ne nécessite pas de réponse à un traitement de superovulation [2]. Cela permet donc d'utiliser cette technique sur des animaux prépubères par exemple. Cependant l'effet d'une stimulation ovarienne à l'aide d'hormones gonadotropes comme l'hormone folliculo-stimulante (FSH) ou la gonadotrophine chorionique équine (eCG) a largement été étudié. Cette stimulation permet d'augmenter le nombre de follicules ponctionnables [2]. En revanche, elle n'augmente pas le pourcentage d'ovocytes récoltés par rapport au nombre de follicules ponctionnés [2]. En revanche, le recours à une superovulation ne permet qu'une seule récolte par cycle.

Figure 1 : Représentation schématique de la technique d'Ovum Pick Up [10]

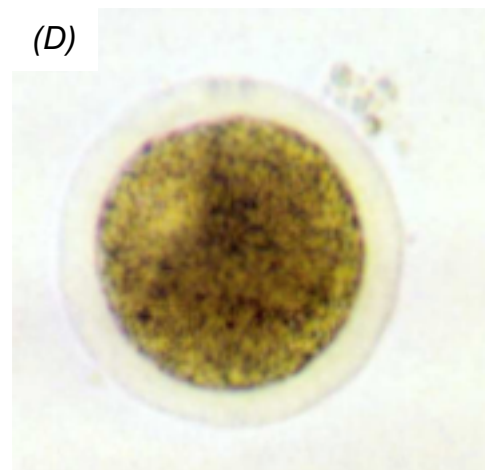
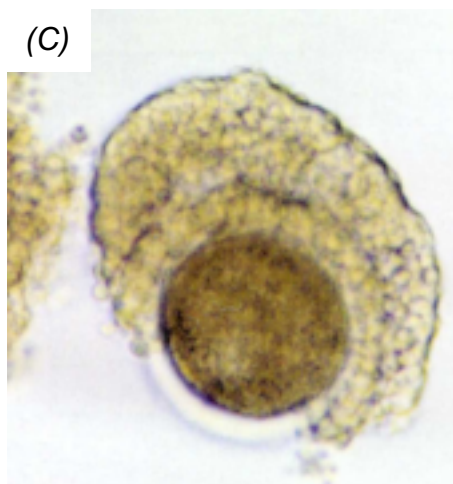
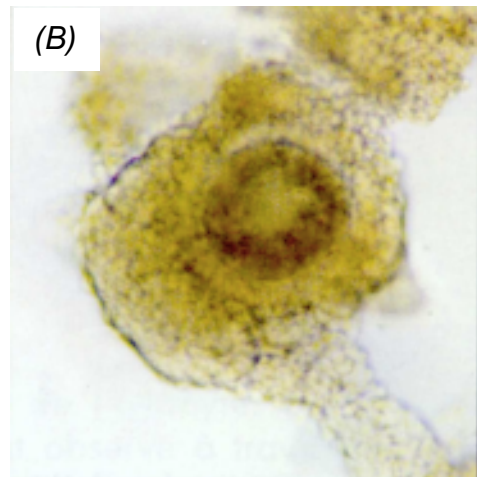
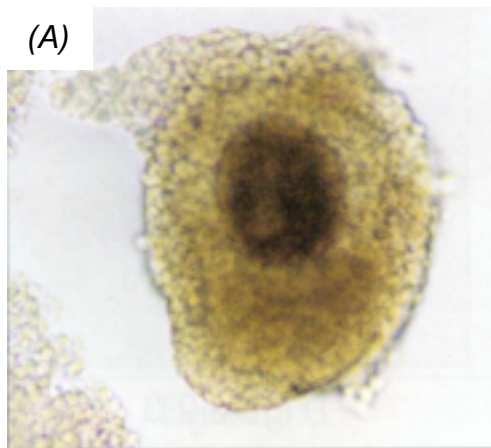


b. Sélection

Après la récolte des ovocytes, leur qualité est évaluée sous microscope optique. L'*International Embryo Technology Society* (IETS) propose une classification en quatre classes des Complexes Cumulus Oocyte (COC) (Figure 2). Cette classification se base notamment sur l'aspect des cellules du cumulus qui entourent l'ovocyte. En effet, les cellules du cumulus possèdent un rôle primordial dans le développement de l'ovocyte notamment par l'apport de métabolites et de nutriments lors de la reprise de la méiose. Il est recommandé de n'utiliser que les COCs de grade 1 et 2.

Figure 2 : Illustration de la classification des ovocytes de bovin selon les critères de l'IETS [10]

- (A) Classe 1 : COC d'aspect transparent, cumulus compact, ooplasme homogène.
- (B) Classe 2 : COC d'aspect transparent, cumulus compact, ooplasme d'aspect irrégulier.
- (C) Classe 3 : COC plus sombre, cumulus peu compact et ooplasme sombre et irrégulier.
- (D) Classe 4 : Cumulus expansé voire absent



c. Maturation *in vitro*

La maturation *in vitro* (MIV) des ovocytes, c'est à dire la reprise de la méiose, nécessite un milieu de culture adapté. Chez les bovins, les milieux les plus couramment utilisés sont le milieu TCM-199 et le Fluide d'Oviducte Synthétique (SOF).

Le milieu TCM-199 est un milieu tamponné aux bicarbonates et contenant des sels minéraux, du glucose, des glutamines, des acides aminés et des vitamines. De nombreuses études visent à déterminer le milieu de maturation optimal. Il est possible d'ajouter au milieu TCM-199 d'autres éléments favorisant la maturation tel que des facteurs de croissance (Epidermal Growth Factor) ou encore des hormones (FSH, LH, œstradiol, hormone de croissance) [11].

Les conditions de culture sont également déterminantes dans le processus de maturation. La température optimale est de 38,5°C. Concernant les conditions atmosphériques, une atmosphère à 5% de CO₂ et saturée en humidité est usuellement utilisée [12]. En règle générale, la MIV dure entre 22 et 24 heures. A l'issue de celle-ci, 80% à 90% des ovocytes ont expulsés leur premier globule polaire et ont atteint le stade métaphase II [13].

B. Préparation des gamètes mâles et FIV

In vivo, les spermatozoïdes sont séparés du plasma séminal lors de la remontée des voies génitales femelles. Une sélection des meilleurs spermatozoïdes s'opère lors de leur progression jusqu'à l'ovocyte. Lors de la FIV, le but est de reproduire cette sélection *in vitro*.

L'une des principales techniques utilisées pour réaliser la sélection des spermatozoïdes est l'utilisation de gradient de densité. Le principe est simple : la centrifugation en gradient de densité permet de séparer, dans un milieu présentant plusieurs couches de densité différente, des particules en fonction de leur taille et de leur densité. Lors d'une centrifugation courte ou lente, les particules se séparent en fonction de leur taille. Lors d'une centrifugation longue ou rapide, la séparation des particules se fait en fonction de leur densité : les particules vont se déplacer vers la zone du gradient ayant la même densité qu'elles [14]. La densité des spermatozoïdes dépend de plusieurs facteurs tels que leur morphologie [15], l'intégrité de leur chromatine [16], leur maturité [17] et leur motilité [18].

Le gradient se fait à l'aide de milieux tel que Bovipure® composé de particules de silices colloïdales recouvertes de silane en suspension dans une solution saline physiologique. Le principe est de réaliser une superposition de couches de concentrations différentes pour récupérer les spermatozoïdes. Classiquement la couche inférieure est composée à 80% et la couche supérieure à 40%. Les paillettes de sperme sont décongelées puis placées au-dessus du gradient. Le tout est centrifugé pendant une dizaine de minutes à 200 G. Les spermatozoïdes les plus denses, donc de meilleure qualité, se retrouvent alors dans la couche inférieure. Le culot est récupéré puis lavé et centrifugé cinq minutes dans une solution de rinçage. Le culot est ensuite récupéré par élimination du surnageant [16], [18] (Figure 3).

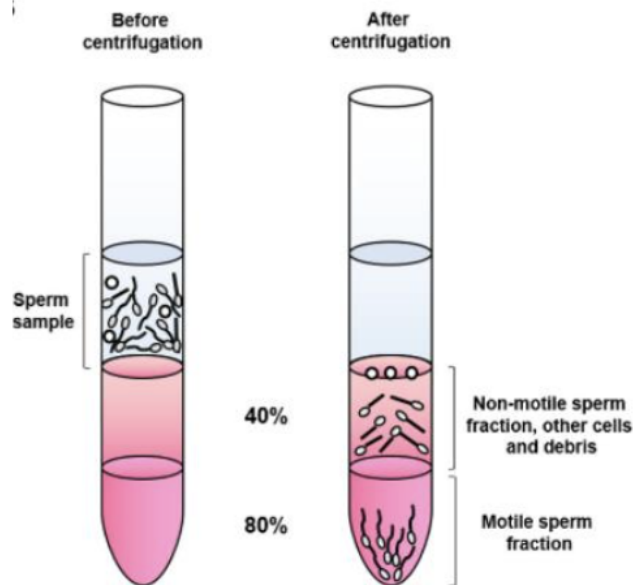
Figure 3 : Schéma de la disposition des spermatozoïdes avant et après la centrifugation en gradient de densité bi-couche [19]

Before centrifugation : avant centrifugation / After centrifugation : après centrifugation

Sperm sample : échantillon de sperme

Non-motile sperm fraction, others cells and debris : fraction de spermatozoïdes non motiles, autres cellules et débris

Motile sperm fraction : fraction de spermatozoïdes motiles



Chez les bovins, l'étape de fécondation *in vitro* au sens strict, est obtenue par la co-intubation de l'ovocyte mature et des spermatozoïdes. La capacitation des spermatozoïdes est réalisée pendant le temps de contact entre les gamètes. Les paramètres d'ambiance sont identiques à ceux de la MIV [20]. Les milieux additionnés d'héparine, rajoutée directement dans le milieu, sont les plus utilisés pour la fécondation [21]. L'héparine se fixe sur des protéines qui interagissent avec le cholestérol et les phospholipides de la membrane plasmique. Cette liaison entraîne une perte de lectines responsable de l'efflux de cholestérol. De plus, la liaison de l'héparine aux protéines entraîne un changement de pH intracellulaire du spermatozoïde, une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase. Tous ces mécanismes contribuent à la réalisation de la capacitation.

Le nombre de spermatozoïdes mis en incubation est essentiel. Le nombre minimum de spermatozoïdes requis par ovocyte n'est pas établi car il existe d'importantes variations entre les taureaux et entre les races. Une concentration de 1 à 2 millions de spermatozoïdes par millilitre est communément utilisée [22].

La température requise pour la fécondation est comprise entre 38,5°C et 39°C avec une atmosphère à 5% de CO₂, saturée en humidité. Les temps d'incubation varient entre 16 heures et 22 heures [23].

Selon les auteurs, les milieux et les méthodes utilisées pour la FIV, les taux de fécondation obtenus *in vitro* sont compris entre 30 et 85% [2].

C. Développement embryonnaire précoce

Après l'étape de fécondation *in vitro*, les zygotes présumés sont soumis à un cycle court de vortex afin d'enlever les cellules du cumulus le plus accrochées à l'ovocyte. Ensuite, ils sont rincés afin de retirer les débris spermatiques et l'ensemble de cellules du cumulus. Les zygotes sont ensuite transférés dans un milieu de culture adapté. Il existe plusieurs types de culture embryonnaire dont les deux principalement utilisés actuellement :

- La monoculture : un seul milieu est utilisé pour toute la durée du développement embryonnaire précoce. Chez les bovins, le milieu le plus utilisé est le milieu SOF auquel on ajoute divers éléments favorisant le développement (glucose, vitamine, acides aminés, antibiotiques etc.) [22].
- La culture sur plusieurs milieux séquentiels : Plusieurs milieux sont utilisés afin de répondre au mieux aux besoins des embryons selon le stade de leur développement, notamment le besoin en glucose [22].

Là encore, les paramètres d'ambiances sont essentiels. La température de culture varie entre 38,2°C et 38,5°C. La culture des embryons se fait sous une faible concentration en oxygène (5%) proche des conditions *in vivo*. Une concentration à 5% de CO₂, 5% de O₂ et 90% en dioxyde d'azote est préconisée [24]

Suite à la fécondation, l'ovocyte alors bloqué en métaphase II, expulse le second globule polaire. On parle alors de zygote. Ce dernier va progressivement se diviser et passer par un stade à deux cellules, puis quatre cellules etc. A partir d'une masse de 16 cellules, on parle de morula. Celle-ci va ensuite évoluer au stade de jeune blastocyste. Ce stade se caractérise par des blastomères organisés en deux zones : le bouton embryonnaire et le trophoblaste en périphérie, le deux séparés par une cavité : le blastocœle. Ce jeune embryon se transforme en blastocyste environ au 7^e jour post fécondation. Suite à des mouvements d'expansion et de contractions, le blastocyste va subir le phénomène d'éclosion c'est-à-dire qu'il va sortir de sa zone pellucide. On parle alors de blastocyste éclos (Figures 4, 5, 6).

Figure 4 : Étapes du développement embryonnaire précoce [25]
Oviduct : Oviducte / Uterus : Utérus / Fertilization : Fécondation / Cleavage : Segmentation
Compaction : / Blastulation : / Expansion : Expansion / Hatching : Eclosion / Elongation : Elongation

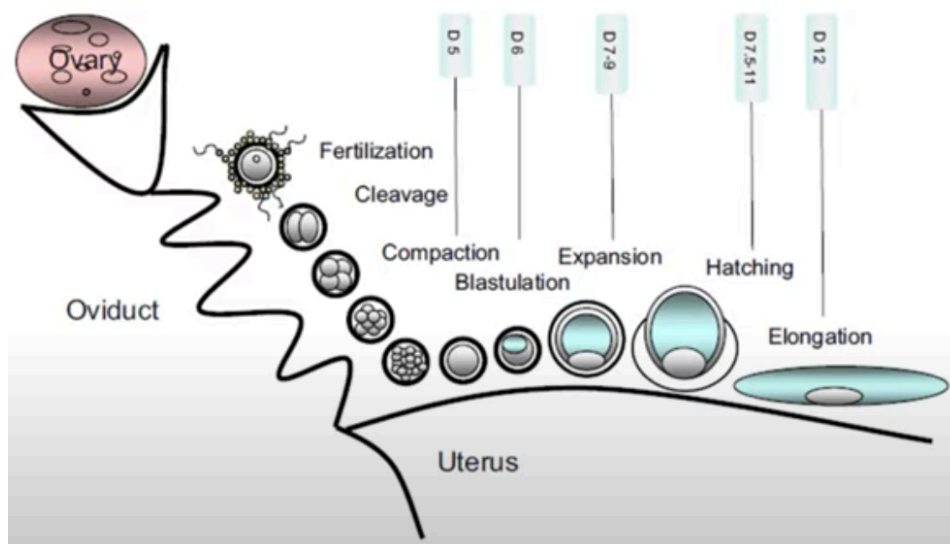


Figure 5 : Représentation schématique des étapes du développement « normal » des embryons bovins [26]

Cell : cellule / Day : jour

Early morula : jeune morula / Early blastocyst : jeune blastocyste / Blastocyst : Blastocyste

Expanded blastocyst : Blastocyste expansé / Hatched blastocyst : blastocyste éclos

Expanding hatched blastocyst : blastocyste expansé éclos

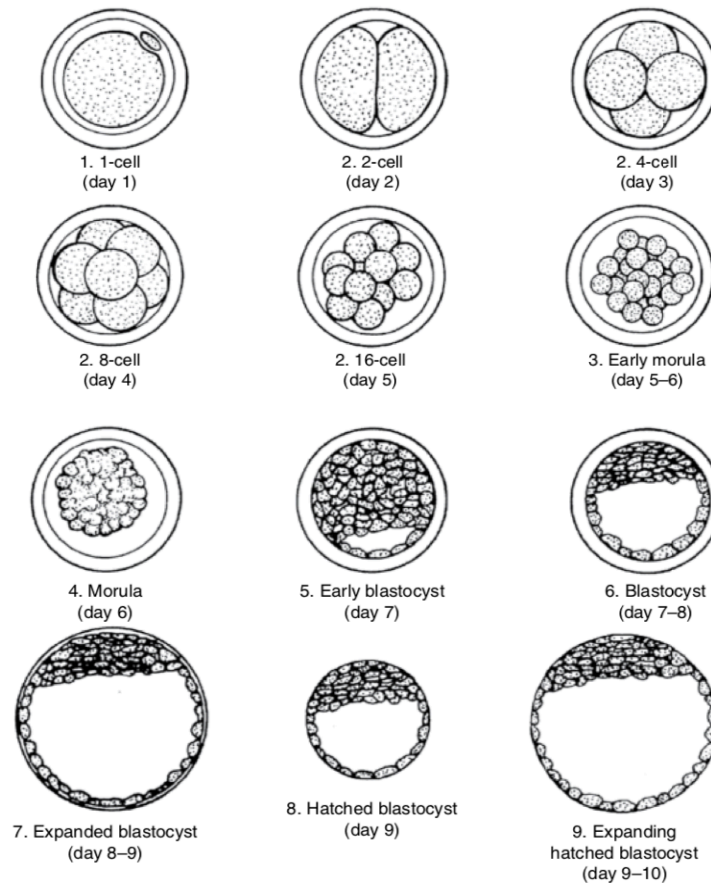
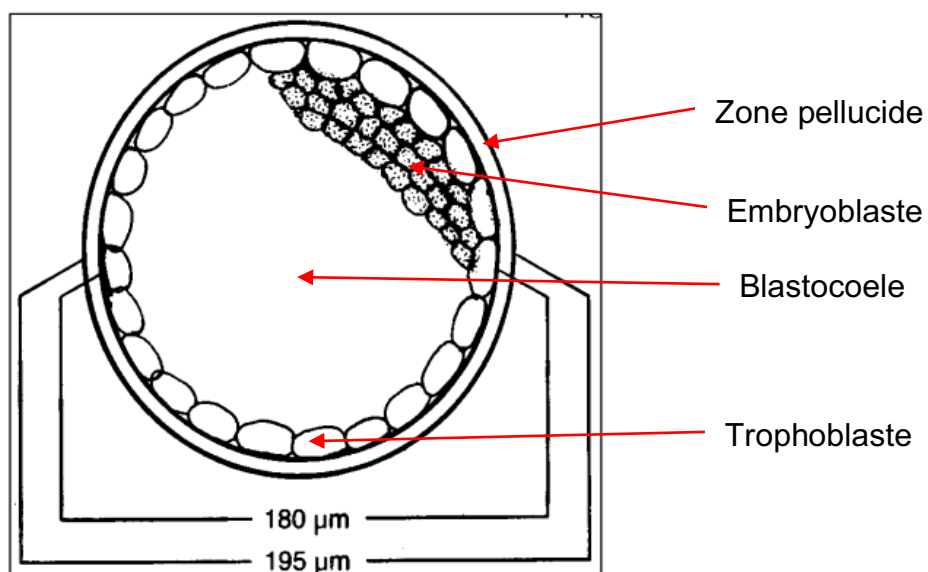


Figure 6 : Schéma d'un embryon de bovin au stade blastocyste (J7) [26]



D. Évaluation de la qualité du développement embryonnaire

Classiquement, la culture *in vitro* des embryons bovins dure 7 à 8 jours ; jusqu'à ce qu'ils atteignent le stade de blastocyste (Figure 6).

La qualité des embryons est alors évaluée. Pour ce faire, deux moyens sont disponibles, la loupe binoculaire est le moyen le plus utilisé car il est simple, peu onéreux et permet une évaluation rapide [27], [28]. Cette évaluation se base sur des critères morphologiques. Il permet d'attester de la fécondation et du bon déroulement du développement embryonnaire [29]. Cependant, elle présente plusieurs limites. D'abord il s'agit d'analyser l'embryon, structure en 3 dimensions, sur une projection en 2 dimensions. Cela peut donc entraîner des erreurs dues aux artefacts. De plus, le développement embryonnaire est une succession dynamique d'évènements or le microscope permet uniquement une évaluation statique. La cinétique du développement embryonnaire n'est pas prise en compte [30].

Pour l'espèce bovine, la classification la plus utilisée aujourd'hui repose sur les recommandations de l'IETS :

- Classe 1 : excellente ou bonne qualité
- Classe 2 : acceptable
- Classe 3 : insuffisant
- Classe 4 : mort ou dégénéré

Cependant, il est important de considérer que la classification proposée par l'IETS se base sur des critères observés chez des embryons obtenus *in vivo*. Or, il existe des différences importantes entre les embryons obtenus *in vivo* et ceux produits *in vitro* (PIV). Ces différences sont développées plus loin. La sélection des embryons n'est donc pas optimale.

Pour affiner la sélection des embryons produits *in vitro*, l'étude des caractères morpho-cinétiques des embryons apparait donc particulièrement intéressante. Ainsi, les systèmes d'enregistrement d'image en (quasi) continu dit time-lapse se sont développés. Un incubateur est alors équipé d'une caméra qui prend des photos des embryons à intervalles de temps réguliers (de quelques minutes à plusieurs heures). La succession de ces photos génère un film du développement embryonnaire qui permet d'apprécier celui-ci d'un point de vue morphologique et cinétique (durée des divisions, changement de morphologie lors des divisions, phases d'arrêt etc.). Ce nouveau moyen présente également l'avantage de ne pas sortir quotidiennement les embryons de l'incubateur, ce qui était nécessaire avec le microscope [31] (Figure 7).

Figure 7 : Photographie du dispositif Primovision® (Time Lapse)



L'évaluation de la qualité embryonnaire qu'elle soit statique ou dynamique s'effectue à travers de très nombreux critères. Cela entraîne donc une difficulté dans l'homogénéisation de son appréciation. Des efforts de standardisation ont été faits afin d'uniformiser le travail effectué dans les différents laboratoires et ainsi de pouvoir échanger et comparer les résultats.

Cependant, la standardisation des critères dynamiques obtenus via le time-lapse est beaucoup plus complexe [32] et il n'existe pas encore de consensus.

E. Transfert de l'embryon

Les femelles receveuses sont préparées à l'aide d'un protocole hormonal de synchronisation permettant à l'utérus d'être dans les conditions optimales pour recevoir l'embryon [33].

La vulve est nettoyée plusieurs fois et séchée. L'embryon est manipulé de manière stérile afin d'éviter toute contamination. L'embryon est placé dans une sonde entre deux bulles d'air. Il est déposé dans la corne utérine par voie vaginale après cathétérisme du col. Idéalement l'embryon est placé dans la corne utérine ipsilatérale à l'ovaire présentant un corps jaune [33].

F. Cryopréservation des embryons

La cryopréservation des embryons permet de dissocier la production des embryons avec leur transfert. Elle permet ainsi la commercialisation des embryons et la création d'une banque d'embryons d'animaux à haute valeur génétique. Deux principales techniques sont utilisées : la congélation lente et la vitrification [34].

La congélation lente ou « slow freezing » repose sur le principe de déshydratation osmotique. La vitesse de refroidissement doit être suffisamment lente pour permettre à l'eau intracellulaire, qui n'est pas congelée, de se déshydrater par osmose. Les embryons sont lavés puis placés dans un milieu contenant un cryoprotecteur. L'ensemble est placé dans des paillettes, elles-mêmes placés dans un congélateur. La température de départ est -6°C. Elle est diminuée par palier de 0,5°C par minute jusqu'à arriver à la température de -35°C. Les paillettes sont ensuite conservées dans l'azote liquide (-196°C) jusqu'à l'utilisation des embryons [34].

A l'inverse, la vitrification correspond à un refroidissement très rapide de l'embryon. Il n'y a pas de formation de cristaux de glace : un état vitreux est atteint par augmentation de sa viscosité au cours du refroidissement. Cette technique nécessite l'utilisation d'agents cryoprotecteurs à forte concentration. Les embryons vitrifiés sont ensuite conservés dans l'azote liquide [34].

G. Différences entre les embryons produits *in vivo* et *in vitro*

L'observation des embryons récoltés *in vivo* a permis d'améliorer les techniques de culture *in vitro*. Malgré cela, de nombreuses différences existent entre les deux types d'embryons [5]. Le milieu et les conditions de culture des embryons ont un rôle important dans ces différences [35]. On distingue des différences concernant le développement précoce et des différences sur le long terme concernant le fœtus et le futur veau. Les principales différences concernant le développement précoce sont listées dans le Tableau I.

Sur le long terme, plusieurs manifestations cliniques sont regroupées sous le nom de « Large Offspring Syndrome » (LOS) par les auteurs anglo-saxons [2]. Cela se traduit notamment par une gestation allongée et des veaux plus gros à la naissance ; ce qui résulte en un nombre de césariennes plus important [2] (Tableau II). De plus, la naissance de veaux mâles est plus souvent observée et des anomalies congénitales sont constatées (anomalies de membres, veaux bull-dog, croissances anormales d'organes) [2] (Tableau II). La cause du LOS est encore méconnue. La principale explication proposée est l'altération des modèles épigénétiques associés à la chromatine embryonnaire préimplantatoire entraînant une dérégulation de l'expression des gènes impliqués dans la croissance et le développement fœtal est placentaire [2].

Tableau I : Principales différences dans le développement embryonnaire précoce entre les embryons produits in vitro et leurs homologues in vivo

| | Embryons <i>in vivo</i> | Embryons <i>in vitro</i> | Conséquences |
|----------------------------|--|--|---|
| Morphologie | Contacts cellulaires entre les blastomères plus étroits Petit nombre de gouttelettes lipidiques | Mauvaise compaction des blastomères [36] Zone pellucide plus fragile Teneur en lipides plus importante | Qualité supérieure des embryons <i>in vivo</i> Embryons PIV plus sensibles à la congélation [5], [37] Réduction du développement embryonnaire précoce |
| Cinétique du développement | | Allongement des cycles de divisions [38] | |
| Métabolisme | Métabolisme « calme » | Métabolisme plus élevé [39], [40] : Production de lactates majorée Taux d'oxydation plus élevés Niveaux élevés d'espèces réactives de l'oxygène | |
| Génomique | | Expression diminuée d'un grand nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de transcription et de traduction [41] | |

H. Résultats obtenus lors de transferts embryonnaires

Les différences entre les embryons PIV et leurs homologues *in vivo* conduisent à des différences dans les résultats obtenus des transferts embryonnaires. Le tableau II présente et compare les résultats obtenus lors des transferts à partir d'embryons PIV et ceux récoltés *in vivo*. Les taux de gestation obtenus après transferts d'embryons *in vitro* varient entre 45 et 65% [42]. La variation s'explique par des différences quant aux conditions de culture, la cryopréservation ou non de l'embryon ou encore les conditions de réalisation du transfert en lui-même. Cependant, la littérature s'accorde sur le fait que les taux de gestation sont meilleurs avec des embryons récoltés *in vivo* [6]. De plus, les embryons PIV présentent des taux de mortalité et d'avortement nettement plus élevés que ceux observés en insémination artificielle ou lors du transfert d'embryons récoltés *in vivo* [42].

Malgré cela, la technique de transfert embryonnaire après OPU et FIV présente des intérêts majeurs pour la sélection [2] :

- **Augmenter la pression de sélection sur les mères à taureaux** : L'OPU est répétable à raison de deux sessions par semaine. A raison de 1,5 embryons transférable par session, cela permet de multiplier par 4 le nombre de veaux obtenus par unité de temps comparé à la superovulation et la collecte classique où le délai entre deux traitements de superovulation est de 60 jours [2].

- **Une meilleure sélection des individus :** Elle permet de faire des « accouplements *in vitro* » [2]. Le nombre de mâles accouplés à la même femelle peut notamment être augmenté par rapport au transfert d'embryons classique après superovulation.
- **Obtenir des descendants de femelles ne répondant pas à la superovulation**

Cela explique, en grande partie, la tendance mondiale actuelle en faveur des transferts à partir d'embryons PIV [3]

Tableau II : Tableau des résultats obtenus lors des transferts embryonnaires à partir d'embryons produits *in vivo* et d'embryons produits *in vitro*

| | Transfert embryonnaire Embryons récoltés <i>in vivo</i> | OPU/FIV et transfert embryonnaire Embryons produits <i>in vitro</i> |
|--|--|--|
| Follicules ponctionnés (/ session) | | Sans stimulation : 5 à 7 [2] Avec stimulation : 11 à 17 [2] |
| Ovocytes récupérés (/ follicules ponctionnés) | | 57% [2] [19% - 70%] [2] |
| Ovocytes mis en maturation (/ ovocytes récupérés) | | 82% [2] |
| Ovocytes maturés (/ ovocytes mis en maturation) | | 50% [2] |
| Zygotes obtenus (/ ovocytes maturés) | | 30% [2] |
| Taux de fécondation <i>in vitro</i> | | 30% – 85 % [2] |
| Taux de blastocystes | | 7% - 50% [2] |
| Taux de gestation (/ embryons transférés) | 64,1 % [2] [41,5% - 90%] | 40,1 % [2] [29,5% - 54,3%] |
| Mortalité embryonnaire (< 42 jours de gestation) | ND | 20 % [42] |
| Avortement (> 42 jours de gestation) | 0,3 % (n=1224) [26] | 7% - 13% [42] |
| Mortalité néonatale (IA : 5,3 % [2]) | 4,6% [2] | 7% [2] |
| Durée de gestation (IA : 281,2 jours [2]) | 282 jours [2] | 284 jours [2] |
| Autres manifestations du LOS | | 55% de veaux mâles (49% en IA) 3,2 % de malformations (0,7 en IA) |

- La technique d'Ovum Pick Up est une technique permettant de récupérer les ovocytes d'une vache donneuse *in vivo*. Elle ne nécessite pas de réponse à une stimulation ovarienne. Répétable jusqu'à deux séances par semaine, elle permet une meilleure exploitation de la réserve ovocytaire.
- La production *in vitro* d'embryons passe par plusieurs étapes clés dont la MIV, la FIV et la culture embryonnaire. La maîtrise et l'optimisation de ces techniques sont essentielles pour obtenir des embryons transférables.
- L'évaluation de la qualité des embryons produits *in vitro* en vue de leur transfert se base actuellement sur des critères morphologiques. Cette méthode présente l'avantage d'être peu coûteuse et rapide. Cependant, elle n'est pas optimale puisque les recommandations de l'IETS ont été formulées à partir d'embryons récoltés *in vivo*. Or il existe d'importantes différences entre les embryons produits *in vitro* et ceux récoltés *in vivo*, notamment une différence majeure au niveau de la qualité de la zone pellucide. De plus, cette méthode ne prend pas en compte la cinétique du développement embryonnaire. Aussi, l'évaluation de la qualité par des techniques morphocinétiques est en plein essor. Cependant, il n'existe pas encore de consensus quant à la standardisation de cette méthode.
- Les différences entre les embryons récoltés *in vivo* et ceux produits *in vitro* résultent en des différences dans les résultats obtenus lors des transferts ; les taux de gestation étant meilleurs avec les embryons récoltés *in vivo*.

Malgré une grande avancée dans l'optimisation de la production *in vitro* d'embryons bovin au cours des dernières décennies, la technique de fécondation *in vitro* et à fortiori le transfert embryonnaire restent des procédures peu efficaces. En moyenne, seulement 50% des embryons PIV transférés conduisent à une gestation [2]. **Deux axes sont à envisager afin de permettre l'amélioration de ce rendement [43] : 1/ Optimiser la production *in vitro* afin d'obtenir un nombre d'embryons transférables plus important ; 2/ Améliorer la sélection des embryons afin d'augmenter le pourcentage d'embryons transférés qui conduiront à une gestation.**

C'est sur le premier axe que s'oriente cette thèse. De très nombreux facteurs influent sur la production des embryons *in vitro* et notamment sur le développement embryonnaire. La qualité des gamètes en fait partie. La place centrale de l'ovocyte dans le développement embryonnaire n'est plus discutée, cependant, le spermatozoïde possède également un rôle essentiel. En effet, il existe une grande variabilité entre taureaux de leur pouvoir fécondant *in vitro* [2]. Cela peut s'expliquer par plusieurs éléments [2] :

- Une composition différente du plasma séminal
- Des différences dans la capacité du spermatozoïde à induire les réactions ovocytaires (réaction acrosomique, achèvement de la deuxième division)
- Des temps nécessaires à la capacitation différents.

Pour ces raisons, l'amélioration de la sélection du gamète mâle apparaît pertinente pour l'amélioration des rendements obtenus en FIV et TE.

II. Le spermatozoïde : genèse et structure

Les spermatozoïdes sont produits dans les testicules au cours de la spermatogénèse. Bien qu'étant une cellule hautement différenciée, la structure des spermatozoïdes est très conservée, notamment au sein des mammifères [44].

A. La spermatogénèse

La spermatogénèse est l'ensemble des étapes permettant la différenciation des spermatogonies (cellules germinales diploïdes) en spermatozoïdes (cellules différenciées haploïdes) [44], [45]. A partir de la puberté, entre 6 et 12 mois chez le taureau [46], elle se déroule en continue dans les testicules ; au niveau des tubes séminifères.

Chez le taureau, la spermatogénèse dure 54 jours [46]. L'efficacité de la spermatogénèse est en moyenne de 12 millions de spermatozoïdes/jour/gramme de testicule (contre 20 à 28 millions chez la plupart des mammifères) [12]. La spermatogénèse peut être découpée en 4 étapes, illustrée dans la Figure 8 [46].

1) Phase de multiplication :

Il s'agit de l'étape au cours de laquelle des cellules germinales primordiales (diploïdes) sont converties en spermatogonies (diploïdes) [45].

2) Phase d'accroissement :

Au cours de cette étape, certains types de spermatogonies se divisent par mitose et se différencient en spermatocytes primaires (diploïdes) [45].

3) Phase de maturation :

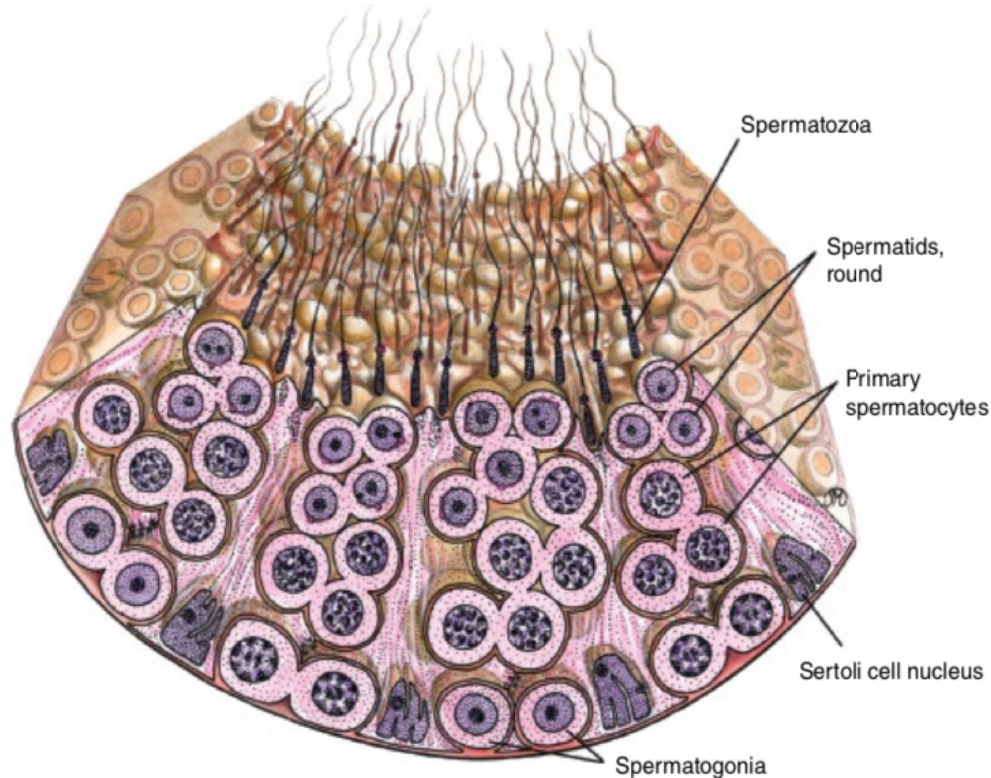
Les spermatocytes primaires (diploïdes) se divisent par méiose. Lors de la méiose I, les spermatocytes primaires deviennent des spermatocytes secondaires (haploïdes). Lors de la méiose II, les spermatocytes secondaires se divisent à nouveau pour former quatre spermatides (haploïdes) [45].

4) Phase de différenciation ou spermiogénèse :

Les spermatides se différencient pour devenir des spermatozoïdes. Parmi ces différenciations, on peut citer la formation de l'acrosome, la mise en place du flagelle, l'élongation et la condensation du noyau, l'élimination du surplus de cytoplasme, le regroupement des mitochondries [44], [45].

Figure 8 : Représentation schématique du déroulement de de la spermatogénèse au sein du tissu épithélial des tubes séminifères [46]

*Spermatozoa : Spermatozoïde / Spermatids round : spermatides rondes
Primary spermatocytes : spermatoocytes primaires / Spermatogonia : Spermatogonie
Sertoli cell nucleus : Noyau d'une cellule de Sertoli*



B. Étapes de maturation des spermatozoïdes

Une fois produits, les spermatozoïdes sont émis dans la lumière des tubes séminifères. Ils sont alors immatures, immobiles et ne possèdent aucun pouvoir fécondant. Leur maturation s'effectue au cours de deux étapes cruciales [44], [45], [47]:

- **La maturation épидидymaire :**
Elle s'effectue lors du transit à travers l'épididyme. Les spermatozoïdes acquièrent leur motilité progressive c'est-à-dire la capacité à se déplacer en ligne droite. Ils subissent également de nombreuses modifications membranaires avec notamment l'apparition de récepteurs nécessaires à la reconnaissance de l'ovocyte et à la fécondation [47].
- **La capacitation :**
La capacitation est l'ensemble des changements physiologiques qui permettent au spermatozoïde de féconder l'ovocyte [44]. Elle se déroule au cours de la remontée des voies génitales femelles. Des enzymes protéolytiques libèrent les sites de reconnaissance de l'ovocyte jusqu'alors masqués. La membrane plasmique subit également de nombreux remaniements en particulier une diminution du ratio cholestérol/phospholipides permettant la réaction acrosomique [44], [45].

C. Structure générale du spermatozoïde

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée. Il se compose de trois parties : la tête, le col et le flagelle [44] (Figure 9). Le spermatozoïde bovin mesure 70 μ m [47].

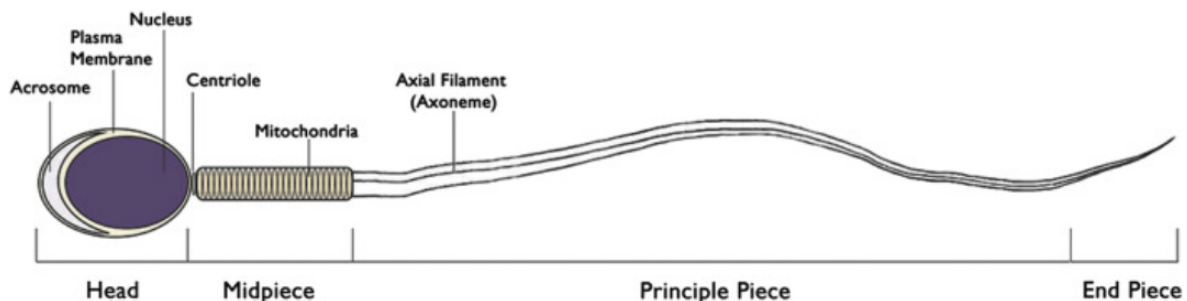
La tête : La majeure partie est occupée par le noyau qui contient le matériel génétique mâle sous forme de chromatine hypercondensée. Le noyau est coiffé par l'acrosome. Il s'agit d'une vésicule contenant des enzymes indispensables à la fécondation de l'ovocyte [44], [45], [47].

Le col (ou collet) : C'est la jonction entre la tête et le flagelle. Il contient l'appareil centriolaire possédant un rôle de stabilisation et d'ancrage entre la tête et la queue du spermatozoïde [44].

Le flagelle (ou queue) : Le flagelle est lui-même structuré en trois parties : une pièce intermédiaire, une pièce principale et une pièce terminale. Sur toute sa longueur le flagelle est constitué d'un filament axial également appelé axonème [44]. Ce dernier est entouré de différentes structures (gaine mitochondriale, gaine fibreuse) selon les différentes parties du flagelle [44], [45].

Figure 9 : Représentation schématique d'un spermatozoïde bovin [45]

*Head : Tête / Acrosome : Acrosome / Plasma Membrane : Membrane plasmique / Nucleus : Noyau
Centriole : Appareil centriolaire / Midpiece : pièce intermédiaire / Mitochondria : mitochondries
Principle Piece : Pièce principale / Axial Filament : Axonème / End Piece : Pièce terminale*



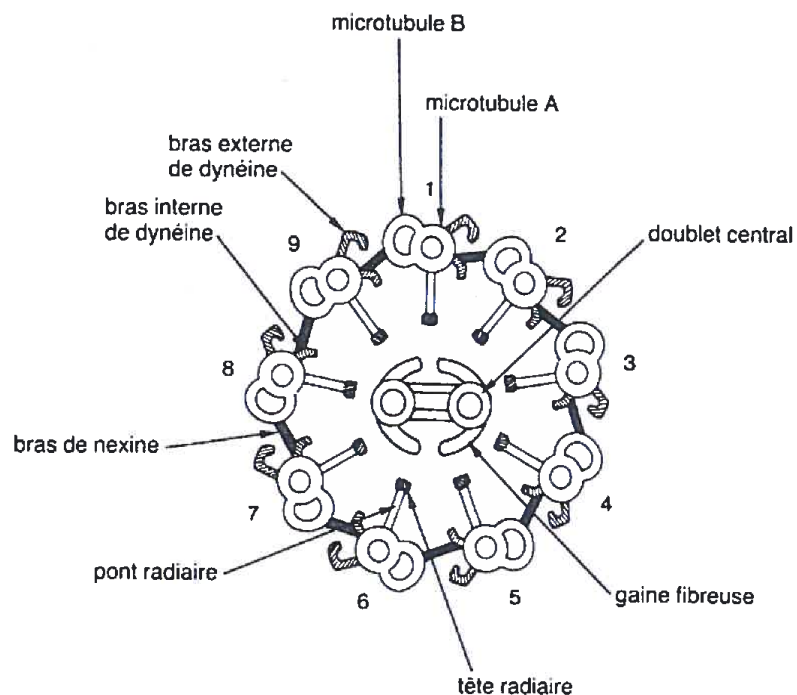
D. Structure du flagelle

a. L'axonème

L'axonème, présent sur toute la longueur du flagelle, possède une structure complexe. Il est constitué de deux microtubules centraux, eux-mêmes entourés par neuf doublets de microtubules périphériques. Chaque doublet de microtubules périphériques est constitué d'un microtubule A et d'un microtubule B. Les microtubules A sont constitués de 13 protofilaments (hétérodimères d' α et β -tubuline). Les microtubules B accolés sont incomplets (9 à 11 protofilaments). Diverses protéines

accessoires viennent s'ancrer sur les microtubules périphériques. Parmi elles, des bras de dynéine viennent s'insérer au niveau des microtubules A [12], [48]. Les bras de dynéine ne sont pas tous activés en même temps, permettant ainsi la courbure du flagelle. Ils glissent le long des microtubules induisant ainsi le mouvement périodique et oscillatoire du flagelle [49]. De plus l'axonème comprend neuf ponts radiaux provenant chacun d'un des neuf doublets de microtubules périphériques. Ces ponts radiaux se projettent vers le doublet central de façon hélicoïdale [50] (Figure 10).

Figure 10 : Représentation schématique du complexe axonémal de la queue du spermatozoïde [37]



Des structures accessoires entourent l'axonème. Ces structures et leurs fonctions varient en fonction de la partie du flagelle [44].

b. Pièce intermédiaire

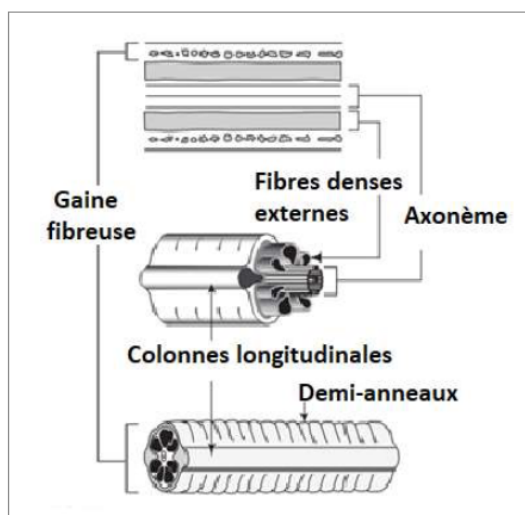
Au niveau de la pièce intermédiaire, l'axonème est entouré de 9 fibres denses externes. Ces fibres sont formées par l'association entre des filaments intermédiaires et des protéines structurellement proches de la kératine. Ces fibres denses externes permettent donc de conférer élasticité et stabilité aux spermatozoïdes [45].

On trouve également dans cette partie du flagelle la gaine mitochondriale. Il s'agit d'une hélice de mitochondries enroulée autour des fibres denses externes. Cette gaine possède plusieurs rôles essentiels. Elle permet notamment la production d'énergie sous forme d'Adénosine tri-phosphate (ATP).

c. Pièce principale

La gaine mitochondriale ainsi qu'une partie des fibres denses externes font place à une gaine fibreuse. Elle est formée de deux colonnes filamenteuses positionnées longitudinalement en regard des doublets périphériques 3 et 8 de l'axonème. Des demi-anneaux viennent s'empiler et s'ancrer sur ces deux colonnes. Cette structure confère une résistance mécanique importante au flagelle (Figure 11).

Figure 11 : Représentation schématique de la gaine fibreuse [44]



De nombreuses protéines s'ancrent dans la gaine fibreuse. A l'heure actuelle on en dénombre une vingtaine [51]. Ces protéines possèdent des rôles divers que l'on peut classer en deux principales catégories [52] :

- **Protéines nécessaires à la glycolyse :**

C'est notamment le cas de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et de l'Hexokinase 1 (HK1) par exemple. En effet, si la gaine mitochondriale permet la production d'une partie de l'ATP, la source d'énergie principale des spermatozoïdes est la production d'ATP via la glycolyse [53].

- **Protéines nécessaires à la transduction du signal :**

La gaine fibreuse contient de nombreuses protéines impliquées dans diverses voies de signalisation telle que la voie de l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'activation de cette voie permet la phosphorylation de protéines par l'intermédiaire de la Protéine kinase A (PKA). La voie de signalisation de l'AMPc est impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires comme la maturation des spermatozoïdes, la motilité, la capacitation, l'hypermotilité et la réaction acrosomique [51], [52]. Parmi les protéines impliquées, l'A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) et l'A-Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) représentent les deux protéines principales de la gaine fibreuse [49].

d. Pièce terminale

Dans cette partie, le flagelle n'est constitué que de l'axonème [44].

E. Bases structurelles et moléculaires de la motilité spermatique

Les spermatozoïdes présentent deux types de motilité [51] :

- La motilité progressive : Des ondes symétriques se propagent le long du flagelle et conduisent à une propulsion linéaire permettant la progression dans l'utérus.
- L'hypermotilité : elle apparaît lors de la capacitation. Elle se caractérise par des ondes asymétriques possédant une fréquence et une amplitude plus élevées. Ces mouvements flagellaires, dits « en coup de fouet », sont asymétriques et rythmiques en trois dimensions. Ils permettent aux spermatozoïdes de se détacher de la muqueuse utérine et de traverser la zone pellucide. Ils sont donc nécessaires à la fécondation [51].

Les oscillations du flagelle sont permises par le glissement réciproque de chaque paire de microtubules, provenant de l'ancrage des bras de dynéine sur le doublet voisin. La liaison des microtubules à la gaine fibreuse rigide et la présence de fibres denses externes asymétriques évite les mouvements plans, ce qui confère une forme hélicoïdale en trois dimensions aux mouvements flagellaires [54].

La gaine mitochondriale fournit une partie de l'énergie nécessaire au mouvement du flagelle sous forme d'ATP. Cette ATP va être consommée par les dynéine-ATPases lors de cycles de polymérisation/dépolymérisation. Mécaniquement, cela se traduit par des cycles d'attachement/détachement des bras de dynéine permettant le glissement des microtubules les uns par rapport aux autres et se répercutant de proche en proche le long du flagelle [49].

La phosphorylation oxydative mitochondriale a longtemps été considérée comme la principale source d'énergie du flagelle. On sait aujourd'hui que ce n'est pas le cas. La voie glycolytique constitue la principale source d'ATP. Il s'agit d'une production locale d'énergie puisque comme nous l'avons vu, on retrouve des enzymes glycolytiques (GAPDH, HK1) au sein même de la gaine fibreuse [53], [55].

Par ailleurs, deux voies métaboliques de signalisation sont essentielles dans la régulation de la motilité : la voie PKA et la voie du calcium. En effet, la phosphorylation des protéines AMPC-dépendante via la voie de signalisation de la PKA est décrite comme un mécanisme central de la motilité des spermatozoïdes. De plus, les mitochondries de la gaine mitochondriale sont une réserve d'ions calcium qui est un modulateur de l'hyperactivation du mouvement flagellaire, de la capacitation et de la réaction acrosomique.

- Le spermatozoïde, produit au cours de la spermatogénèse, est une cellule hautement différenciée dont la structure est adaptée à sa fonction.
- Le flagelle constitue le moteur du spermatozoïde. Celui-ci est notamment constitué d'une gaine fibreuse. En plus d'assurer une résistance mécanique, la gaine fibreuse regroupe des protéines impliquées dans la production d'énergie et dans la transduction du signal dont l'AKAP4.

III. Le sperme en routine : conservation et évaluation de la qualité

En 2000, les statistiques mondiales relatives à l'insémination artificielle faisaient état d'une production de 232 millions de doses ; 11 millions de celles-ci étant utilisées en frais, le reste en congelé [56]. L'utilisation de semence fraîche pour l'insémination bovine est donc dérisoire. Il en est de même dans le contexte de FIV où le recours à la semence congelée est quasi systématique.

A. Cryoconservation du sperme

a. Modalité de la cryoconservation

Le sperme est conditionné dans des paillettes. Les dilueurs sont des composants essentiels des paillettes permettant de protéger les spermatozoïdes du choc thermique de la congélation. Ces dilueurs sont composés de différentes substances :

- **Des agents cryoprotecteurs** : Leur rôle est de protéger les spermatozoïdes du stress physique et chimique généré par la congélation. On distingue deux types d'agents cryoprotecteurs :
 - Agents non pénétrants : ils entraînent une déshydratation intracellulaire par hyperosmose. Le lait ou encore le jaune d'œuf en sont des exemples.
 - Agents pénétrants : c'est le cas du glycérol, largement utilisé. De même, il est responsable d'un phénomène d'hyperosmose entraînant un flux d'eau du spermatozoïde vers son milieu. De plus, le glycérol traverse la membrane plasmique. Les radicaux hydroxyles vont alors former des liaisons avec les molécules d'eau, permettant de « capturer » l'eau à l'intérieur de la cellule et donc de maintenir le volume cellulaire au cours de la congélation.

Du fait des effets délétères du glycérol, il est recommandé de le combiner à des agents non pénétrants.

- **Des antioxydants** : ils inhibent la formation d'espèces réactives de l'oxygène et la peroxydation des lipides induite lors du stress oxydatif dû à la congélation.
- **Des substances nutritives** : Au moment de la décongélation, le métabolisme des spermatozoïdes reprend. Ils requièrent alors une source énergétique facilement utilisable et disponible. Du fructose est couramment utilisé chez les bovins.
-
- **Des solutions tampon** : Les produits du métabolisme des spermatozoïdes provoquent une acidification du milieu. Les solutions tampon sont donc utilisées pour maintenir un pH optimal (6,8 à 7).
- **Des antibiotiques** : La semence ne pouvant être stérile, l'ajout d'antibiotiques est recommandé. Le type et la quantité des antibiotiques est réglementée par

une directive européenne. La streptomycine, la pénicilline, la lincomycine et la spectinomycine sont utilisées.

Une fois mélangé au dilueur, le sperme est refroidi. Puis il est conditionné en paillettes. Les paillettes sont ensuite disposées sur une rampe de refroidissement en vue de leur congélation. Elles sont d'abord disposées dans les vapeurs d'azote à environ quatre centimètres au-dessus du niveau d'azote de la cuve. Au bout de 7 à 9 minutes la congélation est obtenue et les paillettes sont plongées dans l'azote liquide à -196°C [56].

b. Conséquences de la cryoconservation sur les spermatozoïdes

La cryoconservation des spermatozoïdes provoque une modification des membranes. En effet, en dessous d'une certaine température, appelée transition de phase, la bicouche lipidique membranaire change d'état physique. Elle perd une partie de sa fluidité et des fractions lipidiques prennent la forme de gel. Le cholestérol module la température de transition de phase : plus il y a de cholestérol, plus la température de transition de phase est basse donc la membrane résistante [57]. La membrane plasmique des spermatozoïdes de taureau contient une faible quantité de cholestérol. Cela explique donc sa sensibilité à la congélation.

La réorganisation lipidique augmente la viscosité de la membrane plasmique ; la rendant plus rigide et plus fragile. De plus, les échanges ioniques, notamment calciques, sont perturbés [58]. Le calcium jouant un rôle essentiel dans le phénomène de capacitation, la cryoconservation diminue le pouvoir fécondant des spermatozoïdes [58].

La modification de fluidité de la membrane plasmique génère également la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). A l'état physiologique les ROS sont présents dans les cellules en quantité modérée. Ils sont alors bénéfiques. Dans les spermatozoïdes, ils représentent une protection contre les agents pathogènes et jouent un rôle dans la transduction du signal au cours de la capacitation [59], [60]. La concentration des ROS est modulée par un équilibre entre leur production et leur élimination par des systèmes antioxydants. Cependant, une production trop importante ou un défaut d'élimination des ROS entraîne une rupture de cet équilibre : on parle alors de stress oxydatif. De nombreuses molécules sont susceptibles d'être attaquées par les ROS ; notamment :

- Les protéines avec la réduction des liaisons disulfures entraînant une modification de leur conformation et donc une perte de fonction
- Les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique présents dans la membrane plasmique. On parle alors de peroxydation lipidique. Les hydroperoxydes formés, notamment l'aldéhyde 4-hydroxynonéal (4-HNE), sont eux-mêmes cytotoxiques.

En effet, les hydroperoxydes sont capables de diffuser dans les différents compartiments cellulaires et peuvent se fixer aux protéines, altérant leur structure et leur fonction. De manière plus spécifique, ils peuvent s'attaquer aux :

- Protéines du cytosquelette impliquées dans le maintien de l'intégrité de l'axonème (dynéines par exemple).
- Protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale permettant la production d'ATP, source d'énergie pour le spermatozoïde.

Cela explique la diminution de motilité des spermatozoïdes à l'issue de la cryoconservation [58].

Par ailleurs, les hydroperoxydes sont également responsables d'altérations de l'ADN. Les spermatozoïdes dont l'ADN est endommagé peuvent féconder l'ovocyte mais le développement embryonnaire peut être interrompu ou altéré [58].

Toutes les modifications décrites sont en grande partie dépendante du protocole de cryoconservation utilisé ; notamment de l'utilisation de cryoprotecteurs et de la vitesse de refroidissement [58]. En revanche, le stockage dans l'azote liquide à -196°C ne semble pas délétère pour les spermatozoïdes [58].

B. Méthodes conventionnelles de l'analyse de la qualité spermatique

Pour assurer la fertilité de la semence, de nombreuses caractéristiques sont évaluées en routine dans les centres de collecte. Les paillettes doivent avoir une concentration en spermatozoïdes suffisante et ceux-ci doivent notamment présenter une motilité et une morphologie normales [61].

a. Analyse macroscopique

Immédiatement après la récolte, un examen visuel du sperme dans le tube de récolte permet d'apprécier le volume, la couleur et la consistance de l'éjaculat.

Volume : Chez le taureau, le volume moyen de l'éjaculat est de 5ml [62]. Il varie en fonction de l'âge, de la race et de l'environnement de l'animal.

Couleur : La couleur habituelle du sperme est blanchâtre. La couleur du sperme peut varier de manière physiologique (concentration en spermatozoïdes) mais aussi dans le cas de pathologies. Une couleur anormale (jaunâtre, rosée à rougeâtre, brun) indique la présence d'urine, de sang ou de pus [62]. La couleur peut donc à elle seule indiquer la présence d'une affection ou d'une lésion du tractus uro-génital.

Viscosité : Elle est directement corrélée à la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat : Plus la viscosité est élevée, plus le nombre de spermatozoïdes est important. Classiquement, le sperme a une consistance « laiteuse » à « crémeuse » [62].

pH : Sa mesure se fait à l'aide de papier pH ou d'un pHmètre. La mesure doit être faite rapidement après la récolte car le sperme s'acidifie rapidement par formation d'acide lactique. La valeur du pH doit être comprise entre 6,5 et 6,8 [62].

Test de Schalm : Ce test a pour but d'évaluer la présence de polynucléaires dans la semence, signe d'une inflammation. 2,5 ml d'un détergeant est ajouté à 0,5 ml de sperme. Après 15 secondes d'agitation, la gélification du mélange est notée de 0 à 4 [62]. Plus il y a de polynucléaires, plus le mélange sera visqueux (Tableau III).

Tableau III : Grille d'interprétation du test de Schalm [62]

| | |
|--------------------|--|
| 0 : Schalm négatif | Mélange fluide |
| 1 : Schalm 1+ | Grumeaux fugaces disparaissant en quelques minutes |
| 2 : Schalm 2+ | Grumeaux nets persistants |
| 3 : Schalm 3+ | Gros grumeaux, mélange visqueux, consistance de blanc d'oeuf |
| 4 : Schalm 4+ | Prise en masse du mélange |

b. Évaluation de la concentration

Elle est essentielle puisqu'elle permet de déterminer le taux de dilution adapté pour la réalisation de paillettes donc le volume de dilueur a utilisé.

Plusieurs techniques permettent l'évaluation de la concentration de l'éjaculat [62] :

- Comptage sous microscope optique à l'aide d'une cellule hématimétrique.
- Par spectrophotométrie : Cette technique se base sur la corrélation entre la densité optique de l'échantillon et la concentration en spermatozoïdes.
- Le compteur électronique de particules
- L'analyseur d'image (Computer-assisted sperm analysis par exemple, explicitée ci-dessous).

En moyenne, la concentration en spermatozoïdes est comprise entre $0,8 \times 10^6$ et 1×10^6 spermatozoïdes/mm³ [62].

c. Évaluation de la motilité spermatique

Elle est évaluée immédiatement après la collecte du sperme. L'éjaculat est maintenu à une température de 37°C. Le matériel en contact avec le sperme est également chauffé à 37°C pour éviter tout choc thermique.

Analyse sous microscope optique :

Cette méthode est simple et peu coûteuse. La motilité massale, c'est-à-dire le mouvement global des spermatozoïdes, est estimée au microscope à contraste de phase au grossissement x100. Elle s'évalue en observant les vagues formées. Elle est notée de 1 à 5 [62] (Tableau IV). Cette technique est donc semi-quantitative.

Tableau IV : Grille d'évaluation de la motilité massale de la semence dans l'espèce bovine [63]

| | Nature et intensité du mouvement |
|---|--|
| 0 | Aucun mouvement à la surface de la goutte |
| 1 | Léger mouvement à la surface de la goutte |
| 2 | Mouvement net mais ne formant pas de vague |
| 3 | Début de vagues |
| 4 | Vagues très nettes |
| 5 | Tourbillons nettement visibles |

La motilité individuelle peut également être évaluée et notée (Tableau V). Cette analyse n'a pas systématiquement été réalisée en routine. Elle est effectuée dans le cas d'une mauvaise motilité massale par exemple.

La motilité individuelle correspond au nombre de spermatozoïdes possédant une motilité dite fléchante c'est-à-dire possédant une trajectoire en ligne droite. Plus le nombre de spermatozoïdes fléchants est important, plus la qualité spermatique est bonne [62].

Tableau V : Grille d'évaluation de la qualité du sperme selon la motilité individuelle observée au microscope optique [62]

| % de spermatozoïdes fléchants | Qualité du sperme |
|--------------------------------------|--------------------------|
| 80% – 100% | Très bonne |
| 60% - 79% | Bonne |
| 40% à 59% | Correcte |
| < 40 % | Faible |

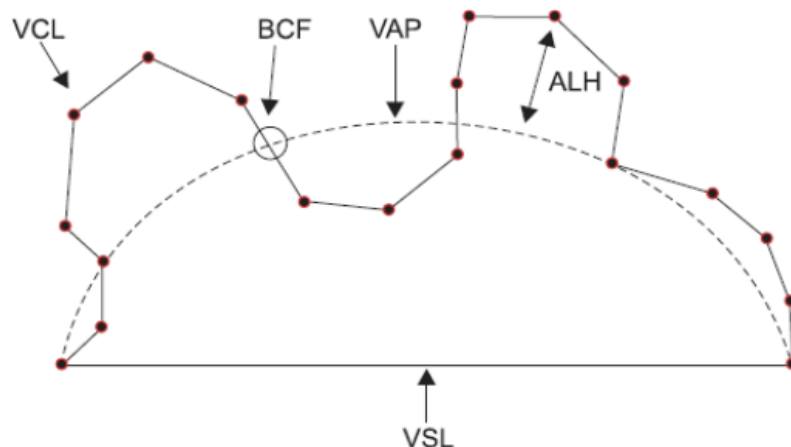
Cependant, l'évaluation de la motilité individuelle par analyse microscopique est une méthode subjective. Les résultats obtenus peuvent varier de 30 à 60% selon les manipulateurs pour un même échantillon [64]. Pour pallier à cela, des méthodes d'analyse assistée par ordinateur ont été mises au point. La plus répandue est l'analyse automatisée de la semence : CASA.

Analyse automatisée de la semence : CASA

Cette technique permet d'apprécier en détail la motilité des spermatozoïdes. La tête des spermatozoïdes est matérialisée par un point et c'est le déplacement de ce point qui va être enregistré par l'ordinateur à l'aide d'une caméra directement reliée au microscope. Cette méthode est très précise puisqu'elle analyse différentes composantes de la motilité de chaque spermatozoïde [65]. Ces paramètres sont (Figure 12) :

- Motilité totale (%) : pourcentage de spermatozoïdes mobiles
- Motilité progressive (%) : pourcentage de spermatozoïdes ayant une motilité progressive.
- Vitesse moyenne (VAP, $\mu\text{m/s}$) : vitesse de la trajectoire simplifiée en une courbe
- Vitesse de progression linéaire (VSL, $\mu\text{m/s}$) : vitesse de la trajectoire simplifiée en une droite
- Vitesse curvilinéaire (VCL, $\mu\text{m/s}$) : vitesse de la trajectoire suivie point par point par l'algorithme
- Amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH, μm) : moyenne de la largeur d'oscillation de la tête
- Fréquence du croisement des trajectoires (BCF, Hz) : fréquence de croisement entre la trajectoire réelle et la trajectoire simplifiée.
- Rectitude de la trajectoire moyenne (STR, %)
- Linéarité de la trajectoire curvilinéaire (LIN, %)

Figure 12 : Illustration des différentes composantes de la motilité analysée par la méthode CASA [66]



Même si l'analyse automatisée de la semence permet l'analyse d'un très grand nombre de spermatozoïdes et apporte plus de précisions sur la motilité, la corrélation des différents paramètres avec la qualité du sperme et la prédiction de la fertilité n'est pas encore bien établie [66]. De plus, malgré de nombreuses études sur l'optimisation des paramétrages CASA, il n'existe pas de standardisation de la technique, entraînant d'importantes variations entre les laboratoires. Ainsi, pour l'espèce bovine, bien que de nombreux centres d'insémination possèdent un analyseur CASA, la plupart semblent privilégier l'analyse subjective [66].

Chez l'Homme, plusieurs études ont démontré que la mesure de la concentration et les caractéristiques du mouvement des spermatozoïdes par les systèmes CASA sont liés de manière significative aux taux de fécondation *in vivo* et *in vitro*. Il a notamment été montré que la VCL, la VSL, l'ALH, la LIN et la VAP sont des paramètres qui peuvent prédire le succès ou non de la fécondation *in vitro* [161].

d. Évaluation de la morphologie

La morphologie des spermatozoïdes peut également être évaluée. Dans la plupart des centres de collecte, cela n'est pas fait en routine de manière systématique mais dans différents cas de figure :

- Taureaux « douteux » pour les autres analyses
- Jeunes taureaux afin d'évaluer leur fonction sexuelle en tant que futur reproducteur
- Une fois par an par le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs pour les taureaux sélectionnés dans la filière de l'insémination artificielle

D'un point de vue pratique, l'analyse morphologique s'effectue par l'observation sous microscope optique à contraste de phase ou immersion d'un étalement de semence. L'examen morphologique nécessite la coloration du sperme. Certaines colorations ont pour objectif de faire ressortir la morphologie des spermatozoïdes (colorations totales) ; les autres, dites vitales, permettent de distinguer les spermatozoïdes morts des vivants.

Le principe de la coloration vitale est d'utiliser un colorant qui ne traverse que les membranes mortes ou lésées (éosine, rose Bengale) et un colorant de fond qui facilite la lecture (nigrosine, bleu de méthylène). La coloration classiquement utilisée est l'éosine-nigrosine [62]. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants peut ainsi être déterminé. S'il est inférieur à 60% la semence n'est pas conservée.

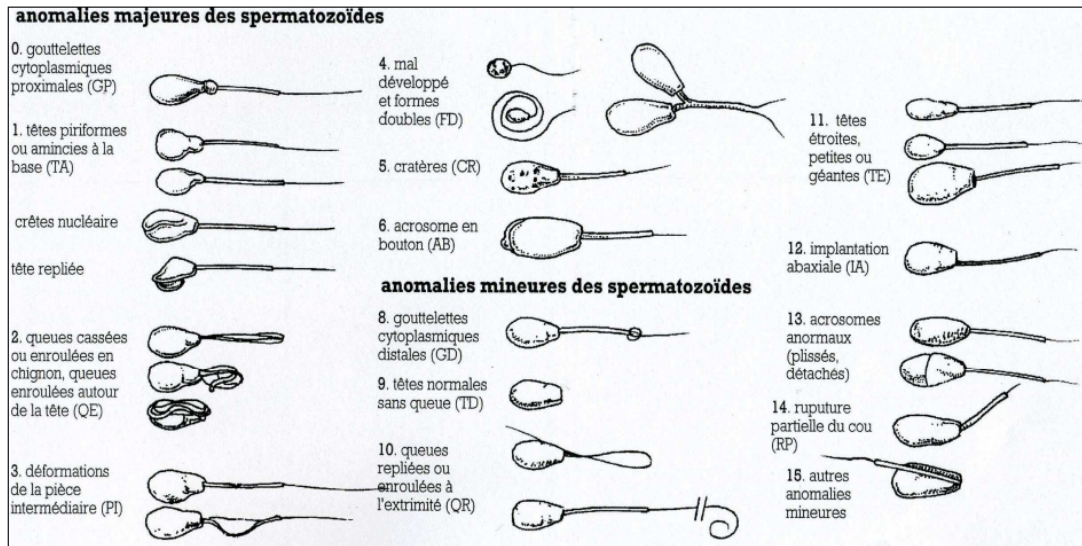
Parmi les colorations totales, certaines sont dites simples (encre de chine, bleu de méthylène par exemple) : les spermatozoïdes sont colorés de manière uniforme. Les colorations doubles (Giemsa par exemple) permettent de percevoir les différences structurales au niveau de la tête, de l'acrosome ou de la pièce intermédiaire [62].

Trois types de classifications existent :

- **Anomalies primaires et secondaires** : Les anomalies primaires correspondent aux anomalies ayant lieu lors de la spermatogénèse. Les anomalies dites secondaires surviennent lors de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes voire lors de l'éjaculation [67].
- **Anomalies majeures et mineures** : Cette classification a été proposée par Bloom en 1973. Elle se base sur la répercussion des anomalies sur la fertilité des taureaux. Elle distingue des anomalies majeures et mineures (Figure 13). Cette classification, bien que reconnue et utilisée, est limitée puisque les connaissances actuelles ne permettent pas toujours de faire le lien entre l'anomalie observée et la fertilité [67].

- **Classification utilisée par le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs** : Cette classification est plus descriptive puisqu'elle se base sur la localisation de l'anomalie sur le spermatozoïde (tête, flagelle).

Figure 13 : Anomalies majeures et mineures des spermatozoïdes dans l'espèce bovine [67]



Les analyses précédentes sont réalisées sur sperme frais, immédiatement après la récolte. Cependant, comme nous l'avons vu, la cryoconservation altérant les spermatozoïdes, il est important d'évaluer la qualité de la semence après congélation. Ainsi pour chaque éjaculat conservé dans l'azote liquide à -196°C , 2/3 paillettes sont décongelées afin d'en évaluer la motilité massale, individuelle ainsi que le pourcentage de spermatozoïdes vivants après décongélation [68] (Tableau VI).

Tableau VI : Analyses conventionnelles de la semence réalisées chez le taureau

| Examens réalisés immédiatement après récolte En vue de la conservation ou non de la semence pour congélation | | | |
|---|--|--|---|
| <p align="center">Analyse réalisée en routine Analyse non systématique Analyse rarement effectuée (réservée à quelques centres de collecte)</p> | | | |
| Analyses | Critères de décision pour la conservation et congélation | Avantages | Inconvénients |
| Analyse macroscopique Volume Couleur Consistance | Couleur blanchâtre Consistance laiteuse à crémeuse | Rapide Peu couteux Utilisable sur le terrain | Subjectif |
| Concentration Spectrophotomètre | $\geq 0,5 \times 10^6$ spermatozoïdes/ml | Rapide Peu couteux Utilisable sur le terrain Précision suffisante | |
| Motilité massale Microscope optique | Note ≥ 3 (70% de spermatozoïdes mobiles) | Rapide Peu couteux Utilisable sur le terrain | Subjectif |
| Motilité individuelle | > 60% | Microscope optique Peu couteux Utilisable sur le terrain | Subjectif |
| | | Analyseur d'images (type CASA) | Très précis (motilité décomposée en plusieurs paramètres) Grand nombre de spermatozoïdes analysés Non utilisable sur le terrain Pas de standardisation du paramétrage à l'origine de variations inter laboratoires |
| Pourcentage de spermatozoïdes vivants | > 60% | Rapide Peu couteux Utilisable sur le terrain | |
| Morphologie Microscope optique | Pourcentage de spermatozoïdes anormaux totaux < 20-25% | Rapide Peu couteux Utilisable sur le terrain | Nécessite de l'expérience Subjectif Chronophage |
| Test d'aptitude à la congélation : Examens réalisés sur 2-3 paillettes après décongélation (conservation à -196°C dans l'azote liquide) Analyse réalisée en routine | | | |
| Analyses | Critères de décision pour la conservation du reste de l'éjaculat | | |
| Motilité massale | Note ≥ 3 | | |
| Motilité individuelle | > 60% | | |
| Concentration (Pourcentage de spermatozoïdes vivants après décongélation) | $\geq 0,5 \times 10^6$ spermatozoïdes/ml | | |

C. Limites des méthodes conventionnelles

Même si toutes ces analyses conventionnelles restent un outil de choix dans l'évaluation en routine des facteurs de la fertilité, dans les faits, elles ne reflètent pas toujours le potentiel de reproduction. Cela se traduit par un taux de réussite à l'insémination peu élevé. D'après l'institut de l'élevage, en 2022, le taux de non-retour en chaleur (18-90 jours) après insémination artificielle première sur femelles laitières est de 60% (semence congelée). Il y a plusieurs explications à cela :

- Tout d'abord, il est important de rappeler que la fertilité ne dépend pas que du taureau. Elle dépend également de la femelle ainsi que de nombreux facteurs environnementaux. Ainsi des éléments tels que l'âge, la race, la conduite d'élevage (alimentation, détection des chaleurs etc.), la saison etc. sont autant de facteurs pouvant impacter la fertilité.
- De plus, il apparaît que les analyses conventionnelles sont assez mal corrélées à la fertilité [69],[70],[71]. D'autres outils de contrôle de la qualité spermatique tels que l'évaluation de l'intégrité de la membrane plasmique, l'évaluation de la fonction mitochondriale, de l'intégrité du matériel acrosomique, l'évaluation du stress oxydatif, de l'état de condensation de la chromatine etc. peuvent venir compléter l'analyse de routine afin de donner plus d'informations concernant la qualité spermatique de l'échantillon. Malgré le recours à ces techniques, notamment en médecine humaine, toutes ces analyses restent insuffisantes. C'est dans ce contexte que la recherche se tourne aujourd'hui vers de nouvelles techniques dites « omiques » telles que la génomique, la transcriptomique ou encore la protéomique.
-

D. Intérêt de la protéomique dans l'analyse de la qualité spermatique

La protéomique est l'étude de l'ensemble des protéines d'un organisme ; évaluant notamment l'intensité de leur expression [72]. L'analyse protéomique est une technique relativement simple. Elle repose sur plusieurs étapes [73] : 1) l'extraction des protéines de l'échantillon, 2) la purification de l'échantillon, 3) l'identification des protéines par spectrométrie de masse le plus souvent.

Le spermatozoïde se prête très bien à l'analyse protéomique car c'est une cellule aisément accessible et isolable [73]. Le protéome du spermatozoïde a largement été étudié chez de nombreuses espèces. Chez l'homme, plus de 6 000 protéines ont déjà été identifiées. Cette liste n'est pas exhaustive puisque statistiquement on estime le protéome du spermatozoïde humain à au moins 7 500 protéines différentes [74]. Les connaissances actuelles en matière de biologie cellulaire ont permis de montrer les rôles essentiels et variés de ces protéines : production d'énergie, transcription, synthèse, métabolisme, cytosquelette, motilité, etc. [75]. En ce qui concerne le protéome des spermatozoïdes bovins, plus de 3 000 protéines ont déjà été identifiées [76]. Au cours de leur passage dans l'épididyme et de la remontée des voies génitales femelles, les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant. Or ces étapes de maturation et de capacitation sont marquées par des modifications post traductionnelles des protéines, notamment des phosphorylations [54].

Tout cela permet d'envisager le protéome comme le reflet de la « santé » des spermatozoïdes et pourrait ainsi permettre de prédire la qualité du sperme et notamment la fertilité [54].

- Que ce soit pour l'insémination artificielle ou la fécondation *in vitro*, la semence est classiquement utilisée sous forme congelée (conservée dans l'azote liquide à -196°C). La cryoconservation est délétère pour les spermatozoïdes ; notamment par le remaniement des membranes et la génération de stress oxydatif. En résulte une diminution de la motilité et du pouvoir fécondant.
- De nombreuses analyses permettent d'évaluer la qualité de la semence avant et après cryoconservation. Certains tests sont faits en routine (analyse macroscopique, concentration, motilité) et d'autres nécessitent du matériel spécifique qui n'est pas disponible dans tous les centres.
- La fertilité est multifactorielle. Elle dépend de caractéristiques mâle, femelle et de facteurs environnementaux. Aussi, la prédiction du potentiel de fertilité est complexe. Cependant, il apparait que les analyses conventionnelles du sperme sont mal corrélées à la fertilité. Pour cela, la recherche se tourne aujourd'hui vers les méthodes dites « omiques ».
- La protéomique envisage les protéines comme le reflet de « l'état de santé » des cellules. Appliquée au spermatozoïde, l'étude protéomique pourrait ainsi permettre d'évaluer la qualité du gamète mâle de et donc d'en prédire la fertilité.

Depuis plusieurs années, différentes protéines ayant davantage d'implication dans la fertilité ont été étudiées. Chez le taureau, une étude récente a retenu 125 protéines comme étant des marqueurs potentiels de la fertilité [7]. Parmi elles : L'A-Kinase Anchor Protein 4 (AKAP4). Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la proAKAP4, avant d'être intégrée à la gaine fibreuse des spermatozoïdes. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons tout particulièrement à cette protéine.

De nombreux travaux envisagent la proAKAP4/AKAP4 comme un biomarqueur de la qualité spermatique. Un grand nombre d'études ont, en effet, mis en lumière des corrélations entre les niveaux de proAKAP4/AKAP4 et les paramètres conventionnels de qualité de la semence tels que la motilité ou la morphologie des spermatozoïdes.

Dans cette partie nous présenterons une synthèse des connaissances sur la proAKAP4/AKAP4 en médecine humaine et vétérinaire tant du point de vue de sa biochimie que de son lien avec la qualité de la semence.

IV. proAKAP4/AKAP4 : biomarqueur de la qualité spermatique

Dans les années 1980, des études ont été menées chez le rat visant à étudier les composants de la gaine fibreuse du flagelle du spermatozoïde [77], [78], [79]. Ces études avaient alors mis en évidence une protéine quantitativement importante de la gaine fibreuse sans l'étudier davantage.

En 1994, Carrera et al. reprirent ces études [80]. Après avoir isolé les structures accessoires du flagelle, ils ont mis en évidence par Western blot une entité majeure possédant un poids moléculaire d'environ 82 000 Mr (Mr pour Masse moléculaire relative) et appellent donc cette protéine p82. Cette protéine est aujourd'hui connue sous le nom d'A-Kinase Anchor Protein 4.

A. Biochimie de la proAKAP4/AKAP4

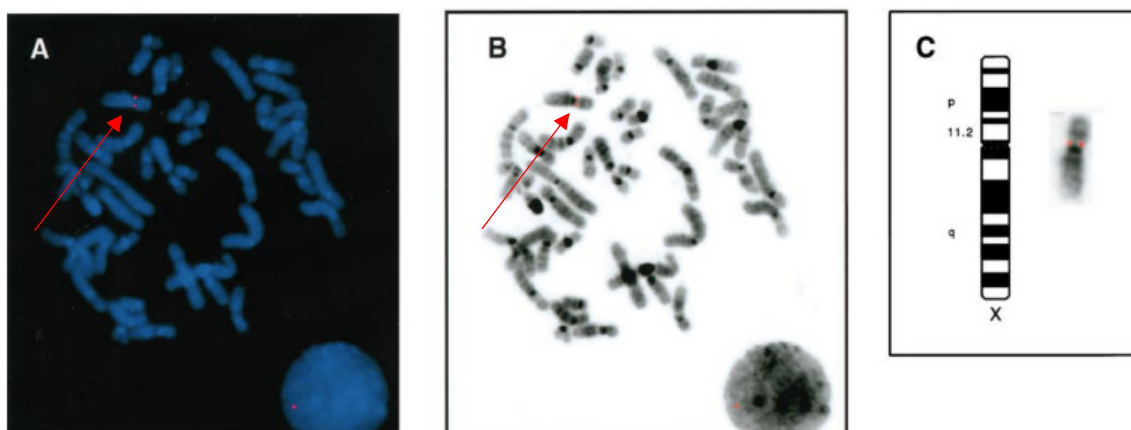
a. Synthèse dans l'espace et le temps

i. Localisation et expression du gène

En 1998, Turner et al. ont cartographié le gène AKAP4 humain sur le chromosome X, au locus Xp11.2 grâce à la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) [81] (Figure 14).

A ce jour, chez toutes les espèces de mammifères dont la cartographie génétique a été réalisée, le gène AKAP4 est porté par le chromosome X ([82], [83], [84]). Il s'agit donc d'un héritage maternel.

Figure 14 : Identification et localisation du gène AKAP4 chez l'Homme sur le chromosome X, au locus Xp11.2 [81]

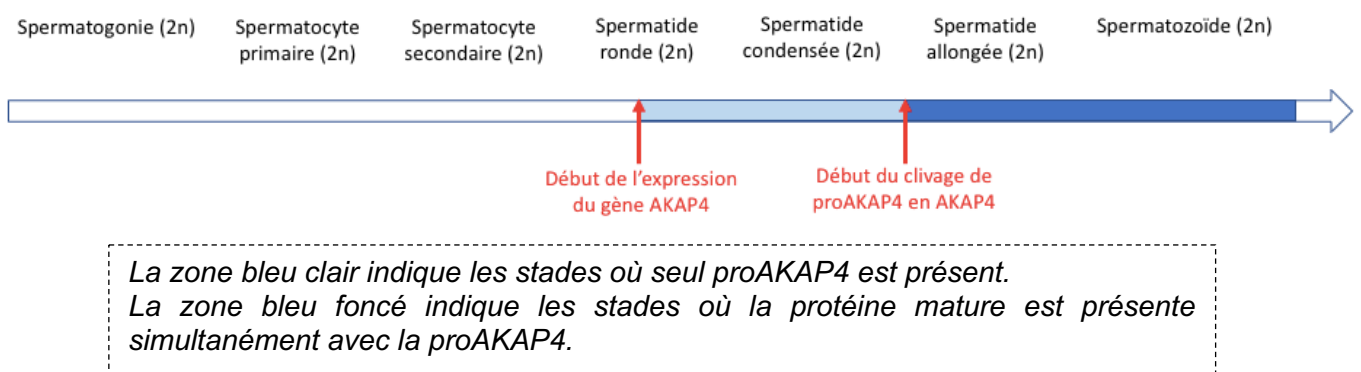


A/B : Hybridation fluorescente *in situ* de chromosomes métaphasiques humains. Les points rouges indiqués par les flèches localisent le gène dans la partie du chromosome X adjacente au centromère

C : Représentation schématique du chromosome X humain montrant l'emplacement de la bande 11.2 adjacente au centromère

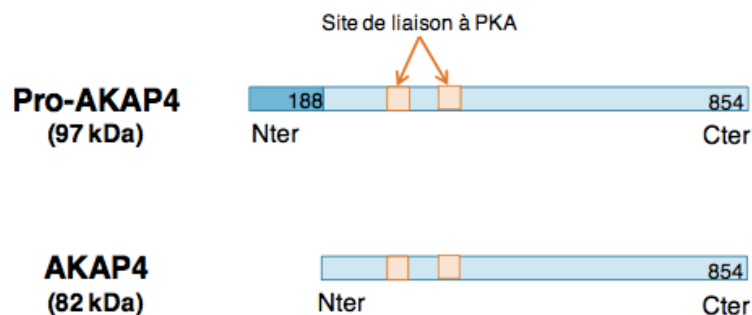
Dès leur découverte en 1994 et bien que le gène AKAP4 ne soit pas encore connu, Carrera et al. se sont intéressés à son expression et plus particulièrement au moment d'apparition de la protéine au cours de la spermiogénèse. Ils ont mis en évidence le fait que l'AKAP4 n'est pas retrouvée dans les extraits de cellules de stades antérieurs aux spermatozoïdes (spermatocytes primaires, spermatides rondes, spermatides condensées). En revanche, à partir du stade de spermatides rondes, ils ont mis en évidence la présence d'une protéine d'environ 97 000 Mr (Mr pour masse moléculaire relative). Ils suggèrent alors que p82 est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur [80] (Figure 15).

Figure 15 : Représentation schématique de l'apparition de l'AKAP4 au cours de la spermatogénèse



Cela est effectivement vérifié aujourd'hui. Le gène codant pour l'AKAP4 n'est exprimé que tardivement pendant la spermatogénèse : en phase post méiotique. La protéine est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur d'environ 97 kDa (acides aminés 1-854) au stade spermatide ronde. Le précurseur est ensuite clivé dès les stades spermatide condensée et spermatide allongée pour donner la protéine mature (acides aminés 189-854) qui sera par la suite intégrée au spermatozoïde [85], [49], [86], [81], [87] (Figure 16).

Figure 16 : Représentation schématique de la protéine AKAP4 et de son précurseur [54]



Le pro-domaine est représenté en bleu foncé (acides aminés 1 à 188). Il est par la suite clivé pour donner la protéine mature. Les sites de liaison à la PKA sont représentés en orange.

ii. Assemblage au sein de la gaine fibreuse

L'assemblage du flagelle du spermatozoïde, et plus particulièrement celui de la gaine fibreuse, est un évènement crucial ayant lieu au cours de la spermatogénèse. En 1997, Johnson et al. ont étudié ce mécanisme pour la protéine AKAP4 chez la souris [86].

L'assemblage de la gaine fibreuse s'effectue depuis la partie distale de la queue vers la tête du spermatozoïde. La structure étroite du flagelle en développement implique que les protéines nécessaires au fonctionnement du spermatozoïde soient synthétisées au niveau du cytoplasme des spermatides puis transportées vers leur site d'assemblage [86]. Ainsi, la proAKAP4 est synthétisée au niveau des corps cellulaires dans les spermatides [86]. La proAKAP4 est ensuite transportée vers son site d'assemblage. La majorité de proAKAP4 y est convertie en AKAP4 avec le clivage du pro-domaine. Une partie de ces pro-domaines n'est pas dégradée et reste détectable dans les spermatozoïdes matures. Enfin, une partie de la proAKAP4 n'est pas clivée et se retrouve dans les spermatozoïdes matures sous une forme phosphorylée [86].

Plusieurs hypothèses ont été évoquées concernant l'intérêt d'un précurseur. Le précurseur proAKAP4 serait incapable de s'assembler et ainsi permettrait d'éviter l'agrégation de protéines dans le cytoplasme des spermatides au détriment de la gaine fibreuse [86]. De plus, le clivage du pro-domaine pourrait inhiber le transport de la protéine mature vers un autre endroit que son site d'assemblage et favoriserait donc son incorporation au sein de la gaine fibreuse [86].

iii. Localisation dans les spermatozoïdes

La recherche d'AKAP4 par microscopie immunofluorescente indique que la protéine est exclusivement présente dans la partie principale du flagelle. Plus précisément au sein de la gaine fibreuse, au niveau des colonnes longitudinales et des demi anneaux. Elle n'est pas retrouvée dans l'axonème, les fibres denses externes et le liquide séminal [80], [86], [88] (Figure 17).

Concernant le précurseur proAKAP4, sa localisation dans les spermatozoïdes suscite plus de questionnements. Elle semble présenter des variations en fonction du stade de maturation des spermatozoïdes ainsi que de l'espèce.

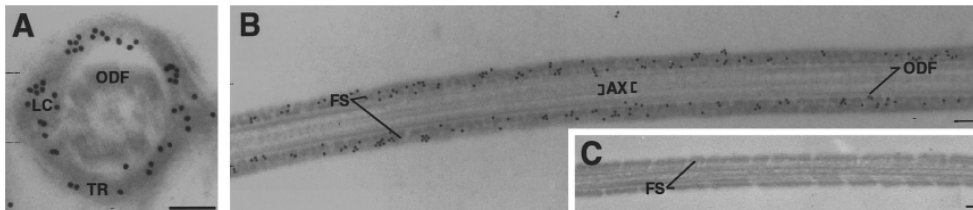
Chez la souris : La proAKAP4 a été mise en évidence sur toute la longueur de la pièce principale des spermatozoïdes testiculaires. En revanche, dans les spermatozoïdes épидидymaires, elle est uniquement présente dans le tiers proximal de la pièce principale du flagelle. Cela suggère donc que le précurseur est clivé selon une direction distale à proximale [86], [89].

Chez l'homme : La proAKAP4 est présente sur toute la longueur de la gaine fibreuse. Cela suggère donc soit que le précurseur est moins clivé que chez la souris ; soit que le clivage de proAKAP4 s'effectue tout le long de la gaine fibreuse et non selon une direction particulière comme c'est le cas chez la souris [81], [89]

Chez les bovins : La proAKAP4 est aussi présente sur toute la longueur de la gaine fibreuse [90].

L'AKAP4 et la proAKAP4 sont les principaux constituants de la gaine fibreuse. C'est à ce titre qu'AKAP4 est également prénommée Fibrous Sheath Component 1 (FSC1). Chez la souris, les deux formes représentent 40% des composants de la gaine fibreuse [53].

Figure 17 : Immunolocalisation de l'AKAP4 par microscopie électronique chez la souris [80]



A : Section transversale / B : Section longitudinale / C : Section de contrôle (témoin négatif)

FS : Fibrous Sheath = Gaine fibreuse / LC : Longitudinal columns = Colonnes longitudinales

TR : Transverse ribs = Demi anneaux / ODF : Outer dense fibers = Fibres denses externes

AX : Axoneme = Axonème

On observe une immunoréactivité (traduisant la présence d'AKAP4) tout le long de la gaine fibreuse incluant les colonnes longitudinales et les demi anneaux. Aucune immunoréactivité n'est observée au niveau de l'axonème et des fibres denses externes

b. Domaines et sites de fixation

Lors de leur découverte en 1984, Carrera et al. ont constaté que la séquence d'acides aminés de p82 possédait des similitudes avec la famille des AKAPs dont certains membres étaient déjà connus. En effet, la séquence alors déterminée possédait des régions homologues aux domaines d'ancrage d'AKAP75 et d'AKAP79 [80]. C'est à ce titre que la protéine a aussi été nommée AKAP82.

La famille des AKAPs compte à l'heure actuelle une cinquantaine de membres. Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions telles que la reproduction (AKAP3, AKAP4), la mémoire (WAVE1, AKAP150), la fonction cardiaque (AKAP13), la sécrétion d'insuline (AKAP79) etc. L'AKAP4 est le premier membre de la famille des AKAPs ayant été identifié comme spécifiquement associé aux flagelles des spermatozoïdes [49].

Les protéines de cette famille possèdent des propriétés structurales communes, que l'on retrouve donc dans l'AKAP4 [49] (Figure 18) :

- Un domaine de liaison à la PKA
- Une séquence de localisation
- La capacité à former des complexes supramoléculaires

Domaine de liaison à la PKA :

Il s'agit d'une hélice amphiphatique composée d'une vingtaine de résidus d'acides aminés. Cette hélice se lie à la sous-unité régulatrice de la PKA : RII (pour la majorité des AKAPs) ou RI. On peut relever que certaines AKAPs ont la possibilité de se lier aux deux formes de la PKA [49] (Figure 18).

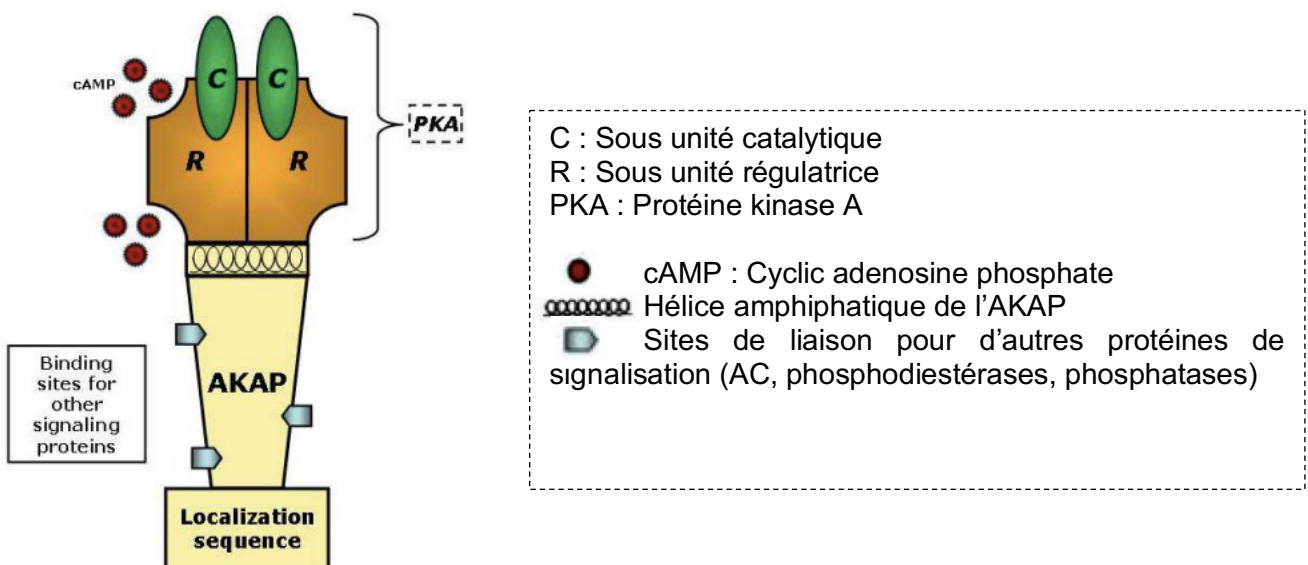
Séquence de localisation :

Les AKAPs peuvent se trouver dans différents compartiments cellulaires : membrane plasmique, golgi, centrosome, noyau, mitochondries ou ancré dans la gaine fibreuse pour AKAP4. Cette localisation spécifique de la protéine est permise par la présence d'une séquence de localisation (par exemple des séquences de reconnaissances des phospholipides permettant un ancrage à la membrane plasmique) [49]. Cette séquence détermine le lieu d'action de la protéine (Figure 18).

Capacité à former des complexes supramoléculaires :

Toutes les AKAPs possèdent des sites de liaisons à d'autres protéines également impliquées dans la signalisation, notamment des enzymes impliquées dans la voie de signalisation de l'AMPc telles que l'adénylyl cyclase (AC), des phosphodiesterases, des phosphatases, etc. [49] (Figure 18). Concernant AKAP4, on retrouve, entre autres, des sites de liaison pour PKA, PKC, PKD, protéine phosphatase 1 (PP1), glycogène synthase kinase 3 (GSK3), phosphodiesterase (PDE).

Figure 18 : Représentation schématique de la structure des AKAPs [49]



c. Une protéine présente chez de nombreuses espèces

Après sa découverte chez la souris et le rat, la proAKAP4/AKAP4 a été identifiée et étudiée chez de très nombreuses espèces (Tableau VII).

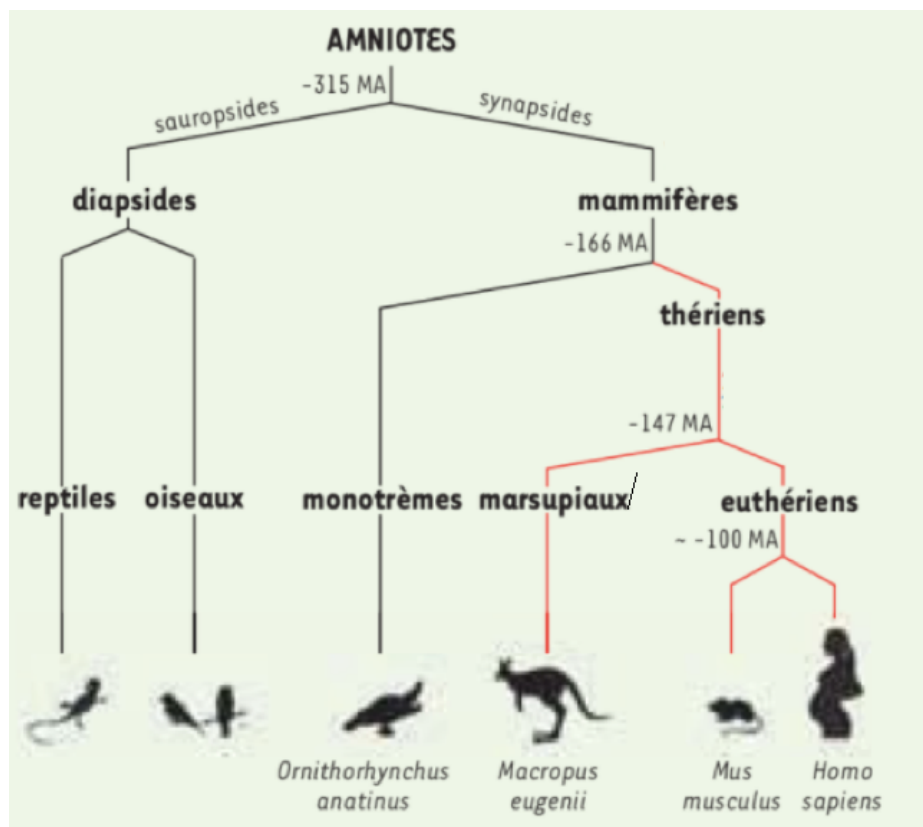
Tableau VII : Découverte de l'AKAP4 chez différentes espèces

| Espèce | Année de découverte | Scientifiques à l'origine de la découverte | Lien vers l'étude |
|---|----------------------|--|---|
| Rat | 1976 1988 1989 | <i>Olson et al.</i> <i>Oko et al.</i> <i>Brito et al.</i> | [77], [78], [79] |
| Souris | 1994 | <i>Carrera et al.</i> | [80] |
| Homme | 1996 1998 1998 | <i>Carrera et al.</i> <i>Turner et al.</i> <i>Mohapatra et al.</i> | [80], [81], [87]27/10/2024 21:39:00 |
| Bovin | 1999 | <i>Moss et al.</i> | [91] |
| Porc | 2008 | <i>Teijeiro et al.</i> | [92] |
| Bélier, Bouc | 2020 | <i>Riesco et al.</i> | [93] |
| Cheval | 2005 | <i>Turner et al.</i> | [94] |
| Âne | 2020 | <i>Tian et al.</i> | |
| Chien | 2021 | <i>Le Couazer et al.</i> | [95] |
| Hamster | 2002 | <i>Jha et al.</i> | [96] |
| Buffle | 2011 | <i>Jagan Mohanarao et al.</i> | [97] |
| Alpaga | 2018 | <i>Ugarelli et al.</i> | [98] |
| Dromadaire | 2021 | <i>Malo et al.</i> | [99] |
| Guépard | 2015 | <i>Dobrynin et al.</i> | [100] |
| Marsupiaux (Wallaby tamarin, Opossum, Ornithorynque, Koala) | 2009 2021 | <i>Hu et al.</i> <i>Skerrett-Byrne et al.</i> | [83], [84] |
| Lézard Crocodile | 2016 2019 | <i>Sarkar et al.</i> <i>Nixon, Jonhston et al.</i> | [101], [102] |

De nombreux auteurs ont étudié le degré de conservation de l'AKAP4 à travers les différentes espèces, notamment via l'alignement des séquences d'acides aminés. L'AKAP4 s'avère être une protéine hautement conservée au sein du règne animal. Une étude publiée en 2020 montre plus de 50% d'homologies après comparaison de 24 espèces de mammifères. Au sein de toute la séquence d'AKAP4, certaines régions sont mieux conservées : le site de clivage du pro domaine et les sites de fixation aux sous-unités de la PKA [82].

Parmi toutes les espèces étudiées, on constate évidemment la prédominance des mammifères dit euthériens ou placentaires (Figure 19). Cependant des études portent également sur des mammifères non euthériens ou des reptiles [83], [84], [101], [102]. En 2009, Hu et al. ont montré par l'alignement des séquences d'acides aminés que les orthologues AKAP4 du Wallaby et de l'Ornithorynque étaient hautement conservés avec ceux de l'Homme et de la souris notamment. Cela montre donc un degré élevé de conservation pendant presque 150 millions d'années d'évolution. Plus récemment, en 2019, Nixon et al. ont identifié AKAP4 dans le protéome des spermatozoïdes des crocodiles ce qui repousserait encore le moment d'apparition d'AKAP4.

Figure 19 : Rappels phylogénétiques [82]

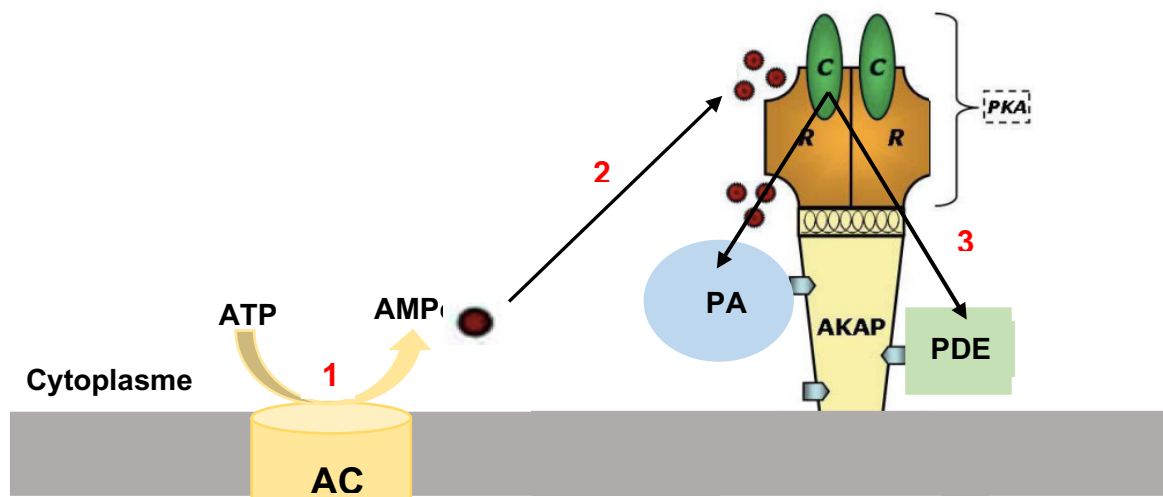


d. Coordination de la réponse intracellulaire au sein du spermatozoïde

La signalisation intracellulaire est un mécanisme physiologique essentiel dans de nombreuses cellules. C'est notamment le cas pour les gamètes mâle et femelle dans lesquels la réponse à un stimulus par l'augmentation rapide des teneurs en protéines n'est pas possible du fait de la condensation de l'ADN. Ainsi, dans les spermatozoïdes notamment, la réponse cellulaire à des stimuli repose sur des cascades rapides de signalisation intracellulaire basées sur des modifications post-traductionnelles des protéines telles que des cycles de phosphorylation/déphosphorylation.

Les protéines de la famille des AKAPs jouent le rôle d'échafauds permettant de regrouper des enzymes et leurs substrats et ainsi de coordonner de manière spatio-temporelle la signalisation intracellulaire. Comme nous l'avons vu les AKAPs forment des complexes supramoléculaires notamment avec des protéines de la signalisation. On parle notamment du complexe AKAP/PKA/AMPC (Figure 20). Le complexe AKAP/PKA/AMPC permet de cloisonner la réponse à un stimulus au sein de la cellule. La séquence de localisation décrite précédemment permet de déterminer le lieu d'action précis de la protéine AKAP. Celle-ci se lie à la sous unité régulatrice de la PKA ce qui lui permet de diriger la PKA vers un emplacement cellulaire précis. De cette façon, les protéines sont phosphorylées de manière compartimentée [49], [103] (Figure 20).

Figure 20 : Représentation schématique du complexe AKAP/PKA/AMPC



C : Sous unité catalytique
kinase A

R : Sous unité régulatrice

PKA : Protéine

1. L'adénylyl cyclase (AC) catalyse la production d'AMPC à partir d'ATP. Il existe différentes isoformes de cette enzyme : l'adénylyl cyclase transmembranaire et l'adénylyl cyclase soluble. Les études récentes suggèrent que la forme transmembranaire est couplée aux complexes AKAP. La stimulation de l'adénylyl cyclase transmembranaire entraîne la production rapide et localisée d'AMPC.

2. L'AMPC produite va entraîner l'activation de la PKA liée à la protéine AKAP. L'AMPC n'aura pas d'effet sur les PKA situées dans d'autres compartiments cellulaires.

3. La PKA activée va ensuite phosphoryler ces substrats : phosphodiéstérases (PDE), phosphatases (PA) également ancrés par l'AKAP et initiateurs d'une cascade de signalisation.

- Le gène de l'AKAP4 est issu d'un héritage maternel. Il est exprimé tardivement au cours de la spermatogénèse. Le spermatozoïde étant incapable de transcription/traduction, l'ensemble du stock de proAKAP4 est synthétisé lors de la spermatogénèse.
- L'AKAP4 est une molécule très conservée au sein du règne animal.
- L'AKAP4 est d'abord synthétisé sous la forme d'un précurseur : la proAKAP4. Celui-ci est par la suite clivé afin de permettre l'assemblage de l'AKAP4 au sein de la gaine fibreuse.
- L'AKAP4 appartient à la famille des AKAP. Elle possède les propriétés structurales propre à cette famille que sont un domaine de liaison à la PKA, une séquence de localisation et la capacité à former des complexes supramoléculaires.
- L'AKAP4 joue le rôle d'échafaud permettant de regrouper enzymes et substrats. Elle permet ainsi la coordination spatio-temporelle de la réponse intracellulaire.

B. Rôles de proAKAP4/AKAP4 au sein du spermatozoïde et conséquences d'une défection ou d'une diminution de proAKAP4/AKAP4 sur la fertilité

La fertilité est définie comme la capacité à se reproduire. En reproduction sexuée, les deux individus doivent produire des gamètes fertiles qui pourront, après la fécondation, aboutir à la production d'un embryon. La fertilité est un enjeu majeur en élevage : que ce soit pour la production de viande ou l'initiation d'une lactation, l'objectif premier est la naissance d'un veau. Un grand intérêt est donc porté à la prédiction de la fertilité.

La tâche n'est pas simple puisque, comme rappelé plus haut, la fertilité est multifactorielle. Son évaluation peut se faire par des mesures directes ou indirectes. En élevage, elle s'apprécie directement par le taux de gestation, le taux de réussite à l'IA ou encore le taux de non-retour en chaleur. Indirectement, le potentiel de fertilité s'évalue à travers l'étude de paramètres corrélés à la fertilité, tel que la motilité. C'est l'objectif des méthodes d'analyse conventionnelles décrites précédemment. Cependant, comme nous l'avons vu, ces paramètres apparaissent mal corrélés à la fertilité [69], [70], [71]. La proAKAP4 étant pressentie comme biomarqueur de la fertilité mâle, il est donc attendu qu'elle ait une meilleure corrélation à la fertilité afin de valider ce rôle.

Cette partie synthétise à la fois les rôles de la proAKAP4/AKAP4 au sein des spermatozoïdes et les résultats de la littérature concernant le lien, direct et indirect, entre la proAKAP4 et la fertilité.

a. Spermatogénèse et maturation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes étant produit lors de la spermatogénèse, tout facteur perturbant cette dernière aura potentiellement des conséquences sur le stock de proAKAP4 [104]. De nombreuses études ont démontré que l'expression de l'AKAP4 était modifiée dans un contexte d'exposition à des facteurs connus comme étant des perturbateurs de la spermatogénèse tel que le Vinclozolin [105], utilisé dans la conservation des fruits et légumes, ou encore le Bisphénol A [106] utilisé pour la fabrication de plastiques notamment alimentaires.

Les pathologies testiculaires peuvent également affecter la production des gamètes mâles. Les cancers testiculaires représentent une préoccupation majeure en médecine humaine. En effet, ceux-ci ont un impact majeur sur la fertilité notamment en diminuant la spermatogénèse [107]. Dans une étude publiée en 2015, Argawal et al. ont montré que l'expression d'AKAP4 était diminuée chez les patients atteints de séminome [108]. D'autres affections affectent le stock de proAKAP4 telles que les varicocèles [109] ou les épидидymites [110].

Au cours de leur migration à travers l'épididyme, les spermatozoïdes vont subir de nombreuses modifications biochimiques et fonctionnelles qui se traduisent par l'acquisition de la motilité et du pouvoir fécondant [111], [112]. L'une de ses modifications est une augmentation de l'oxydation des groupes sulfhydriles des protéines spermatiques [112]. Les groupements thiol des résidus cystéines sont des centres d'oxydo-réduction impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Il a été postulé que le changement du statut redox des spermatozoïdes épидидymaires contribue au processus de maturation [113]. Différentes études se sont intéressées aux protéines spermatiques dont le statut thiol était modifié au cours de la maturation. Parmi elles, la proAKAP4 [112]. Les conséquences de l'oxydation des groupements thiol sont encore mal comprises. Des études suggèrent que cela permettrait une stabilisation de la queue des spermatozoïdes [112]. Dans une étude publiée en 2014, Ijiri et al. envisagent les protéines dont le statut thiol est modifié comme des biomarqueurs de l'angulation du flagelle, anomalie morphologique à l'origine d'infertilité [112].

Au cours de la capacitation, les spermatozoïdes développent une motilité hyperactivée. Cette dernière est acquise suite à une multitude de changements fonctionnels et biochimiques ; notamment la phosphorylation des protéines spermatiques. Cette phosphorylation est considérée comme étant le marqueur biochimique de la capacitation [114], [115], [97]. L'AKAP4 et la proAKAP4 font partie des protéines phosphorylées au cours de la capacitation comme le démontrent des études chez la souris [115], l'homme [116], le taureau et le buffle [97]. Elles subissent une phosphorylation de leurs résidus tyrosines et sérines par les Extracellular signal-Regulated kinases (ERK) 1 et 2 sous le contrôle de la PKC [114]. En plus d'être elles-mêmes phosphorylées, il semblerait que la proAKAP4 et l'AKAP4 contrôlent la phosphorylation d'autres protéines au cours de la capacitation. En 2020, Griffin et al. ont montré qu'une baisse d'activité d'AKAP4 entraînait une réduction globale des profils de phosphorylations après capacitation [117].

Aussi, l'AKAP4 est capable de se lier et d'ancrer à la gaine fibreuse la calcium-binding tyrosin phosphorylation regulated protein (CABYR) via un domaine de régulation de la CABYR semblable au RII de la PKA [118]. Cette protéine régule le signal calcique d'induction de la capacitation. L'AKAP4 pourrait donc être impliquée dans la modulation du signal calcique à l'origine de la réaction acrosomique.

Enfin, au cours de la capacitation, les localisations de proAKAP4 et d'AKAP4 changent [114]. En plus de la pièce principale, on retrouve l'AKAP4 dans la pièce intermédiaire et en région post-acrosomale. La proAKAP4 est quant à elle déplacée vers l'acrosome. Les conséquences de ces modifications restent non élucidées mais pourraient être en lien avec le rôle de proAKAP4/AKAP4 lors de la capacitation.

b. Structure des spermatozoïdes et anomalies morphologiques

Les souris knock-out (KO) pour le gène AKAP4 sont stériles. L'analyse cytomorphologique montre que les spermatozoïdes produits sont fortement dysmorphiques. En effet, ceux-ci possèdent un développement anormal de la gaine fibreuse ainsi qu'un enroulement anormal du flagelle. La structure de la gaine fibreuse, dont AKAP4 est le composant majeur, est incomplète. La pièce principale est de diamètre réduit. Il est possible de reconnaître des colonnes longitudinales naissantes ainsi que des ébauches de demi-anneaux. Cependant même si l'organisation de base de la gaine est bien établie, le processus est incomplet sans l'incorporation d'AKAP4. En revanche, les autres structures cytosquelettiques du flagelle (fibres denses externes, axonème) présentent des structures intactes [119], [120] (Figure 21, Figure 22).

De plus, d'autres protéines habituellement présentes dans la gaine fibreuse sont absentes ou en quantités réduites dans les spermatozoïdes de souris AKAP4 knock-out. C'est notamment le cas d'AKAP3 et de GAPDS. Cela peut s'expliquer par le fait que la PKA est présente en quantité réduite ou que sa distribution est altérée du fait de l'absence d'AKAP4. Il est également possible que l'absence d'AKAP4 perturbe l'ancrage de d'autres protéines à la gaine fibreuse [119].

Figure 21 : Coupes longitudinales de pièces principales de flagelles vues au microscope électronique à transmission (x40000) chez des souris de type sauvage (WT) et knock-out (KO) pour le gène AKAP4 montrant le développement incomplet de la gaine fibreuse (FS) chez les souris KO [120]

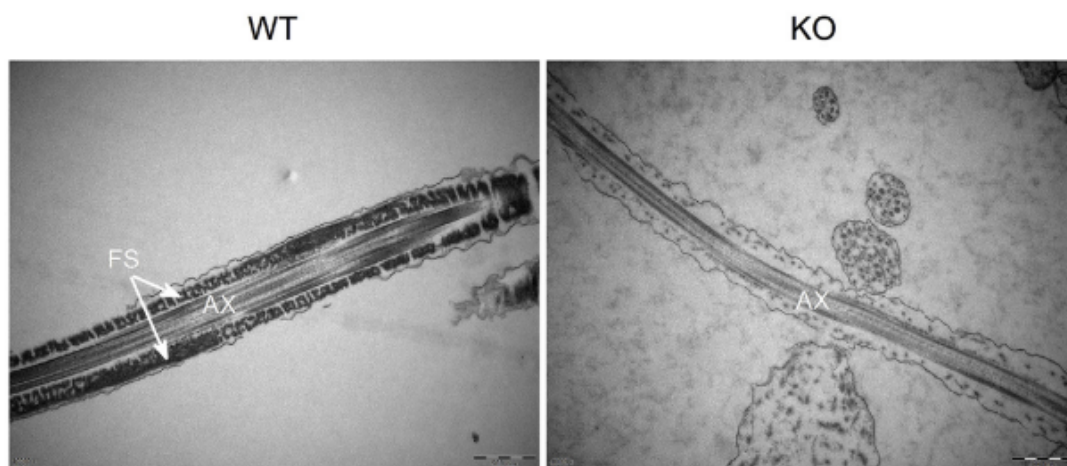
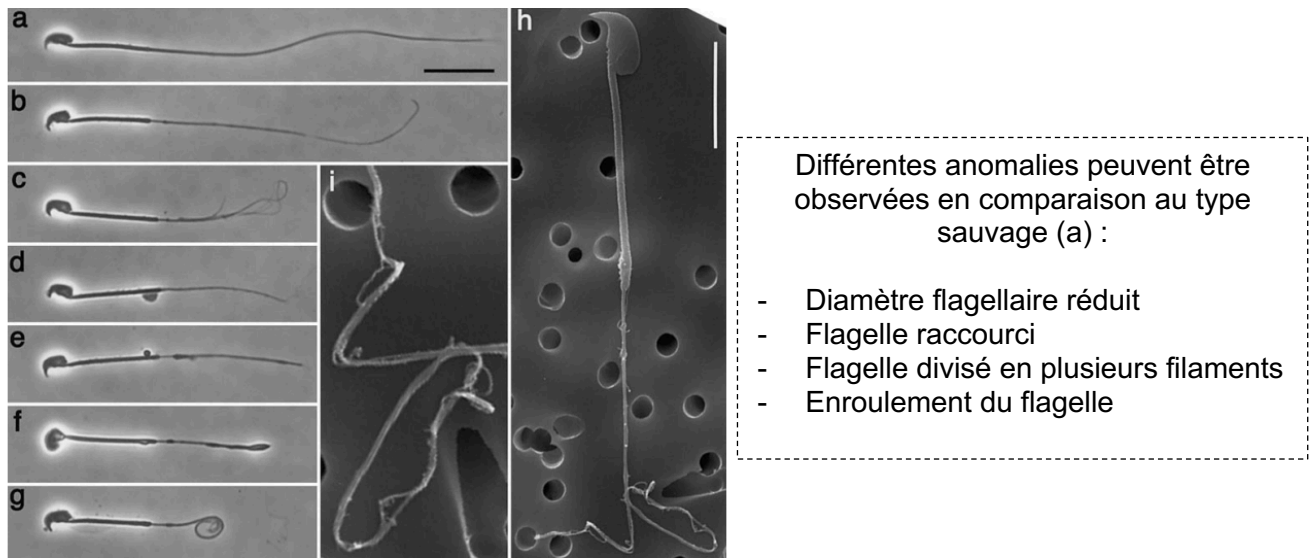


Figure 22 : Comparaison de la morphologie du spermatozoïde normal de souris de type sauvage (a) avec celui de souris AKAP4 knock-out (b-i) [119]
 Les souris AKAP4 knock-out présentent des anomalies morphologiques.



Plusieurs études portant notamment sur les bovins [121] et les équidés [117] ont montré une corrélation positive entre la teneur en proAKAP4 et la proportion de spermatozoïdes morphologiquement normaux (Annexe 1, Annexe 5).

Chez l'homme, plusieurs anomalies flagellaires sont décrites [49]. Parmi elles, la dysplasie de la gaine fibreuse (DFS pour dysplasia of the fibrous sheath) consiste en un développement dysplasique du cytosquelette anoxémique et péri-axonémique. Dans de nombreux cas, la DFS est familiale ce qui suggère une composante génétique [122]. L'hypothèse qu'une mutation des gènes AKAP4 et AKAP3 serait responsable de la DFS chez l'homme a été émise [122], [123]. La coloration par immunofluorescence de l'AKAP4 chez les patients atteints de DFS montre un signal modéré et diffus révélant une gaine fibreuse désorganisée et incomplètement assemblée [124], [125]. Cependant, l'implication directe de l'AKAP4 n'a pas été prouvée : aucune modification quantitative ou qualitative de la proAKAP4 et de l'AKAP4 n'a été mise en évidence. En effet, l'AKAP4 est correctement localisée dans la gaine fibreuse désorganisée. L'interaction avec la PKA est normale [122], [126]. Le lien entre l'AKAP4 et la DFS reste donc non élucidé. L'implication d'autres protéines de la gaine fibreuse est à envisager. Une origine multi-génétique est à explorer [122],[127]. Concernant la pathologie des flagelles courts, une étude portant sur un patient n'a pas montré d'anomalie significative dans la quantité en proAKAP4 et AKAP4, ni dans sa capacité à fixer la PKA. De plus, la séquence génétique ne présentait pas d'altération [128].

c. Motilité des spermatozoïdes

Outre son rôle dans la structure et l'assemblage de la gaine fibreuse, proAKAP4/AKAP4 est indispensable au développement et au maintien de la motilité des spermatozoïdes. Le rôle d'échafaud d'AKAP4 est essentiel pour la coordination des différentes enzymes. Plusieurs kinases, phosphatases et phosphodiesterases ainsi que des protéines du cytosquelette sont impliquées dans la cascade de signalisation permettant la motilité des spermatozoïdes. Leur coordination et leur activation est liée à AKAP4 qui permet une production localisée d'AMPc [49], [80], [53].

La motilité des spermatozoïdes est reconnue comme étant un marqueur de fertilité et prédictif de la fécondation [129]. C'est pour cela que les techniques conventionnelles s'intéressent particulièrement à son évaluation.

Un grand nombre de travaux indiquent une corrélation positive entre la concentration en proAKAP4 et les paramètres de motilité, notamment les motilités totale et progressive. En ce qui concerne la corrélation entre la proAKAP4 et autres paramètres de l'analyse CASA (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF), les résultats varient selon les études (Annexes1-7).

L'asthénozoospermie, définie comme une diminution ou une absence de motilité des spermatozoïdes, n'est pas toujours associée à des anomalies morphologiques. Les causes de l'asthénozoospermie sont encore méconnues. Les études protéomiques portant sur les individus asthénozoospermiques sont limitées. Chez l'homme, une trentaine de protéines ayant une expression différentielle par rapport aux individus normozoospermiques ont été identifiées. La réduction d'AKAP4 est pressentie pour être un biomarqueur d'une moindre motilité. Dans une étude menée en 2015 chez 68 patients (35 asthénozoospermiques et 33 normozoospermiques), Hashemitabar et al. ont montré une diminution de l'expression d'AKAP4 chez les patients asthénozoospermiques [130]. Récemment, des mutations génétiques du gène AKAP4 ont également été rapportées chez des patients atteints d'asthénozoospermie [131], [132].

d. Stress oxydatif

Les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles au stress oxydatif. Cela s'explique par plusieurs éléments. D'abord parce qu'ils possèdent de très nombreuses mitochondries. De plus, les spermatozoïdes ne sont pas en capacité de répondre à un stress oxydatif important puisqu'ils ne possèdent qu'une quantité limitée d'antioxydants. Enfin, leur membrane plasmique est particulièrement riche en acides gras polyinsaturés, cible de choix des ROS [133]. Des études récentes ont démontré que la spermatogénèse et notamment le stade de spermatide ronde est particulièrement critique pour l'exposition des spermatozoïdes au stress oxydatif [134].

Toutes les protéines ne possèdent pas une sensibilité équivalente au 4-HNE. proAKAP4 et AKAP4 font partie des protéines cibles [134], [135]. Ainsi, l'exposition au 4-HNE réduit considérablement l'abondance du précurseur et de la protéine mature dans les stades spermatides rondes mais aussi dans les spermatozoïdes matures [134]. L'une des hypothèses est que le 4-HNE déstabilise la forme précurseur et

perturbe la formation d'A-KAP4 [134]. Cela permet notamment d'expliquer la perte de motilité constatée suite à l'exposition au 4-HNE [136], [137], [134]. Ce défaut de motilité réduit la probabilité que des spermatozoïdes possédant des lésions oxydatives de l'ADN participent à la fécondation. Dans ce sens la proAKAP4 et l'AKAP4 peuvent être considérées comme un mécanisme de protection qui limite la transmission d'un génome mâle altéré à la génération suivante [134].

De nombreux facteurs extérieurs peuvent générer un stress oxydatif des cellules. C'est le cas de la fumée de cigarette. Dans une étude préliminaire menée en 2019, Delehedde et al. ont démontré que la concentration en proAKAP4 était diminuée chez les hommes fumeurs par rapport au non-fumeurs. Cela a été confirmé avec un modèle animal : Les souris exposées à la fumée de cigarette ont présenté une forte diminution des concentrations en proAKAP4. Un traitement à base de N-acétylcystéine, un antioxydant, permettait d'améliorer considérablement les niveaux en précurseur [138].

Un tableau récapitulatif des corrélations mises en évidences entre la proAKAP4 et les paramètres corrélés à la fertilité (toutes espèces confondues) est présenté dans le Tableau VIII.

Dans un souci de synthèse, les Annexes 1-7 présentent, par espèce, les différentes études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique.

Tableau VIII : Tableau récapitulatif des corrélations mises en évidence entre la proAKAP4 et les paramètres corrélés à la fertilité (toutes espèces confondues)

| | Études concordantes | Études non concordantes | Corrélation non montrée ou incertaine (peu d'études) |
|---|---|-------------------------|--|
| Volume de l'éjaculat | | X | |
| Viscosité de l'éjaculat | | X | |
| Concentration de l'éjaculat en spermatozoïdes | | X | |
| Paramètres de motilité CASA | Motilité totale * Motilité progressive * | VAP, VCL, LIN, STR, VSL | |
| Morphologie | X [121], [117] | | |
| Viabilité | X [140], [93], [93], [148] | | |
| Intégrité de la membrane acrosomique | | | X [140] |
| Potentiel de membrane mitochondriale | | | X [145] |
| Stress oxydatif | | | X [138] |
| Intégrité de l'ADN | | | X [93] |

VAP : Vitesse moyenne (VAP, $\mu\text{m/s}$) : vitesse de la trajectoire simplifiée en une courbe
VSL : Vitesse de progression linéaire
VCL : Vitesse curvilinéaire (VCL, $\mu\text{m/s}$) : vitesse de la trajectoire suivie point par point par l'algorithme
STR : Rectitude de la trajectoire moyenne
LIN : Linéarité de la trajectoire curvilinéaire

* : [90], [121], [129], [140], [141], [93], [147], [143], [117], [149], [150], [143]

C. Quantification de la proAKAP4

a. Intérêts

La fertilité d'un individu peut varier au cours du temps : un individu fertile peut produire à un moment donné une semence infertile. De plus, l'impact sur la fertilité de traitements courants tels que les antibiotiques ou les vaccins est encore méconnu [61],[153]. Dans ce contexte, il apparaît particulièrement intéressant de pouvoir tester la fertilité des individus de manière plus systématique que ce soit au cours de la saison de reproduction afin de pouvoir choisir au mieux le moment d'accouplement [99] ou après la fin d'un traitement [61].

Chez toutes les espèces étudiées, des variations inter individuelles de la concentration en proAKAP4 ont été mises en évidence [61], [90]. Ces variations sont aussi observées chez des individus possédant des paramètres spermatiques similaires selon les analyses conventionnelles [61]. Pour un même individu, des variations de la proAKAP4 entre différents éjaculats ont aussi été constatées [90], [61]. Chez plusieurs espèces, des variations au cours de la saison de reproduction ont été mise en évidence [99], [145].

Dans le cadre de la FIV, la qualité de la paillette utilisée n'est pas évaluée. Pourtant comme nous l'avons vu, la cryoconservation altère la fertilité de la semence. Afin d'améliorer les taux de fécondation, il apparaît donc pertinent de tester la qualité de la semence en amont des manipulations.

Récemment des tests fonctionnels ont fait leur apparition sur le marché : les kit4MID®. Ils détectent et quantifient spécifiquement la proAKAP4 dans les spermatozoïdes par la méthode ELISA sandwich. Ces kits sont disponibles chez de nombreuses espèces (chien, chat, taureau, étalon, bouc, bélier, porc, souris, lapin, chameau, homme). Ils permettent l'analyse de sperme frais, réfrigéré et congelé. Simples d'utilisation et économiques, ces kits présentent l'avantage d'être adaptés à une utilisation de routine. Ils constituent donc une alternative potentielle aux méthodes d'analyses conventionnelles.

b. Valeurs de référence

Les études chez les différentes espèces permettent de suggérer des seuils de concentration en proAKAP4 en lien avec la qualité spermatique. Elles sont toutefois susceptibles d'évoluer dans le temps avec l'avancée de la recherche.

Le fabricant des kits 4MID® propose une classification de la qualité des éjaculats en fonction de la teneur en proAKAP4. Les valeurs sont les mêmes pour toutes les espèces (Tableau IX).

Tableau IX : Valeurs de référence de la concentration en proAKAP4 [154]

| Concentration en proAKAP4 | Qualité de l'échantillon |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Inférieure 15 ng/10 millions de spz | Faible |
| Entre 15 et 40 ng/10 millions de spz | Bonne |
| Entre 40 et 60 ng/10 millions de spz | Très bonne |
| Supérieure à 60 ng/10 millions de spz | Excellente |

Dans un but de standardisation, Bastan et al. [121] ont étudié en 2019 chez les bovins l'adéquation entre les niveaux en proAKAP4 (mesurés à l'aide des kits Bull 4MID®) et les techniques conventionnelles d'analyse du sperme dans 60 paillettes de sperme congelé. Ils ont analysé les paramètres de motilité (analyse CASA), la morphologie des spermatozoïdes, l'intégrité membranaire et la concentration. Ils ont réparti les échantillons en trois groupes selon la teneur en proAKAP4 :

- Concentration faible : < 25 ng/10 millions de spermatozoïdes
- Concentration modérée : Entre 25 et 39 ng/10 millions de spermatozoïdes
- Forte concentration : Supérieure à 40 ng/10 millions de spermatozoïdes

Ils ont observé que les échantillons possédant des concentrations supérieures à 25 ng/10 millions de spermatozoïdes présentaient des motilités totale et progressive plus élevées et persistantes dans le temps. De plus, la proportion de spermatozoïdes présentant des queues anormales était plus faible.

- Une multitude de références démontrent une corrélation entre la qualité spermatique globale, évaluée par les techniques conventionnelles, et l'expression d'AKAP4 et de proAKAP4.
- De manière plus spécifique, de nombreuses études ont montrés des corrélations positives entre la concentration en proAKAP4/AKAP4 et la motilité spermatique et la proportion de spermatozoïdes morphologiquement normaux.
- Par ailleurs, plusieurs travaux ont démontré l'impact du stress oxydatif ou de perturbateurs de la spermatogénèse sur le stock de proAKAP4/AKAP4. Cela permet donc d'envisager la protéine comme le reflet des évènements ayant lieu au cours de la « vie » des spermatozoïdes.
- La quantification de la proAKAP4 via les kits 4MID® représente une alternative aux méthodes d'analyses conventionnelles.

DEUXIÈME PARTIE :

Partie expérimentale - Travaux de thèse

La partie expérimentale de notre travail est présentée sous la forme d'un article scientifique en vue de sa publication après traduction. Afin d'en faciliter la compréhension, plusieurs illustrations ont été insérées dans ce manuscrit. De plus, une conclusion générale sera présentée afin de rester conforme au format de thèse.

Contribution personnelle à l'étude :

Dans ce projet, mon rôle a été de faire le lien entre les différentes parties prenantes. Pour cela, j'ai participé à l'élaboration du protocole expérimental. J'ai ensuite été chargée de colliger l'ensemble des données avec d'une part les mesures de proAKAP4 et d'autre part les résultats de la production embryonnaire. Les résultats qui seront présentés sont issus d'une analyse statistique effectuée sous la supervision du Dr. Nicolas Sergeant. Par ailleurs, la revue de la littérature effectuée dans la première partie de ce manuscrit m'a permis, avec l'aide du Dr. Lamia Briand-Amirat et du Dr. Alline Reis, de rédiger l'introduction ainsi que la discussion de l'article présenté ci-dessous.

proAKAP4 : biomarqueur prédictif du développement embryonnaire *in vitro* chez les bovins

Mots clés : bovin, taureau, proAKAP4, sperme, spermatozoïde, développement embryonnaire, fécondation *in vitro*, biomarqueur, fertilité

1. Introduction

En élevage bovin, la production d'embryons *in vitro* en vue de leur transfert est utilisée dans les schémas d'amélioration génétique. La technique d'Ovum Pick Up (OPU), ne nécessitant pas de traitement de superovulation et étant répétable à raison de deux fois par semaine, permet une meilleure valorisation du potentiel génétique femelle. Cela explique la tendance mondiale actuelle en faveur des transferts embryonnaires (TE) à partir d'embryons produits *in vitro* (PIV). Ainsi, entre 2020 et 2021, l'International Embryo Technology Society (IETS) a rapporté une augmentation record (+32,8%) des TE à partir d'embryons PIV [3].

Cependant, la procédure reste peu efficace et de nombreux embryons transférés sont incapables de conduire à une gestation [4]. Après collecte des ovocytes et fécondation *in vitro* (FIV), le nombre de blastocystes transférables avoisine les 30% [5]. Après transfert, seulement 40% des vaches sont gestantes. Les taux de gestation obtenus sont 10 à 40% inférieurs à ceux observés après transferts d'embryons obtenus *in vivo* [2], [162]. Ce résultat est encore plus faible lorsque les embryons sont congelés [2], [6]. Aussi, il apparaît essentiel de rechercher tous les moyens permettant d'améliorer les rendements de la technique. Pour cela, deux axes sont à envisager [43] : 1/ Optimiser la production *in vitro* afin d'obtenir un nombre d'embryons transférables plus important ; 2/ Améliorer la sélection des embryons afin d'augmenter le pourcentage d'embryons transférés qui conduiront à une gestation.

Le succès de l'OPU-FIV dépend de l'optimisation des facteurs mâles, femelles et opérationnels [4], [6]. La qualité des gamètes est un facteur déterminant du développement embryonnaire. Le rôle central de l'ovocyte n'est plus discuté. Le spermatozoïde assure quant à lui la fécondation de l'ovocyte et détermine en partie le développement embryonnaire précoce et l'implantation dans l'utérus [2]. Un enjeu majeur est donc l'appréciation de la qualité de la semence ; voire la prédiction du potentiel de fertilité.

L'A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) est une protéine de structure spécifique des spermatozoïdes strictement localisée au niveau du flagelle pressentie comme un biomarqueur de qualité spermatique [61], [129]. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur : la proAKAP4. Au stade mature, l'AKAP4 permet de recruter la protéine kinase A (PKA) au sein de la gaine fibreuse et favorise ainsi la phosphorylation locale des substrats ainsi que la régulation des fonctions flagellaires telles que l'initiation et l'entretien de la motilité des spermatozoïdes, fondamentale pour la fécondation [49].

Chez les bovins, de nombreux travaux ont mis en lumière une corrélation entre les niveaux de proAKAP4/AKAP4 et les paramètres conventionnels de qualité de la semence tels que la motilité [90], [121], [129], [140] ou encore la morphologie des spermatozoïdes [121]. Récemment, une étude a montré une corrélation entre la

concentration en proAKAP4 de l'éjaculat congelé et la fertilité *in vivo* évaluée par le taux de non-retour en chaleur à 90 jours sur 199 100 inséminations artificielles [129].

Concernant la fertilité *in vitro*, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à évaluer la proAKAP4 comme biomarqueur du développement embryonnaire. En effet, la FIV est réalisée dans un cadre différent de l'insémination artificielle. La semence est soumise à de nombreuses manipulations avant la mise en contact avec les ovocytes, la distance à parcourir pour la fécondation est moindre, l'environnement artificiel est dépourvu de l'ensemble de facteurs cellulaires utérins présents lors d'une fécondation *in vivo*.

Dans ce contexte, nous avons souhaité déterminer 1) si la proAKAP4 est un biomarqueur de fertilité d'intérêt lors de la FIV permettant notamment de prédire le taux de blastocystes obtenu ; 2) le matériel d'élection pour évaluer la proAKAP4 en tant que biomarqueur de la fertilité mâle *in vitro* ; 3) la concentration seuil de proAKAP4 pronostique du développement embryonnaire en termes de quantité et/ou de qualité des embryons obtenus.

Ainsi, ce travail se décompose en trois études menées chez le bovin :

Étude 1 : Évaluation de la variabilité des concentrations en proAKAP4 tout au long de la chaîne de préparation de la semence en vue de la fécondation *in vitro*

L'objectif est d'évaluer la variabilité de la teneur en proAKAP4 au cours des étapes de préparation de la semence en vue de la FIV. Pour cela, nous avons quantifié la proAKAP4 dans différents échantillons, tout au long de la chaîne de préparation du sperme.

Études 2 et 2 bis : Évaluation de la proAKAP4 comme biomarqueur de l'issue du développement embryonnaire

L'objectif de ces deux études est d'évaluer la corrélation entre le développement embryonnaire et la teneur en proAKAP4.

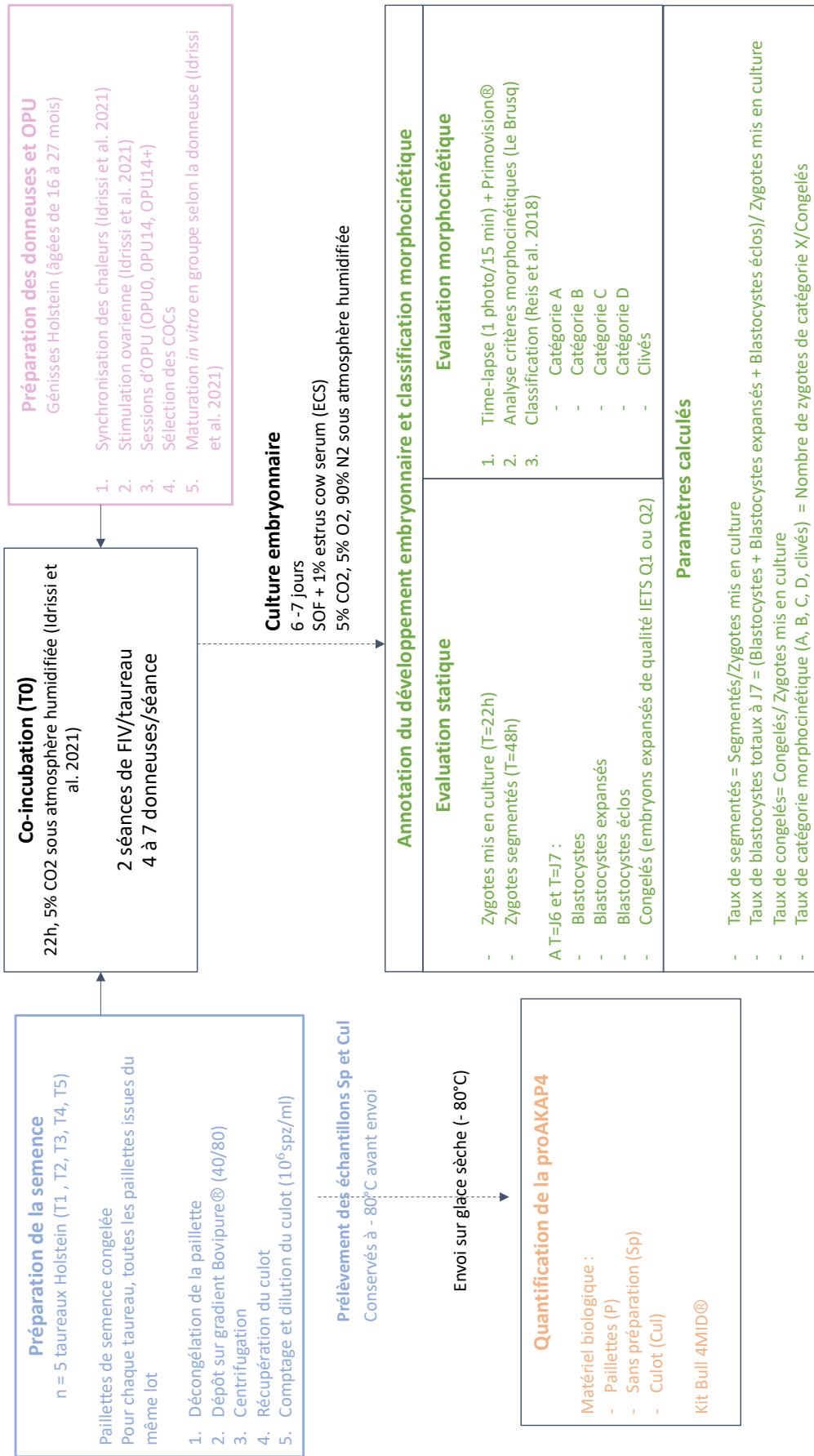
Dans l'Étude 2, nous évaluerons cette corrélation à partir des concentrations en proAKAP4 mesurées dans les différents échantillons de l'Étude 1. En cas de corrélation avérée, nous déterminerons lequel des échantillons s'avère le mieux corrélé aux résultats du développement embryonnaire en termes de quantité et de qualité.

Dans l'Étude 2bis, nous évaluerons cette corrélation à partir des concentrations en proAKAP4 des paillettes. Cette étude inclut un échantillon de fécondations *in vitro* élargi par rapport à celui de l'Étude 2.

2. Matériels et Méthodes

Les études 1, 2 et 2bis ont été réalisées selon une même méthodologie. Le traitement des données et l'analyse des résultats ont différé et seront explicités pour chaque étude. Une représentation schématique de la méthodologie globale employée est présentée dans la Figure 23.

Figure 23. : Représentation schématique de la méthodologie générale



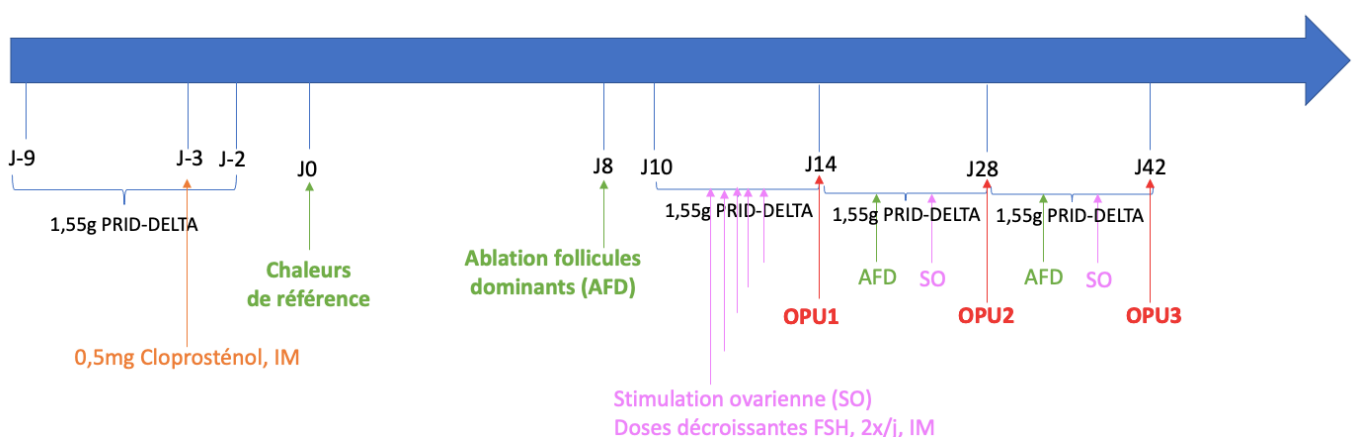
2.1. Procédures générales

2.1.1. Préparation des donneuses en vue de la collecte de complexes cumulus oocytes

Des génisses de 16 à 27 mois, ont été soumises à des sessions d'OPU. L'effectif des génisses varie en fonction des études : Étude 2 (n=14), Étude 2bis (n=29). Pour ce faire, un protocole de synchronisation des chaleurs et de stimulation ovarienne a été mis en place selon la méthode décrite par Idrissi et al. (2021) [157]. Un dispositif intra vaginal de progestérone (Prid Delta, 1.55 g, Ceva, Libourne, France) a été mis en place (J-9). Six jours après (J-3), une injection intramusculaire de 2ml d'un analogue de la prostaglandine F2 (Estrumate, MSD Santé Animale, équivalent à 0,5 mg de cloprosténol) a été administrée. Le jour suivant (J-2), le dispositif intra vaginal a été retiré. Les chaleurs de référence ont été détectées par le suivi de l'activité et de la rumination (Heatime, Evolution XY, France) en moyenne 48h après le retrait du dispositif intra vaginal (J0). Une ablation des follicules dominants (follicules dont le diamètre était supérieur à 8mm) a été réalisée 8 jours plus tard (J8). Trente-six heures après l'ablation des follicules dominants (J10), un nouveau dispositif intra vaginal de progestérone (Prid Delta, 1.55 g, Ceva, Libourne, France) a été posé et une stimulation ovarienne a été réalisée par 5 injections intramusculaires de doses décroissantes de pFSH/pLH (Stimulfol, Reprobiol, Oufet, Belgique) toutes les 12h pendant 2,5 jours (J11 : 7 p.m–75 µg FSH/15 µg LH; J12: 7 a.m–62.5 µg FSH/12.5 µg LH; J12 : 7 p.m–50 µg FSH/10 µg LH; J13 : 7 a.m–37.5 µg FSH/7.5 µg LH; J13 : 7 p.m–25 µg FSH/5 µg LH). L'ovum pick-up a été réalisée à J14 (OPU1).

Suite à OPU1, un nouveau dispositif intravaginal a été mis en place et l'ensemble des procédures décrites entre J8 et J14 ont été répétées afin de réaliser une nouvelle collecte avec 14 jours d'intervalle (OPU2, et ainsi de suite) (Figure 24).

Figure 24 : Représentation schématique du protocole de préparation des donneuses (adapté du protocole d'Idrissi et al. [157])



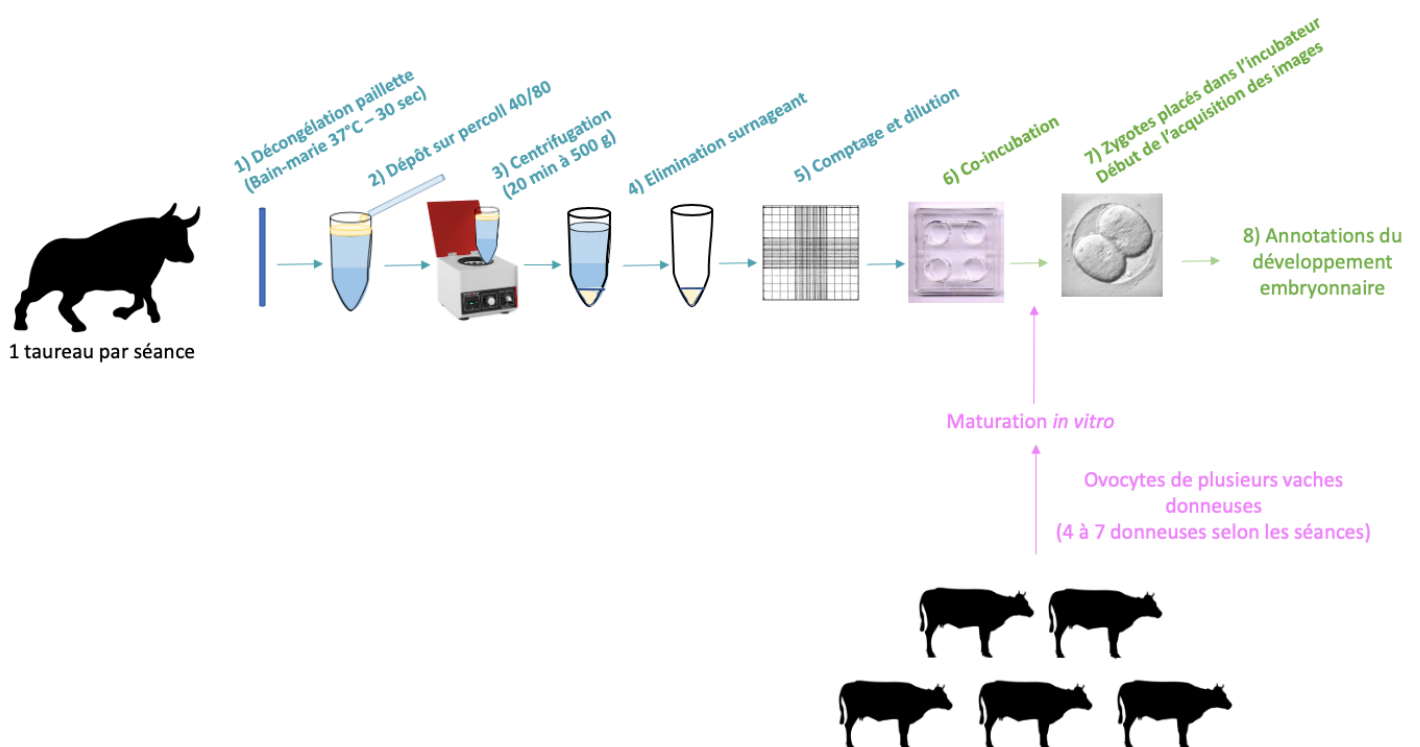
2.1.2. Collecte des ovocytes

La collecte d'ovocytes par voie transvaginale sous guidage échographique (ovum pick-up - OPU) a été réalisée sous anesthésie locorégionale (bloc épidural) avec 86,5-173 mg de procaine par animal (Procamidor®, Richter Pharma, Wels, Autriche), après sédation par 10 mg/100 kg PV de xylazine (Rompun®, Bayer Animal Health, Saint-Georges-de-Reneins, France). La zone anogénitale a ensuite été lavée et désinfectée (Vétédine savon®, Vétoquinol, Lure, France). Avant la ponction, un porte-aiguille, comprenant une aiguille (18G) et relié à un système d'aspiration, a été rincé dans une solution de rinçage additionnée d'héparine (Héparine Choay, 25 000 UI/5 mL, Sanofi-Aventis, France) (1:50) pour éviter la formation de caillots sanguins dans la tubulure. Un guide portant une sonde échographique (sonde EC123, 7,5 MHz, échographe MyLab30, ESAOTE Pie Medical, Saint-Germain-en-Laye, France) a été inséré par voie vaginale et l'ovaire a été positionné contre la sonde par le technicien par voie transrectale. Le porte-aiguille a ensuite été introduit via le guide par voie transvaginale. Tous les follicules de 6 à 12 mm de diamètre des deux ovaires ont été aspirés et le contenu récupéré dans un tube Falcon de 50 ml, contenant 1 ml de solution de rinçage additionnée d'héparine (1:50), maintenue à 37 °C.

2.2. Production des embryons *in vitro*

Les embryons ont été obtenus à l'issue de plusieurs séances de FIV. Au cours d'une séance, la semence d'un unique taureau a été utilisée pour réaliser plusieurs fécondations *in vitro*. Ainsi, au cours d'une séance, la semence d'un taureau a servi à féconder les ovocytes de plusieurs femelles (Figure 25). Pour nos trois études, la semence de 5 taureaux a été utilisée.

Figure 25 : Déroulement d'une séance de production d'embryons *in vitro*



2.2.1. Maturation *in vitro*

Suite à la collecte, les complexes cumulus ovocytes (COCs) ont été identifiés, sélectionnés et rincés trois fois dans le milieu de rinçage Euroflush (IMV Technologies, France) à 37°C puis une fois dans le milieu de maturation *in vitro* (MIV). Le milieu de maturation était composé de TCM-199/NaHCO₃ additionné de 10% de sérum de veau foetal, 10 µg/ml de FSH, 12 µg/ml de LH, 1µg/ml de 17-estradiol et 5ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF) et 5µg/mL de gentamicine. Avant d'être placés en MIV, la qualité des COCs a été évaluée selon les critères morphologiques de l'IETS [158]. Seuls les COCs présentant un cytoplasme homogène, non-granulaire et présentant au moins 3 couches de cellules de la granulosa ont été sélectionnés.

La MIV des ovocytes de chaque donneuse a été réalisée séparément dans 500µL de milieu de maturation, pendant 22 h, à 38,5°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂.

2.2.2. Fécondation *in vitro*

Chaque paillette a été décongelée en la plongeant dans un bain-marie à 37°C pendant 30 secondes puis essuyée. Le contenu de la paillette a été vidé délicatement sur un gradient discontinu BoviPure (40/80) et le tube a été centrifugé selon les instructions du fabricant (Nidacon International AB, Suède). Après centrifugation à 500 g pendant 20 minutes le culot a été récupéré par élimination du surnageant. Un comptage a été effectué à l'aide d'une cellule de Malassez, permettant de déterminer la concentration du culot. Ce dernier a ensuite été dilué dans du milieu de fécondation afin d'obtenir une concentration finale de $1,0 \times 10^6$ spermatozoïdes/ml.

Parallèlement, les cellules du cumulus des ovocytes maturés ont été rincés deux fois dans le milieu de fécondation.

Les ovocytes ont été co-incubés avec $1,0 \times 10^6$ spermatozoïdes/mL dans 500µL de milieu de fécondation pendant 22 heures à 38,5°C dans 5% de CO₂ dans l'air humidifié. Le milieu de fécondation [138] était un milieu Tyrode (Fert TALP) contenant 10µg/mL d'héparine, 6g/L BSA, 20µM de pénicillamine, 10µM d'hypotaurine et 1µM d'épinéphrine et 20µM de sodium pyruvate. Le moment initial de la co-incubation est considéré comme le point de départ (T0) du développement précoce de l'embryon.

2.2.3. Développement embryonnaire *in vitro* et acquisition des images

Vingt-deux heures après la mise en contact des gamètes, les cellules du cumulus ont été enlevées à l'aide d'un cycle court de vortex et les zygotes présumés de chaque vache séparément ont été rincés dans le milieu de culture puis placés individuellement dans des micro-puits de boîtes de Pétri adaptés à la production d'embryons avec prises de vues en temps réel (time lapse – Primovision®). Les micro-puits ont été couverts par une goutte de 150µL de milieu SOF (SOF, Minitüb, GmbH, Allemagne) additionné de 1% de sérum de vache en œstrus, sous huile minérale, et placés dans l'incubateur à 38,5°C, 5% de CO₂, 5% d'O₂ et 90% de N₂ dans l'air humidifié jusqu'au jour 7 après co-incubation. Au sixième jour post co-incubation, les embryons ayant déjà atteint le stade blastocyste en début d'expansion (diamètre à l'intérieur de la zone pellucide supérieur à 135 µm et zone pellucide affinée de plus de 2 µm) ont été

congelés en congélation vitale individuellement. La procédure a été renouvelée au septième jour post co-incubation.

Les boîtes de Pétri adaptées au système PrimoVision® contenant les embryons ont été placées sous la micro-caméra dans l'incubateur. Une unité de contrôle externe équipée d'un logiciel en cours d'exécution a permis de focaliser l'image initiale et de régler la durée du laps de temps et la fréquence de capture d'image. Un faible courant électrique est envoyé au microscope pendant quelques millisecondes pour permettre la capture d'image. Afin d'éviter d'endommager l'embryon, le microscope est équipé d'une lumière LED verte homogène. La durée d'éclairage et l'intensité lumineuse sont minimisées sans affecter la résolution. La fréquence de capture d'images a été fixée à 15 minutes. Le logiciel d'analyse Primo Vision® a compilé les images pour générer les vidéos.

2.3. Annotation du développement embryonnaire et classification morphocinétique

Pour chacune des FIV, le développement embryonnaire ainsi que la classification morphocinétique des blastocystes ont été annotés indépendamment. Toutes les annotations statiques du développement embryonnaire ont été effectuées par un technicien et toutes les annotations morphocinétiques ont été réalisées par un autre technicien spécialisé dans ce domaine (Figure 27).

2.3.1. Évaluation morphologique (statique)

Pour chaque FIV, le technicien a annoté :

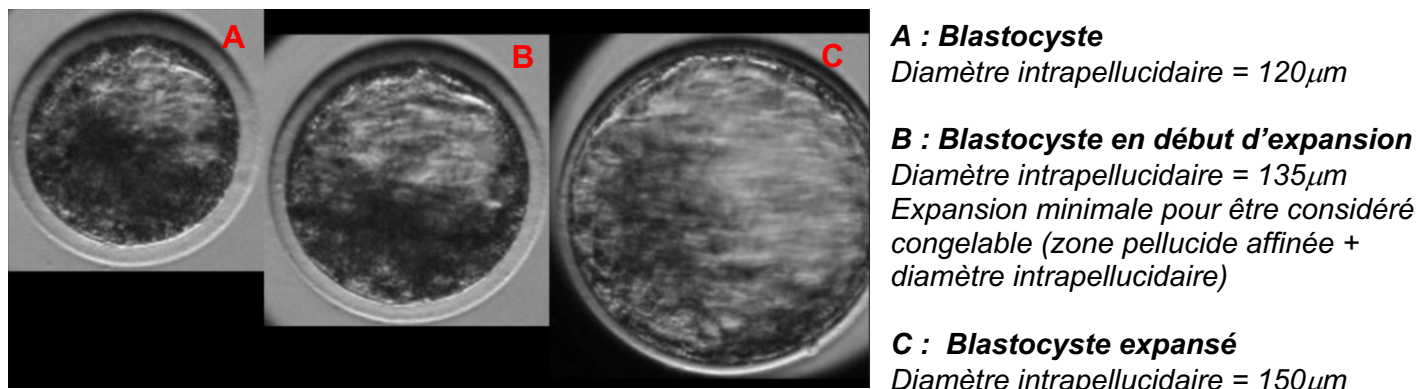
T=22h : le nombre de zygotes présumés

T=48h : le nombre de zygotes segmentés (zygotes ayant réalisé le premier clivage (au moins 2 blastomères visibles – cette observation est réalisée sur le logiciel Primovision – sans sortir les embryons de l'incubateur)

T=J6 et T=J7, tous les blastocystes, blastocystes expansés et blastocystes éclos ont eu leur qualité morphologique annotée selon les critères de l'IETS [158]. Ensuite, il a été annoté, la classification IETS de chaque blastocyste et le nombre total pour chaque femelle, comme suit :

- Le nombre de blastocystes (embryons présentant une formation de blastocœle sans signes d'expansion) (Figure 26)
- Le nombre de blastocystes expansés (embryons présentant un blastocœle, associée aux deux signes d'expansion validés par nos soins : une augmentation du diamètre intrapellucidaire de l'embryon (>135 µm) et un affinement d'au moins 2µm de la zone pellucide (Figure 26). Ces embryons ne présentent pas de signe d'éclosion.
- Le nombre de blastocystes éclos : embryons expansés présentant des signes d'éclosion : la rupture de la zone pellucide avec une sortie partielle ou complète de l'embryon de la zone pellucide
- Le nombre d'embryons congelés : Seuls les embryons expansés de bonne qualité morphologique (qualité IETS Q1 ou Q2) ont été congelés.

Figure 26 : Photographie time-lapse d'embryons bovins obtenues à l'aide du dispositif Primovision® (proportions conservées)



2.3.2. Évaluation morphocinétique

Suite à la fin de la séance, les time lapses obtenues par vidéo-microscopie ont été envoyées pour l'analyse morphocinétique.

L'analyse des critères morphocinétiques ne faisant pas encore l'objet d'un consensus, nous avons utilisé la méthode décrite par Le Brusq [43] et développée et récemment validée dans notre laboratoire. Cette méthode se base sur l'annotation standardisée de 27 critères cinétiques et morphodynamiques observés entre le premier clivage et la fin de la phase LAG (phase d'arrêt du développement embryonnaire observé *in vitro* au stade 8-16 cellules [43]) suivie d'une prédiction réalisée par un prédicteur semi-automatique basé sur la méthode mathématique de forêt aléatoire [163]. Ainsi chaque embryon a pu être classé dans une des 4 catégories morphocinétiques définies par Reis et al. [159].

- Catégorie A - ou blastocystes à éclosion précoce : Embryons possédant une trajectoire morphocinétique très proche du développement normal décrit dans la littérature mais présentant un potentiel d'éclosion précoce c'est-à-dire **avant J7.5 post co-incubation**
- Catégorie B - ou blastocystes éclos : Embryons possédant une trajectoire morphocinétique très proche du développement normal décrit dans la littérature et présentant un potentiel d'éclosion **entre J7.5 et J8 post co-incubation**
- Catégorie C - ou blastocystes retardés : Embryons possédant une trajectoire morphocinétique pouvant être considérée comme normale mais avec quelques paramètres morphocinétiques légèrement plus variables que le décrit la littérature et présentant **un faible potentiel d'éclosion avant J8**.
- Catégorie D - ou blastocystes arythmiques : Embryons présentant des divisions anormales et/ou une cyclicité arythmique mais atteignant le stade de blastocyste « transférable ».

Un petit nombre d'embryons avaient entamé le premier clivage avant la mise en culture sous caméra (avant T22h). Ils n'ont donc pas pu être classés dans les catégories précédentes puisque ce classement dépend d'informations obtenues dès le début du premier clivage. Ces embryons représentent pourtant un intérêt puisqu'ils ont clivé précocement. Nous les avons donc regroupés dans une catégorie à part entière : les clivés.

Figure 27 : Format du tableau des annotations du développement embryonnaire et de la classification morphocinétique

Au cours de chaque séance, la semence la semence d'un même taureau a servi à féconder les ovocytes différentes vaches donneuses.

| Taureau | N°séance | Femelle | | Evaluation morphologique (statique) | | | | | | | | Evaluation morphocinétique | | | | | | |
|---------|----------|----------|----------|-------------------------------------|-------------|----------------|------------------------|------------------------|-------------------------|---------------|---------------|----------------------------|---------------|----------|--|--|--|--|
| | | N° Vache | Rang OPU | n zygotes mis en culture | n segmentés | n blastocystes | n blastocystes élargis | n blastocystes éclatés | n blastocystes congelés | n catégorie A | n catégorie B | n catégorie C | n catégorie D | n clivés | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

2.4. Quantification de la proAKAP4

2.4.1. Matériel biologique

Pour chacun des 5 taureaux, 3 types de matériel biologique ont été retenus :

- P : Paillettes de 250 μ l et **n'ayant jamais été décongelées**. La concentration des paillettes étaient de 80M de spermatozoïdes/mL pour quatre taureaux et de 70M de spermatozoïdes/mL pour un taureau.

Les échantillons suivants ont été récupérés directement lors des séances de production d'embryons (Figure 28). **Le matériel suivant provient de paillettes issues du même lot (éjaculat) que les paillettes (P) retenues.**

- Sp : 20 μ L **du contenu de la paillette décongelée**, utilisée pour la production d'embryons. Ces échantillons ont été collectés **immédiatement après le dépôt du contenu de la paillette sur le gradient percoll en évitant leur mélange.**
- Cul : 7 μ L du culot **après la procédure de séparation par gradient et avant dilution.**

Les matériels Sp et Cul ont été envoyés en double pour la réalisation d'une double quantification.

Les paillettes ont été conservées dans l'azote liquide (-196°C) et le reste du matériel a été conservé à -80°C jusqu'à l'envoi pour analyse. L'ensemble du matériel a été envoyé par transporteur routier dans un contenant unique à une température de -80°C (carboglace) pour une livraison sous 24h, tels que préconisé par le laboratoire. La liste et les caractéristiques des échantillons envoyés est disponible en Annexe 8.

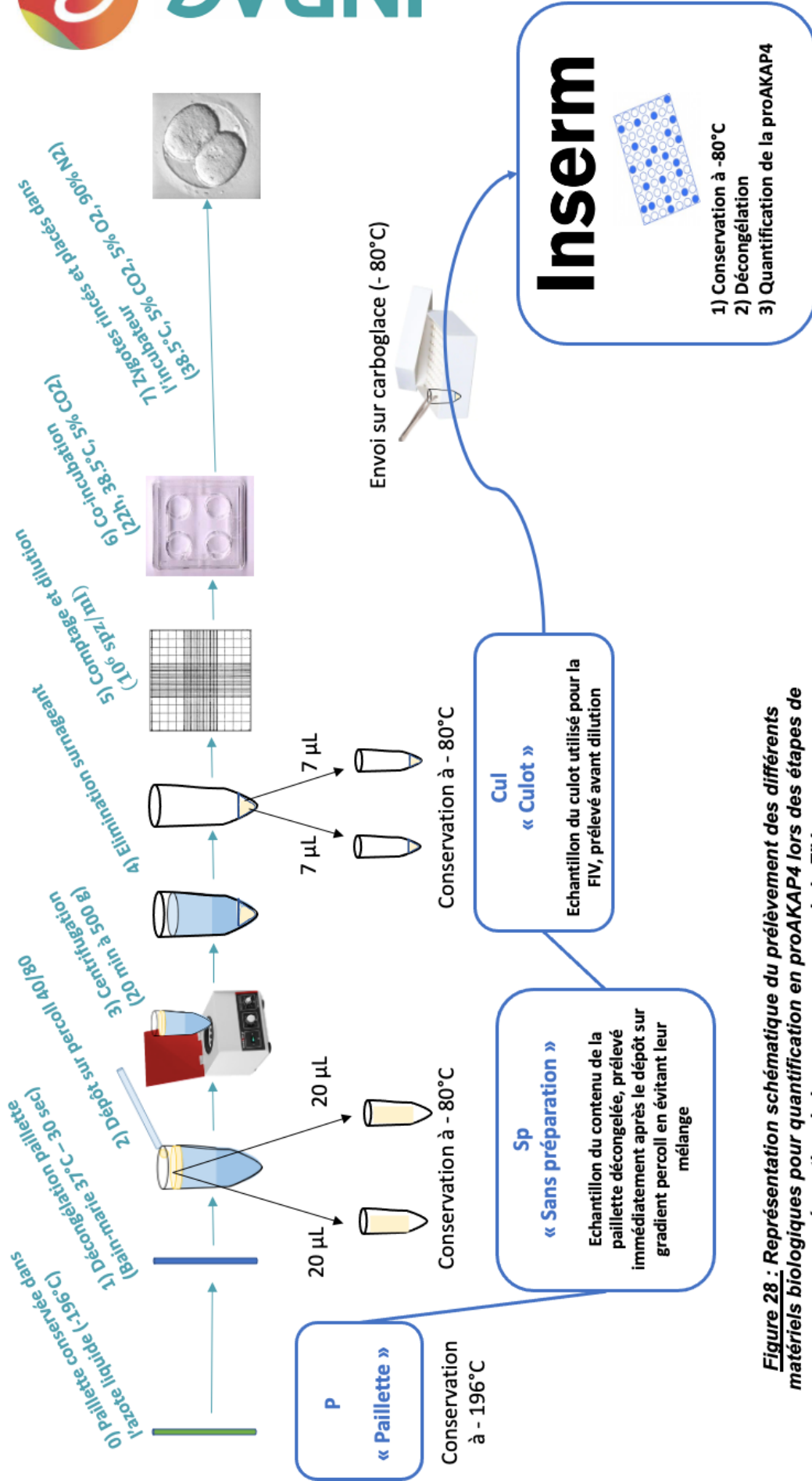


Figure 28 : Représentation schématique du prélèvement des différents matériels biologiques pour quantification en proAKAP4 lors des étapes de préparation de la semence en vue de la FIV

2.4.2. Quantification de la proAKAP4 à l'aide des kits Bull 4MID®

Les mesures de la concentration en proAKAP4 ont été réalisées par le laboratoire de recherche de l'INSERM UMRS1172 Alzheimer et Tauopathies à Lille, par l'équipe 4BioDx. A réception des échantillons, ceux-ci ont été conservés à -80°C. Avant le dosage de proAKAP4, les échantillons ont été décongelés en étant placés une minute à 37°C dans une étuve sèche.

Toutes les mesures de proAKAP4 ont été réalisées à l'aide d'un kit Bull 4MID (4BioDx, Lille, France) conformément aux instructions du fabricant.

Un volume proportionnel d'échantillon décongelé a été mélangé à un tampon de lyse. Le lysat obtenu a été placé dans chaque puit de la plaque recouverte d'anticorps anti-proAKAP4. Un anticorps proAKAP4 secondaire conjugué au raifort a ensuite été ajouté pour réaliser l'étape ELISA sandwich. Après lavage approprié, la solution de substrat a été ajoutée et la coloration a été arrêtée avec la solution d'arrêt fournie dans le kit. L'intensité de la couleur étant proportionnelle à la quantité de proAKAP4 présente dans chaque échantillon de sperme, la densité optique a été mesurée par spectrophotométrie à 450 nm. Une courbe d'étalonnage a été déterminée en parallèle. Les résultats des concentrations en proAKAP4 étaient toujours exprimés en ng/ml ou en ng par 10 millions de spermatozoïdes (ng/10M spz) lorsque les concentrations de spermatozoïdes en millions par ml étaient déterminées.

2.5. Traitement des données et analyse statistique

2.5.1. Étude 1 : Évaluation de la variabilité des concentrations en proAKAP4 tout au long de la chaîne de préparation de la semence en vue de la fécondation *in vitro*

Pour chaque taureau (n=5), la quantification en proAKAP4 a été réalisée sur 2 paillettes (2 mesures par paillette) (Figure 29). Par ailleurs, 4 échantillons Sp et 4 échantillons Cul, correspondant à 2 séances de production d'embryons, ont été traités comme décrit dans les procédures générales. La concentration en proAKAP4 a été mesurée sur chacun des échantillons Sp et Cul (Figure 29).

Figure 29 : Format du tableau des résultats relatifs à la quantification de proAKAP4 dans les différents échantillons P, Sp et Cul

| Taureau X | | |
|---------------------------|-------------|-------------|
| Concentration en proAKAP4 | | |
| | Paillette 1 | Paillette 2 |
| Mesure 1 | | |
| Mesure 2 | | |

| Taureau | Séance | Concentration en proAKAP4 | | | |
|---------|--------|---------------------------|------|-------|-------|
| | | Sp 1 | Sp 2 | Cul 1 | Cul 2 |
| X | 1 | | | | |
| | 2 | | | | |

Pour chaque paille, la moyenne des deux mesures de concentration en proAKAP4 a été calculée. La moyenne des concentrations en proAKAP4 et le coefficient de variation (CV) des deux pailles ont été calculés. Un CV ayant une valeur inférieure à 0,15 indique une variabilité faible entre les deux pailles.

Pour chaque séance, les moyennes des deux échantillons Sp et Cul ont été calculées. Pour les deux types d'échantillon, le CV entre les deux séances a été calculé. Un CV ayant une valeur inférieure à 0,15 indique une variabilité faible d'une séance à l'autre.

Afin de déterminer une éventuelle différence significative de la concentration en proAKAP4 dans les différents échantillons (P, Sp et Cul), des fonctions gaussiennes ont été utilisées pour évaluer la distribution des données. Des tests de normalité Shapiro Wilk ont été appliqués. Dans les groupes de données normalement distribués, les différences significatives ont été déterminées par des tests T de Student à échantillons indépendants. Des tests F d'égalité des variances ont préalablement été réalisés. L'hypothèse nulle (H0) retenue est l'absence de différence significative. La valeur limite fixée pour le rejet de H0 est 0,05.

2.5.2. Étude 2 : Évaluation de la proAKAP4 comme biomarqueur de l'issue du développement embryonnaire

Seul le matériel biologique ayant une faible variabilité entre les séances ($CV < 0,15$) pour l'ensemble des taureaux (Étude 1) a été retenu pour l'Étude 2. La médiane de la concentration en proAKAP4 dans ce matériel biologique a été utilisée afin de définir deux groupes distincts de taureaux (proAKAP4 inf – taureaux avec une concentration en proAKAP4 inférieure à la médiane ; et proAKAP4 sup – taureaux avec une concentration en proAKAP4 supérieure à la médiane).

Dans cette étude, nous avons cherché à vérifier l'existence ou non d'un lien entre la concentration en proAKAP4 dans ce matériel biologique et production d'embryons.

Pour ce faire, le développement embryonnaire (en termes quantitatifs) des mêmes séances de FIV ayant fourni les différents matériels biologiques de l'Étude 1 a été analysé.

Le protocole de fécondation *in vitro* et d'analyse du développement embryonnaire ont été identiques pour les différents taureaux tel qu'indiqué dans la Figure 27.

Un total de N=10 séances (2 par taureau) a été inclus dans cette étude. Pour chaque séance, la semence d'un taureau a servi à féconder les ovocytes de 4 à 7 femelles différentes. Les ovocytes proviennent de 14 génisses différentes. Ainsi, un total de **n=57 FIV** a été inclus dans cette étude (Tableau X).

Tableau X : Présentation du nombre de fécondations in vitro réalisées au cours de chaque séance pour chacun des cinq taureaux de l'Étude 2

| Taureau | Séance | Nombre de FIV |
|---------|--------|---------------|
| 1 | 1 | 4 |
| | 2 | 5 |
| 2 | 1 | 7 |
| | 2 | 5 |
| 3 | 1 | 7 |
| | 2 | 6 |
| 4 | 1 | 5 |
| | 2 | 5 |
| 5 | 1 | 7 |
| | 2 | 6 |

N=10

n=57

Pour chaque FIV (n=57), nous avons calculé :

- Taux de segmentés = $\frac{n \text{ Segmentés}}{n \text{ Zygotes mis en culture}}$
- Taux de blastocystes totaux à J7 = $\frac{n \text{ Blastocystes} + n \text{ Blastocystes expansés} + n \text{ Blastocystes éclos}}{n \text{ Zygotes mis en culture}}$
- Taux d'embryons transférables (congelés) = $\frac{n \text{ Congelés}}{n \text{ Zygotes mis en culture}}$
- Taux de catégorie morphocinétique (A, B, C, D, clivés) = $\frac{n \text{ Zygotes de catégorie X}}{n \text{ Congelés}}$

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism 8.2 GraphPad. Afin d'évaluer l'existence d'une différence significative entre les deux groupes quant à la production embryonnaire d'une part et la qualité des embryons obtenus d'autre part, des fonctions gaussiennes ont été utilisées pour évaluer la distribution des données. Des tests de normalité Shapiro Wilk ont été appliqués. Dans les groupes de données normalement distribués, les différences significatives ont été déterminées par des tests T de Student à échantillons indépendants. Des tests F d'égalité des variances ont préalablement été réalisés. L'hypothèse nulle (H0) retenue est l'absence de différence significative. La valeur limite fixée pour le rejet de H0 est 0,05.

2.5.3. Étude 2bis : Élargissement de l'effectif de FIV

Afin d'obtenir un effectif plus important que celui de l'Étude 2 (n=57 FIV), nous avons collecté **rétrospectivement** les résultats de FIV ayant été réalisées avec la semence issue des mêmes lots que l'Étude 2. Cela a permis de porter l'effectif à **n=164 FIV**. Dans cette étude, les ovocytes provenaient de 29 génisses différentes.

Les taureaux ont été répartis en deux groupes (proAKAP4 inf et proAKAP4 sup) en fonction de la valeur seuil en proAKAP4 préalablement établie (Étude 1).

Pour chaque taureau, les moyennes des paramètres de la production embryonnaire (taux de segmentés, taux de blastocystes totaux à J7, taux d'embryons transférables) ont été calculées comme décrit dans l'Étude 2. De plus, le caractère qualitatif morphocinétique a été évalué. Pour ce faire, l'ensemble des embryons ont été évalués selon la classification proposée par Reis et al. (2018). De plus, les embryons déjà clivés au début de la culture embryonnaire ont été classés comme « clivés », comme décrit dans la section 2.3.2.

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism 8.2 GraphPad. Afin d'évaluer l'existence d'une différence significative entre les deux groupes quant à la production embryonnaire d'une part et la qualité des embryons obtenus d'autre part, des fonctions gaussiennes ont été utilisées pour évaluer la distribution des données. Des tests de normalité Shapiro Wilk ont été appliqués. Dans les groupes de données normalement distribués, les différences significatives ont été déterminées par des tests T de Student à échantillons indépendants. Des tests F d'égalité des variances ont préalablement été réalisés. L'hypothèse nulle (H0) retenue est l'absence de différence significative. La valeur limite fixée pour le rejet de H0 est 0,05.

3. Résultats

3.1. Étude 1 : Évaluation de la variabilité des concentrations en proAKAP4 tout au long de la chaîne de préparation de la semence en vue de la fécondation *in vitro*

Les concentrations de proAKAP4 obtenues dans les paillettes (n=5 taureaux, 2 paillettes/taureau) ont été comprises entre 46,2 ng/10M spz et 75,6 ng/10M spz. La concentration moyenne a été de 61 ng/10M spz. La médiane obtenue a été de 58,5 ng/10M spz (Tableau XI).

Pour chaque taureau, les concentrations en proAKAP4 des deux paillettes analysées sont présentées dans le Tableau XI. La concentration en proAKAP4 a présenté une faible variabilité entre les deux paillettes de chaque taureau (coefficients de variation entre 0,02 et 0,07) (Tableau XI).

Tableau XI : Concentrations en proAKAP4 obtenues dans les paillettes des cinq taureaux de l'étude ainsi que la moyenne et le coefficient de variation (CV)

| Taureaux | Concentration en proAKAP4 paillette 1 (ng/10M spz) (Moyenne des deux mesures) | Concentration en proAKAP4 paillette 2 (ng/10M spz) (Moyenne des deux mesures) | Moyenne (/taureau) | CV (/taureau) |
|----------|--|--|--------------------|---------------|
| T1 | 60,7 | 56,4 | 58,6 | 0,05 |
| T2 | 70,2 | 65,5 | 67,9 | 0,05 |
| T3 | 55,9 | 54,4 | 55,2 | 0,02 |
| T4 | 75,6 | 73,9 | 74,8 | 0,02 |
| T5 | 50,8 | 46,2 | 48,5 | 0,07 |
| TOTAL | Moyenne : 61,0 | | | |
| | Médiane : 58,5 | | | |

Les concentrations en proAKAP4 des échantillons Sp ont présenté une variabilité acceptable entre les deux séances de FIV (coefficients de variation entre 0,05 et 0,15), sauf pour le Taureau 3 (CV = 0,34) (Tableau XII).

Tableau XII : Concentrations en proAKAP4 obtenues dans les échantillons sans préparation (Sp) des cinq taureaux de l'étude ainsi que le coefficient de variation (CV) entre les deux séances de FIV

| Taureaux | Séance FIV | Sp | CV |
|----------|------------|------------|------|
| | | ng/10M spz | |
| T1 | 1 | 44,1 | 0,06 |
| | 2 | 47,8 | |
| T2 | 1 | 40,1 | 0,12 |
| | 2 | 33,9 | |
| T3 | 1 | 18,6 | 0,34 |
| | 2 | 30,2 | |
| T4 | 1 | 50,6 | 0,05 |
| | 2 | 46,9 | |
| T5 | 1 | 31,5 | 0,15 |
| | 2 | 38,7 | |

Les concentrations en proAKAP4 des échantillons Cul ont présenté une variabilité élevée entre les deux séances de FIV (coefficients de variation entre 0,19 et 1,34) (Tableau XIII).

Tableau XIII : Concentrations en proAKAP4 obtenues dans les culots (Cul) des cinq taureaux de l'étude ainsi que le coefficient de variation (CV) entre les deux séances de FIV

| Taureaux | Séance FIV | Cul | CV |
|----------|------------|------------|------|
| | | ng/10M spz | |
| T1 | 1 | 18,5 | 0,54 |
| | 2 | 41,4 | |
| T2 | 1 | 109,8 | 0,27 |
| | 2 | 74,7 | |
| T3 | 1 | 2,5 | 1,34 |
| | 2 | 93,4 | |
| T4 | 1 | 139,5 | 0,19 |
| | 2 | 183 | |
| T5 | 1 | 143,5 | 0,49 |
| | 2 | 69,5 | |

En considérant l'ensemble des taureaux, la comparaison entre les concentrations en proAKAP4 des échantillons P et Sp a montré une différence significative (p -value < 0,001) (Tableau XIV). Dans l'intégralité des échantillons, une diminution de la concentration en proAKAP4 a été observée entre les échantillons P et Sp (Tableau XIV).

Tableau XIV : Comparaison des concentrations en proAKAP4 obtenues dans les paillettes (P) et les échantillons sans préparation (Sp) des cinq taureaux utilisés dans l'étude

| Taureaux | Séance FIV | P | Sp | |
|-------------------|------------|------------|------------|---|
| | | ng/10M spz | ng/10M spz | |
| T1 | 1 | 60,7 | 44,1 | ↓ |
| | 2 | 56,4 | 47,8 | ↓ |
| T2 | 1 | 70,2 | 40,1 | ↓ |
| | 2 | 65,5 | 33,9 | ↓ |
| T3 | 1 | 55,9 | 18,6 | ↓ |
| | 2 | 54,4 | 30,2 | ↓ |
| T4 | 1 | 75,6 | 50,6 | ↓ |
| | 2 | 73,9 | 46,9 | ↓ |
| T5 | 1 | 50,8 | 31,5 | ↓ |
| | 2 | 46,2 | 38,7 | ↓ |
| Moyenne | | 61,0 | 38,24 | |
| Écart type | | 10,00 | 9,84 | |
| p-value | | <0,001 | | |

En considérant l'ensemble des taureaux, la comparaison entre les concentrations en proAKAP4 des échantillons Sp et Cul a montré une différence significative (p-value=0,006) (Tableau XV). Elle a augmenté entre les échantillons Sp et Cul pour tous les taureaux sauf pour le Taureau 1 (Tableau XV).

Tableau XV : Comparaison des concentrations en proAKAP4 obtenues dans les échantillons sans préparation (Sp) et les culots (Cul) des cinq taureaux utilisés dans l'étude

| Taureaux | Séance FIV | Sp | Cul | |
|-------------------|------------|------------|------------|---|
| | | ng/10M spz | ng/10M spz | |
| T1 | 1 | 44,1 | 18,5 | ↓ |
| | 2 | 47,8 | 41,4 | ↓ |
| T2 | 1 | 40,1 | 109,8 | ↑ |
| | 2 | 33,9 | 74,7 | ↑ |
| T3* | 2 | 30,2 | 93,4 | ↑ |
| T4 | 1 | 50,6 | 139,5 | ↑ |
| | 2 | 46,9 | 183 | ↑ |
| T5 | 1 | 31,5 | 143,5 | ↑ |
| | 2 | 38,7 | 69,5 | ↑ |
| Moyenne | | 40,42 | 97,03 | |
| Écart type | | 7,44 | 52,50 | |
| p-value | | 0,006 | | |

- Les valeurs des concentrations pour la séance 1 du Taureau 3 n'ont pas été prises en compte dans l'analyse statistique du fait de l'aberrance de la valeur obtenue.

En considérant l'ensemble des taureaux, la comparaison entre les concentrations en proAKAP4 des échantillons P et Cul a montré une différence significative (p -value=0,03) (Tableau XVI). Elle a augmenté entre les échantillons P et Cul pour tous les taureaux sauf pour le Taureau 1 (Tableau XVI).

De plus, la concentration en proAKAP4 de la paillette n'a pas toujours été reliée à celle du culot. En effet, le Taureau 5 qui présentait la plus faible concentration en proAKAP4 dans la paillette (P) a, par la suite, présenté une excellente concentration dans le culot (Cul). Alors que le Taureau 2 qui présentait une concentration élevée dans la paillette a présenté une concentration équivalente voire inférieure à celle du Taureau 5 dans le culot (Tableau XVI).

Tableau XVI : Comparaison des concentrations en proAKAP4 obtenues dans les paillettes (P) et les culots (Cul) des cinq taureaux utilisés dans l'étude

| Taureaux | Séance FIV | P | Cul |
|-------------------|------------|------------|------------|
| | | ng/10M spz | ng/10M spz |
| T1 | 1 | 60,7 | 18,5 ↓ |
| | 2 | 56,4 | 41,4 ↓ |
| T2 | 1 | 70,2 | 109,8 ↑ |
| | 2 | 65,5 | 74,7 ↑ |
| T3* | 2 | 54,4 | 93,4 ↑ |
| T4 | 1 | 75,6 | 139,5 ↑ |
| | 2 | 73,9 | 183 ↑ |
| T5 | 1 | 50,8 | 143,5 ↑ |
| | 2 | 46,2 | 69,5 ↑ |
| Moyenne | | 61,5 | 97,0 |
| Écart type | | 10,43 | 52,50 |
| p-value | | 0,03 | |

- Les valeurs des concentrations pour la séance 1 du Taureau 3 n'ont pas été prises en compte dans l'analyse statistique du fait de l'aberrance de la valeur obtenue.

Compte tenu de la variabilité de la concentration de la proAKAP4 dans les échantillons manipulés (Sp et Cul), seule la concentration de la paillette sera utilisée pour l'analyse de l'issue du développement embryonnaire (Étude 2 et 2bis). Aussi, le seuil de répartition des taureaux dans les groupes proAKAP4 inf et proAKAP4 sup pour les Étude 2 et 2bis a été de 58,5 ng/10M spz, correspondant à la médiane de concentration de la proAKAP4 obtenue dans les paillettes des 5 taureaux (Tableau XI).

3.2. Étude 2 : Évaluation de la proAKAP4 comme biomarqueur du développement embryonnaire

Les sessions de FIV ont été réparties en deux groupes selon la concentration moyenne en proAKAP4 des paillettes du taureau utilisé pour la session.

Ainsi :

- proAKAP4 sup : sessions ayant été réalisées à partir des paillettes des Taureaux 1, 2 et 4 dont la concentration moyenne en proAKAP4 est supérieure à 58,5 ng/10M spz (Tableau XVII).
- proAKAP4 inf : sessions ayant été réalisées à partir des paillettes des Taureaux 3 et 5 dont la concentration moyenne en proAKAP4 est inférieure à 58,5 ng/10M spz (Tableau XVII).

Tableau XVII : Répartition des sessions de FIV en deux groupes (proAKAP4 inf et proAKAP4 sup) en fonction de la concentration en proAKAP4 des deux paillettes analysées

| | proAKAP4 sup >58,5 ng/10M spz | proAKAP4 inf <58,5 ng/10M spz |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| Taureaux | T1, T2, T4 | T3, T5 |
| Nombre de sessions analysées | N=6 | N=4 |
| Moyenne en proAKAP4 des paillettes (ng/10M spz) | 67,1 | 51,9 |
| Nombre de FIV analysées (n=57) | n=31 | n=26 |

La comparaison entre les deux groupes n'a pas été significative pour les paramètres de la production embryonnaire (zygotes mis culture, taux de segmentés, taux de blastocystes, taux d'embryons transférables) (Tableau XVIII).

Du fait de la taille réduite de l'échantillon, des écarts types très importants au sein des groupes ont été obtenus concernant les paramètres morphocinétiques, ne permettant pas la comparaison statistique des deux groupes.

Tableau XVIII : Comparaison de la production embryonnaire entre les groupes proAKAP4 inf et proAKAP4 sup sur un total de 57 FIV analysées

| | | Zygotes mis en culture | Segmentés | Blastocystes totaux J7 | Embryons transférables (congelés) |
|---------------------------------|-----------------|------------------------|-------------|------------------------|-----------------------------------|
| proAKAP4 sup n=31 FIV | Effectifs bruts | 249 | 212 | 112 | 87 |
| | Taux | | 0,85 | 0,45 | 0,35 |
| proAKAP4 inf n=26 FIV | Effectifs bruts | 192 | 171 | 92 | 69 |
| | Taux | | 0,89 | 0,48 | 0,36 |
| p-value | | 0,28 | 0,39 | 0,23 | 0,39 |

3.3. Étude 2bis : Élargissement de l'effectif de FIV

L'Étude 2 souffrant d'un manque de puissance statistique, nous avons choisi d'élargir la taille de l'échantillon de FIV analysées. L'augmentation de l'effectif a notamment permis l'étude de la corrélation entre la proAKAP4 et les paramètres morphocinétiques

Les groupes proAKAP4 inf et proAKAP4 sup ont été formés comme dans l'Étude 2, en utilisant la concentration de 58,5 ng/10M spz comme seuil de séparation. Ainsi les taureaux T3 et T5 ont été classés dans le groupe proAKAP4 inf et les taureaux T1, T2 et T4 dans le groupe proAKAP4 sup (Tableau XIX).

Tableau XIX : Répartition des taureaux en deux groupes (proAKAP4 inf et proAKAP4 sup) en fonction de la concentration moyenne en proAKAP4 des deux paillettes analysées

| | proAKAP4 sup >58,5 ng/10M spz | proAKAP4 inf <58,5 ng/10M spz |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| Taureaux | T1, T2, T4 | T3, T5 |
| Moyenne en proAKAP4 des paillettes (ng/10M spz) | 67,1 | 51,9 |
| Nombre de FIV analysées (n=164) | n=94 | n=70 |

Le Tableau XX présente pour chaque taureau, le nombre de FIV analysées ainsi que les effectifs bruts de la production embryonnaire obtenus au cours de l'ensemble de ces FIV.

Tableau XX : Effectifs bruts de la production embryonnaire (nombre de zygotes mis en culture, nombre de segmentés, nombre de blastocystes totaux à J7, nombres d'embryons transférables)

Pour chaque taureau, les effectifs présentés correspondent à la somme des effectifs de l'ensemble des FIV

| | Taureaux | n FIV | n Zygotes mis en culture | n Segmentés | n Blastocystes totaux J7 | n Embryons transférables (congelés) |
|--------------|----------|-------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------------------------------|
| proAKAP4 sup | T4 | 29 | 205 | 191 | 116 | 81 |
| | T2 | 39 | 332 | 292 | 138 | 112 |
| | T1 | 26 | 212 | 193 | 158 | 114 |
| proAKAP4 inf | T3 | 45 | 331 | 297 | 158 | 91 |
| | T5 | 25 | 177 | 155 | 86 | 67 |

Le taux d'embryons transférables a été significativement supérieur dans le groupe proAKAP4 sup par rapport au groupe proAKAP4 inf (p=0,0271). Un facteur multiplicateur de 1,3 a été observé (Tableau XXI).

Tableau XXI : Comparaison de la production embryonnaire entre les groupes proAKAP4 inf et proAKAP4 sup sur un total de 164 FIV analysées

| | | Zygotes mis en culture | Segmentés | Blastocystes totaux J7 | Embryons transférables (congelés) |
|---------------------------------|-----------------|------------------------|---------------|------------------------|-----------------------------------|
| proAKAP4 sup n=94 FIV | Effectifs bruts | 749 | 676 | 412 | 307 |
| | Taux | | 0,90 | 0,55 | 0,41 |
| proAKAP4 inf n=70 FIV | Effectifs bruts | 508 | 452 | 244 | 158 |
| | Taux | | 0,89 | 0,48 | 0,31 |
| p-value | | 0,2373 | 0,6265 | 0,2355 | 0,0271 |

Le Tableau XXII présente pour chaque taureau, les effectifs bruts de chaque catégorie morphocinétique des embryons obtenus au cours de l'ensemble des FIV analysées.

Tableau XXII : Effectifs bruts de chaque catégorie morphocinétique (catégorie A, B, C, D, clivés)

Pour chaque taureau, les effectifs présentés correspondent à la somme des effectifs de l'ensemble des FIV

| | Taureaux | n FIV | n Embryons transférables (congelés) | n Cat A | n Cat B | n Cat C | n Cat D | n Clivés |
|---------------------|----------|-------|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|
| proAKAP4 sup | T4 | 29 | 81 | 4 | 21 | 14 | 31 | 8 |
| | T2 | 39 | 112 | 7 | 24 | 28 | 46 | 5 |
| | T1 | 26 | 114 | 27 | 44 | 29 | 8 | 0 |
| proAKAP4 inf | T3 | 45 | 91 | 2 | 16 | 7 | 54 | 10 |
| | T5 | 25 | 67 | 8 | 17 | 18 | 15 | 2 |

Le taux d'embryons de catégorie D a été significativement supérieur dans le groupe proAKAP4 inf (p-value=0,022) (Tableau XXIII). Un facteur multiplicateur de 1,6 a été observé (Tableau XXIII). Pour rappel, la catégorie D est celle qui se distingue le plus morphocinétiquement parlant de la trajectoire morphocinétique « normale » décrite dans la littérature.

Tableau XXIII : Comparaison de la qualité des embryons obtenus entre les groupes proAKAP4 inf et proAKAP4 sup (analyse morphocinétique)

| | | Embryons transférables (congelés) | Catégorie A | Catégorie B | Catégorie C | Catégorie D | Clivés |
|---------------------------------|-----------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|------------|
| proAKAP4 sup n=94 FIV | Effectifs bruts | 307 | 38 | 89 | 71 | 85 | 13 |
| | Taux | 0,41 | 0,12 | 0,29 | 0,23 | 0,28 | 0,04 |
| proAKAP4 inf n=70 FIV | Effectifs bruts | 158 | 10 | 33 | 25 | 69 | 12 |
| | Taux | 0,31 | 0,06 | 0,21 | 0,16 | 0,44 | 0,08 |
| p-value | | 0,0271 | 0,11 | 0,09 | 0,10 | 0,022 | 0,2 |

3.4. Bilan des résultats

Le Tableau XXIV résume l'ensemble des résultats de nos 3 études.

Tableau XXIV : Bilan des résultats obtenus dans les études 1, 2 et 2bis

| | |
|-------------------|---|
| Étude 1 | <p>proAKAP4 stable dans les paillettes issues d'un même lot (éjaculat)</p> <p>Variabilité acceptable des échantillons Sp entre les deux séances de production <i>in vitro</i></p> <p>Variabilité élevée des échantillons Cul entre les deux séances de production <i>in vitro</i></p> <p>Diminution de la concentration en proAKAP4 entre les échantillons P et Sp</p> <p>Augmentation de la concentration en proAKAP4 entre les échantillons Sp et Cul</p> <p>Augmentation de la concentration en proAKAP4 entre les échantillons P et Cul</p> |
| Étude 2 | <p>n=57 FIV</p> <p>Absence de différence significative entre la concentration en proAKAP4 et la production embryonnaire</p> |
| Étude 2bis | <p>n=164 FIV</p> <p>Taux d'embryons transférables significativement supérieur dans le groupe proAKAP4 sup (p-value=0,0271)</p> <p>Taux d'embryons de catégorie D significativement supérieur dans le groupe proAKAP4 inf (p-value= 0,022)</p> |

4. Discussion

L'objectif de notre étude était d'évaluer la proAKAP4 comme biomarqueur de la fertilité *in vitro* chez les bovins. En effet, la majorité des travaux ayant étudié la proAKAP4 concerne la fertilité *in vivo* [90], [129]. Or, une bonne fertilité *in vivo* n'est pas la garantie d'une bonne fertilité *in vitro* [2], [38]. En effet, les conditions biologiques de la fécondation *in vitro* sont très différentes des conditions *in vivo*. La distance à parcourir pour la fécondation est moindre, l'environnement artificiel est dépourvu de l'ensemble de facteurs cellulaires utérins présents lors d'une fécondation *in vivo*. De plus, la semence est soumise à de nombreuses manipulations avant la mise en contact avec les ovocytes. L'objectif de notre travail était donc, dans un premier temps, de déterminer quelles conséquences ces manipulations peuvent avoir sur la concentration en proAKAP4 et quel est le matériel d'élection pour l'évaluation de la proAKAP4 dans le contexte de FIV. Dans un second temps, notre objectif était d'évaluer l'existence d'une corrélation entre la proAKAP4 et les résultats du développement embryonnaire.

Nous avons choisi d'évaluer la variabilité des concentrations en proAKAP4 tout au long de la chaîne de préparation de la semence (échantillons Sp et Cul). A notre connaissance, l'intégralité des précédentes études a mesuré la concentration en proAKAP4 dans la semence. Mais, l'utilisation de ces échantillons intermédiaires pourrait être utile dans le cas où le laboratoire ne possède qu'un nombre limité de paillettes et que la concentration de proAKAP4 n'a pas été prédéterminée. C'est pourquoi nous avons souhaité vérifier si les concentrations en proAKAP4 des échantillons intermédiaires sont reliées aux concentrations obtenues dans les paillettes.

Dans la première partie de l'Étude 1, il a été montré une faible variabilité des concentrations en proAKAP4 entre les deux paillettes analysées. Ce résultat reste à nuancer puisqu'il s'appuie sur la comparaison de seulement deux paillettes par taureau. Chez les différentes espèces, la plupart des études ont quantifié la proAKAP4 dans les paillettes issues d'éjaculats différents [90], [99], [147], [149], [150]. Toutes s'accordent sur le fait que, pour un même individu, les concentrations en proAKAP4 peuvent varier d'un éjaculat à l'autre (au cours de la saison notamment [99]). En revanche, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à évaluer la stabilité des concentrations en proAKAP4 pour des paillettes issues d'un même lot.

La variabilité des concentrations en proAKAP4 des échantillons sans préparation (Sp) entre les deux séances de FIV était acceptable ($CV < 0,15$) pour la majorité des Taureaux. Les résultats de l'Étude 1 ont montré une diminution significative des concentrations en proAKAP4 entre les échantillons P et Sp ($p < 0,05$). Or, d'un point de vue théorique, ces échantillons ne diffèrent que par un cycle de décongélation / congélation. Une étude récente menée chez le verrat a montré une stabilité de la proAKAP4 au cours d'une succession de cycles de congélation/décongélation [144]. Cependant, il est à noter des différences méthodologiques entre nos études. En effet, les auteurs ont répété des cycles de congélation / décongélation à -20°C [144] ; alors que dans cette étude les échantillons ont été congelés en carboglace immédiatement après la décongélation, sans ajout supplémentaire de dilueur. Ces échantillons ont été conservés à -80°C , puis envoyés par transporteur dans la carboglace au laboratoire d'analyses, pendant une durée de transport d'environ 24 heures. De plus, il existe

d'importantes variations quant à la sensibilité du sperme vis-à-vis de la cryoconservation. La membrane plasmique des spermatozoïdes de taureau contient une faible quantité de cholestérol, les rendant particulièrement sensibles à la congélation [58]. Par ailleurs, plusieurs travaux suggèrent que la stabilité de proAKAP4 dépend des cryoprotecteurs et dilueurs utilisés [140], [148]. En effet, ils peuvent avoir un impact sur la qualité du sperme après décongélation [88] ainsi que sur les concentrations en proAKAP4. Cela pourrait s'expliquer par deux hypothèses [150] : À des concentrations trop élevées, les cryoprotecteurs/dilueurs utilisés peuvent être délétères pour le spermatozoïde et/ou ils accélèrent la conversion de proAKAP4 en AKAP4. Classiquement, chez le taureau, l'association glycérol/jaune d'œuf est utilisée comme cryoprotecteur. Cependant, dans notre étude, la semence utilisée étant une semence commerciale, ni le dilueur ni le cryoprotecteur utilisés pour la préparation de la paillette n'ont été informés. Enfin, ces échantillons ont été prélevés juste après leur dépôt sur le gradient. Il est donc possible que l'échantillon Sp se retrouve légèrement contaminé par le percoll, contribuant ainsi à réduire la concentration en proAKAP4. Pour cela, il aurait été préférable de verser le contenu de la paillette dans un contenant pour prélever l'échantillon Sp, plutôt que d'effectuer le prélèvement après le dépôt sur le percoll ou bien de procéder à une étape de lavage. Dans ce contexte, des études plus approfondies sur la stabilité de la proAKAP4 au cours de la cryoconservation du sperme de taureau seront nécessaires.

La centrifugation en gradient discontinu, utilisée pour sélectionner les spermatozoïdes vivants et les plus motiles, a eu une tendance à favoriser la concentration en proAKAP4 (en ng/10M spz) puisque la concentration en proAKAP4 du culot (Cul) était significativement supérieure à celle de la paillette (P) (p -value $<0,05$) et à celle du matériel Sp (p -value $<0,05$). Ce résultat est logique, vu la fonction de cette étape de la préparation.

Cependant, pour les échantillons Cul, nous avons observé une variabilité élevée entre les deux séances de production, pourtant réalisées avec des paillettes provenant du même lot. Cette variabilité pourrait s'expliquer par le nombre d'étapes important jusqu'à l'obtention du culot (dépôt de la semence dans le tube de gradient, centrifugation, élimination du surnageant). Nous avons effectué cette comparaison entre des échantillons obtenus lors de séance de routine réalisées à des dates différentes afin de voir à quel point une collecte de matériel biologique pendant une séance serait pertinente. Cette grande variabilité n'est pas en faveur, en l'état actuel, de l'utilisation des échantillons ayant été soumis aux processus de manipulations pour le dosage de proAKAP4. Il serait important de réaliser de nouveaux travaux afin de vérifier si une meilleure standardisation de la procédure de collecte des échantillons (notamment avec des mesures multiples intra séance) pourrait améliorer ces résultats. Dans le cas contraire, il serait nécessaire de comprendre l'origine d'une telle variabilité si elle n'était pas d'ordre purement technique. Cet ensemble de mesures sur toute la chaîne de préparation de la semence a donc montré que, dans les conditions de terrain dans lesquelles a été réalisée cette étude, seules les paillettes étaient capables de fournir une information suffisamment standardisée.

Dans notre étude, nous avons pour la première fois montré une corrélation positive entre la concentration en proAKAP4 dans la semence et la fertilité *in vitro* des taureaux. En effet, les taureaux présentant une concentration moyenne de proAKAP4 supérieure à 58,5 ng/10M spz ont présenté un taux d'embryons transférables significativement supérieure à celui des taureaux présentant une concentration en proAKAP4 inférieure à ce seuil (p -value $<0,05$). Nos résultats corroborent avec ceux obtenus chez l'homme. Une précédente étude clinique menée dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation (AMP) avait montré une meilleure qualité du développement embryonnaire à J2-J3 ainsi qu'un taux supérieur de cryoconservation des embryons pour les patients dont la proAKAP4 était intègre c'est-à-dire non protéolysée [54].

Ce résultat est cohérent avec la fonction de la proAKAP4/AKAP4 au sein des spermatozoïdes. En effet, une condition essentielle à la fécondation de l'ovocyte est la motilité des spermatozoïdes. Au stade mature, l'AKAP4 permet de recruter la protéine kinase A (PKA) au sein de la gaine fibreuse et favorise ainsi la phosphorylation locale des substrats [49] ainsi que la régulation des fonctions flagellaires telles que l'initiation et l'entretien de la motilité des spermatozoïdes [49]. Les souris KO pour le gène AKAP4 sont stériles [119], [120]. De nombreux travaux ont mis en avant la corrélation entre la concentration en proAKAP4 et la motilité spermatique [90], [121], [129], [140]. Outre son rôle pivot dans la motilité des spermatozoïdes, la proAKAP4/AKAP4 est également un indicateur de la maturation des spermatozoïdes. L'expression du gène AKAP4 est strictement limitée aux stades de la spermiogénèse. Aussi, tout événement ayant lieu à ce moment aura des conséquences sur le stock de proAKAP4 disponible. De plus, L'AKAP4 et la proAKAP4 sont phosphorylées au cours de la capacitation comme le démontrent des études chez la souris [115], l'homme [116], le taureau et le buffle [97]. Elles subissent une phosphorylation de leurs résidus tyrosines et sérines par les Extracellular signal-Regulated kinases (ERK) 1 et 2 sous le contrôle de la PKC [114]. En plus d'être elles-mêmes phosphorylées, il semblerait que la proAKAP4 et l'AKAP4 contrôlent la phosphorylation d'autres protéines au cours de la capacitation. Une étude récente a montré qu'une baisse d'activité d'AKAP4 entraînait une réduction globale des profils de phosphorylations après capacitation [117]. Ainsi, une concentration plus élevée en proAKAP4 pourrait garantir une meilleure capacitation *in vitro*.

Parmi tous les paramètres analysés au cours de la production embryonnaire, seul le taux d'embryons transférables (congelés) a présenté une différence significative entre les deux groupes. Pourtant, les taux de segmentés n'étaient pas différents entre les deux groupes. Cela peut s'expliquer par le fait qu'un grand nombre d'embryons initient leur segmentation mais sont incapables de se développer jusqu'au stade blastocyste. La proAKAP4 pourrait donc être un bon marqueur de l'apport paternel à la capacité des embryons à poursuivre leur développement jusqu'à atteindre le stade de blastocyste transférable.

Concernant les critères morphocinétiques, nous avons montré une différence significative (p -value $<0,05$) pour les embryons de catégorie D (catégorie morphocinétique de plus faible qualité), sous représentés dans le groupe proAKAP4 sup. Dans le même sens, il semblerait que les taureaux proAKAP4 sup produisent une proportion plus importante d'embryons de catégorie B (p -value=0,09), embryons possédant une trajectoire morphocinétique très proche du développement normal décrit dans la littérature. Ce dernier résultat reste à vérifier dans un plus grand

échantillon. La proAKAP4 pourrait donc être un bon marqueur pour la prédiction de la qualité des embryons.

Par ailleurs, notre étude comporte un important biais de sélection. En effet, aucun des taureaux utilisés dans notre étude n'a présenté une mauvaise qualité spermatique selon le paramètre proAKAP4. D'après les données de référence fournies par le fabricant des kits Bull 4MID, le seuil établi de 58,5 ng/10M de spz permet de discriminer les taureaux présentant une qualité spermatique « Excellente » de ceux présentant une qualité spermatique « Très bonne ». Il serait intéressant de mener une étude à partir d'un pool de taureaux présentant des concentrations en proAKAP4 plus disparates.

5. Conclusion

Les données de notre étude suggèrent que la proAKAP4 dans la paillette pourrait être utilisée comme biomarqueur de la fertilité *in vitro* chez les taureaux. En effet, au sein d'un même éjaculat, il semble que la concentration en proAKAP4 des paillettes soit peu variable. En l'état actuel, la mesure de proAKAP4 sur des échantillons intermédiaires d'une routine de FIV (contenu de la paillette déposé sur le percoll, culot) sont trop variables et ne seraient pas indiqués comme matériel de prédilection. L'étude clinique réalisée de manière rétrospective a démontré une corrélation positive entre la concentration en proAKAP4 de la paillette et le taux d'embryons transférables obtenus après fécondation *in vitro* ainsi qu'une corrélation négative entre la concentration en proAKAP4 et la production d'embryons de catégorie D. Ces résultats préliminaires sont encourageants et doivent être vérifiés et approfondis sur une plus grande cohorte comportant aussi des taureaux plus disparates pour le paramètre proAKAP4.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La proAKAP4 est une protéine de structure spécifique des spermatozoïdes strictement localisée au niveau du flagelle pressentie comme un biomarqueur de qualité spermatique. De nombreuses études ont mis en évidence des corrélations positives entre la proAKAP4 et les paramètres de l'analyse conventionnelle du sperme ; en particulier la motilité et la morphologie des spermatozoïdes. De plus, plusieurs travaux ont démontré l'impact du stress oxydatif ou de perturbateurs de la spermatogénèse sur le stock de proAKAP4/AKAP4. Cela permet d'envisager la protéine comme le reflet des événements ayant lieu au cours de la « vie » des spermatozoïdes, notamment lors des processus de maturation des gamètes. Ces études montrent donc une corrélation indirecte entre la proAKAP4 et la fertilité *in vivo* de la semence. En revanche, aucune étude ne s'est intéressée à essayer de mettre en corrélation la concentration en proAKAP4 de la semence utilisée en FIV et le développement embryonnaire *in vitro* chez les bovins après OPU/FIV.

La quantification de la proAKAP4 tout au long de la chaîne de préparation de la semence nous a permis d'établir la paillette comme étant le matériel d'élection pour évaluer la proAKAP4 en tant que biomarqueur de la fertilité mâle *in vitro*. En effet, dans les conditions de terrain dans lesquelles a été réalisée l'Étude 1, seules les paillettes ont présenté une concentration stable. Les échantillons intermédiaires (Sp et Cul), soumis aux manipulations, ont présenté une variabilité trop importante pour être exploités.

Sur 164 FIV, nous avons mis en évidence une corrélation positive entre la concentration en proAKAP4 et le taux d'embryons transférables obtenus. Les FIV réalisées avec de la semence ayant une concentration en proAKAP4 supérieure à 58ng/10M spz présentaient un taux d'embryons transférables plus important que les FIV réalisées à partir de semence ayant une concentration en proAKAP4 inférieure à 58,5ng/10M spz. De plus, nous avons montré une corrélation négative entre la concentration en proAKAP4 et la production d'embryons de catégorie D, catégorie la plus éloignée de la trajectoire morphocinétique « normale » décrite dans la littérature. Si nos premiers résultats se confirment, la quantification de la proAKAP4 pourrait constituer un nouveau test permettant l'évaluation simple, rapide et en routine d'un nouvel indicateur de qualité spermatique et pronostique de l'issue de la FIV.

L'objectif à terme serait de pouvoir quantifier la proAKAP4 dans le lot de paillettes utilisées pour la FIV en amont des séances. Cela permettrait de sélectionner les taureaux ayant une meilleure fertilité *in vitro* et donc permettre d'obtenir un nombre plus important d'embryons transférables produits *in vitro* ainsi que des embryons de meilleur qualité, d'avantage susceptibles de poursuivre leur développement.

LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LIVRES/OUVRAGES :

[12] C. Thibault et M.-C. Levasseur, *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, Nouv. éd. ref. Paris: INRA Ellipses, 2001.

[13] P. Hyttel, Éd., *Essentials of domestic animal embryology*. Edinburgh ; New York: Saunders/Elsevier, 2010.

[14] C. A. Price et E. F. Eikenberry, *Centrifugation in density gradients*. New York, N.Y: Academic Press, 1982.

[33] C. Ponsart *et al.*, « Chapitre 30 : Biotechnologies des gamètes et de l'embryon », 2014, p. 800.

[37] M. Saint-Dizier et S. Chastant-Maillard, *La reproduction animale et humaine*. in Collection Synthèses. Versailles: Éditions Quae, 2014.

[44] T. M. Plant et A. J. Zeleznik, *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 4th edition., vol. 1. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2015.

[45] M. K. Skinner, Éd., *Encyclopedia of reproduction*, Second edition. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2018.

[46] R. M. Hopper, Éd., *Bovine Reproduction*, 1^{re} éd. Wiley, 2021. doi: 10.1002/9781119602484.

[47] B. Hafez et E. S. E. Hafez, Éd., *Reproduction in farm animals*, 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

ARTICLES DE REVUES :

[4] P. J. Hansen, « The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle- why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? », *J. Anim. Sci.*, vol. 98, n° 11, p. skaa288, nov. 2020, doi: 10.1093/jas/skaa288.

[5] D. Rizos, M. Clemente, P. Bermejo-Alvarez, J. de La Fuente, P. Lonergan, et A. Gutiérrez-Adán, « Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality », *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.*, vol. 43 Suppl 4, p. 44-50, oct. 2008, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x.

[6] D. K. de Souza, L. P. Salles, et A. a. M. Rosa e Silva, « Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos », *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.*, vol. 48, n° 3, p. 191-197, mars 2015, doi: 10.1590/1414-431X20143744.

- [7] D. Peddinti, B. Nanduri, A. Kaya, J. M. Feugang, S. C. Burgess, et E. Memili, « Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility », *BMC Syst. Biol.*, vol. 2, p. 19, févr. 2008, doi: 10.1186/1752-0509-2-19.
- [8] K. Schellander *et al.*, « In vitro fertilization of bovine follicular oocytes recovered by laparoscopy », *Theriogenology*, vol. 31, n° 4, p. 927-934, avr. 1989, doi: 10.1016/0093-691x(89)90038-1.
- [9] M. C. Pieterse, K. A. Kappen, T. A. Kruip, et M. A. Taverne, « Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries », *Theriogenology*, vol. 30, n° 4, p. 751-762, oct. 1988, doi: 10.1016/0093-691x(88)90310-x.
- [11] P. Lonergan, C. Carolan, et P. Mermillod, « Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions », *Reprod. Nutr. Dev.*, vol. 34, n° 4, p. 329-339, 1994, doi: 10.1051/rnd:19940405.
- [15] A. J. Edmond, S. P. Brinsko, C. C. Love, T. L. Blanchard, S. R. Teague, et D. D. Varner, « Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of equine sperm », *Theriogenology*, vol. 77, n° 5, p. 959-966, mars 2012, doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.002.
- [16] N. H. Ing, D. W. Forrest, C. C. Love, et D. D. Varner, « Dense spermatozoa in stallion ejaculates contain lower concentrations of mRNAs encoding the sperm specific calcium channel 1, ornithine decarboxylase antizyme 3, aromatase, and estrogen receptor alpha than less dense spermatozoa », *Theriogenology*, vol. 82, n° 2, p. 347-353, juill. 2014, doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.04.016.
- [17] A. Johannisson, J. M. Morrell, J. Thorén, M. Jönsson, A.-M. Dalin, et H. Rodriguez-Martinez, « Colloidal centrifugation with Androcoll-E prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 116, n° 1-2, p. 119-128, nov. 2009, doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.01.008.
- [18] A. Valcárcel, M. A. de las Heras, D. F. Moses, L. J. Perez, et H. Baldassarre, « Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 41, n° 3-4, p. 215, 1996.
- [19] G. Marzano *et al.*, « Sperm selection in assisted reproduction: A review of established methods and cutting-edge possibilities », *Biotechnol. Adv.*, vol. 40, p. 107498, 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107498.
- [20] R. W. Lenz, G. D. Ball, M. L. Leibfried, R. L. Ax, et N. L. First, « In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes », *Biol. Reprod.*, vol. 29, n° 1, p. 173-179, août 1983, doi: 10.1095/biolreprod29.1.173.

- [21] J. J. Parrish, « Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin », *Theriogenology*, vol. 81, n° 1, p. 67-73, janv. 2014, doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005.
- [22] L. B. Ferré, M. E. Kjelland, L. B. Strøbech, P. Hyttel, P. Mermillod, et P. J. Ross, « Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods », *Anim. Int. J. Anim. Biosci.*, vol. 14, n° 5, p. 991-1004, mai 2020, doi: 10.1017/S1751731119002775.
- [23] M. M. Rahman, M. Rahman, N. Juyena, et M. Bhuiyan, « Optimization of in vitro fertilization technique for oocytes of indigenous zebu cows », *J. Anim. Reprod. Biotechnol.*, vol. 35, p. 142-148, juin 2020, doi: 10.12750/JARB.35.2.142.
- [24] P. Tríbulo, R. M. Rivera, M. S. Ortega Obando, E. A. Jannaman, et P. J. Hansen, « Production and Culture of the Bovine Embryo », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 2006, p. 115-129, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-9566-0_8.
- [25] Z. Machaty, J. Peippo, et A. Peter, « Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology », *Theriogenology*, vol. 78, n° 5, p. 937-950, sept. 2012, doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.04.003.
- [27] B. Grisart, A. Massip, et F. Dessy, « Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium », *J. Reprod. Fertil.*, vol. 101, n° 2, p. 257-264, juill. 1994, doi: 10.1530/jrf.0.1010257.
- [28] P. Boyer et M. Boyer, « [Non invasive evaluation of the embryo: morphology of preimplantation embryos] », *Gynecol. Obstet. Fertil.*, vol. 37, n° 11-12, p. 908-916, 2009, doi: 10.1016/j.gyobfe.2009.09.018.
- [29] A. A. Mandawala, S. C. Harvey, T. K. Roy, et K. E. Fowler, « Time-lapse embryo imaging and morphokinetic profiling: Towards a general characterisation of embryogenesis », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 174, p. 2-10, nov. 2016, doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.09.015.
- [30] A. Massip et J. Mulnard, « Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts », *J. Reprod. Fertil.*, vol. 58, n° 2, p. 475-478, mars 1980, doi: 10.1530/jrf.0.0580475.
- [32] H. N. Ciray *et al.*, « Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group », *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 29, n° 12, p. 2650-2660, déc. 2014, doi: 10.1093/humrep/deu278.
- [34] G. Vajta et M. Kuwayama, « Improving cryopreservation systems », *Theriogenology*, vol. 65, n° 1, p. 236-244, janv. 2006, doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.026.

- [35] A. E. Crosier, P. W. Farin, M. J. Dykstra, J. E. Alexander, et C. E. Farin, « Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro », *Biol. Reprod.*, vol. 64, n° 5, p. 1375-1385, mai 2001, doi: 10.1095/biolreprod64.5.1375.
- [36] S. Iwasaki, N. Yoshiba, H. Ushijima, S. Watanabe, et T. Nakahara, « Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo », *J. Reprod. Fertil.*, vol. 90, n° 1, p. 279-284, sept. 1990, doi: 10.1530/jrf.0.0900279.
- [38] D. Rizos, F. Ward, P. Duffy, M. P. Boland, et P. Lonergan, « Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality », *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 61, n° 2, p. 234-248, févr. 2002, doi: 10.1002/mrd.1153.
- [39] H. J. Leese, « Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on », *Reprod. Camb. Engl.*, vol. 143, n° 4, p. 417-427, avr. 2012, doi: 10.1530/REP-11-0484.
- [40] H. J. Leese, R. G. Sturmey, C. G. Baumann, et T. G. McEvoy, « Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules », *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 22, n° 12, p. 3047-3050, déc. 2007, doi: 10.1093/humrep/dem253.
- [41] D. Corcoran *et al.*, « Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos », *Reprod. Camb. Engl.*, vol. 131, n° 4, p. 651-660, avr. 2006, doi: 10.1530/rep.1.01015.
- [42] C. E. Farin, P. W. Farin, et J. A. Piedrahita, « Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos », *J. Anim. Sci.*, vol. 82 E-Suppl, p. E53-62, 2004, doi: 10.2527/2004.8213_supplE53x.
- [48] E. C. Raff, H. D. Hoyle, E. M. Popodi, et F. R. Turner, « Axoneme β -tubulin sequence determines attachment of outer dynein arms », *Curr. Biol. CB*, vol. 18, n° 12, p. 911-914, juin 2008, doi: 10.1016/j.cub.2008.05.031.
- [49] M. Luconi, G. Cantini, E. Baldi, et G. Forti, « Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction », *Front. Biosci. Landmark Ed.*, vol. 16, n° 4, p. 1315-1330, janv. 2011, doi: 10.2741/3791.
- [50] R. M. Turner, « Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation », *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 18, n° 1-2, p. 25-38, 2006, doi: 10.1071/rd05120.
- [51] R. Pereira, R. Sá, A. Barros, et M. Sousa, « Major regulatory mechanisms involved in sperm motility », *Asian J. Androl.*, vol. 19, n° 1, p. 5-14, 2017, doi: 10.4103/1008-682X.167716.

- [52] M. S. Lehti et A. Sironen, « Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects† », *Biol. Reprod.*, vol. 97, n° 4, p. 522-536, oct. 2017, doi: 10.1093/biolre/iox096.
- [53] E. M. Eddy, K. Toshimori, et D. A. O'Brien, « Fibrous sheath of mammalian spermatozoa », *Microsc. Res. Tech.*, vol. 61, n° 1, p. 103-115, mai 2003, doi: 10.1002/jemt.10320.
- [55] K. Miki *et al.*, « Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, n° 47, p. 16501-16506, nov. 2004, doi: 10.1073/pnas.0407708101.
- [57] H. Sieme, H. Oldenhof, et W. F. Wolkers, « Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation », *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.*, vol. 50 Suppl 3, p. 20-26, sept. 2015, doi: 10.1111/rda.12594.
- [58] P. Peris-Frau *et al.*, « Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n° 8, p. 2781, avr. 2020, doi: 10.3390/ijms21082781.
- [59] W. C. L. Ford, « Regulation of sperm function by reactive oxygen species », *Hum. Reprod. Update*, vol. 10, n° 5, p. 387-399, 2004, doi: 10.1093/humupd/dmh034.
- [60] R. J. Aitken et B. Nixon, « Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored », *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 19, n° 12, p. 785-793, déc. 2013, doi: 10.1093/molehr/gat067.
- [61] M. Delehedde, « The Sperm Specific Protein Proakap4 as an Innovative Marker to Evaluate Sperm Quality and Fertility », *J. Dairy Vet. Sci.*, vol. 11, n° 1, mars 2019, doi: 10.19080/JDVS.2019.11.555803.
- [64] J. Verstegen, M. Iguer-Ouada, et K. Onclin, « Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice », *Theriogenology*, vol. 57, n° 1, p. 149-179, janv. 2002, doi: 10.1016/s0093-691x(01)00664-1.
- [65] P. Kathiravan, J. Kalatharan, G. Karthikeya, K. Rengarajan, et G. Kadirvel, « Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system--a review », *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.*, vol. 46, n° 1, p. 165-172, févr. 2011, doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x.
- [66] A. Singh, A. Kumar, et A. Bisla, « Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science: A review », *Indian J. Anim. Sci.*, vol. 91, p. 419-429, juin 2021, doi: 10.56093/ijans.v91i6.115435.
- [67] DUMONT, « Appréciation de l'activité sexuelle du taureau reproducteur », vol. 28, n° 185, p. 19-32, 1997.

- [69] R. J. Aitken, « Sperm function tests and fertility », *Int. J. Androl.*, vol. 29, n° 1, p. 69-75; discussion 105-108, févr. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00630.x.
- [70] P. B. Farrell, G. A. Presicce, C. C. Brockett, et R. H. Foote, « Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility », *Theriogenology*, vol. 49, n° 4, p. 871-879, mars 1998, doi: 10.1016/S0093-691X(98)00036-3.
- [71] M. M. Matzuk et D. J. Lamb, « The biology of infertility: research advances and clinical challenges », *Nat. Med.*, vol. 14, n° 11, p. 1197-1213, nov. 2008, doi: 10.1038/nm.f.1895.
- [72] B. Domon et R. Aebersold, « Mass spectrometry and protein analysis », *Science*, vol. 312, n° 5771, p. 212-217, avr. 2006, doi: 10.1126/science.1124619.
- [73] R. Oliva, S. de Mateo, et J. M. Estanyol, « Sperm cell proteomics », *Proteomics*, vol. 9, n° 4, p. 1004-1017, févr. 2009, doi: 10.1002/pmic.200800588.
- [74] A. Amaral, J. Castillo, J. Ramalho-Santos, et R. Oliva, « The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science », *Hum. Reprod. Update*, vol. 20, n° 1, p. 40-62, 2014, doi: 10.1093/humupd/dmt046.
- [75] J. Martínez-Heredia, J. M. Estanyol, J. L. Ballescà, et R. Oliva, « Proteomic identification of human sperm proteins », *Proteomics*, vol. 6, n° 15, p. 4356-4369, août 2006, doi: 10.1002/pmic.200600094.
- [76] M. R. Ugur, D. D. Guerreiro, A. A. Moura, et E. Memili, « Identification of biomarkers for bull fertility using functional genomics », *Anim. Reprod.*, vol. 19, n° 1, p. e20220004, doi: 10.1590/1984-3143-AR2022-0004.
- [77] G. E. Olson, D. W. Hamilton, et D. W. Fawcett, « Isolation and Characterization of the Fibrous Sheath of Rat Epididymal Spermatozoa1 », *Biol. Reprod.*, vol. 14, n° 5, p. 517-530, juin 1976, doi: 10.1095/biolreprod14.5.517.
- [78] R. Oko, « Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa », *Biol. Reprod.*, vol. 39, n° 1, p. 169-182, août 1988, doi: 10.1095/biolreprod39.1.169.
- [79] M. Brito, J. Figueroa, E. U. Maldonado, J. C. Vera, et L. O. Burzio, « The major component of the rat sperm fibrous sheath is a phosphoprotein », *Gamete Res.*, vol. 22, n° 2, p. 205-217, févr. 1989, doi: 10.1002/mrd.1120220208.
- [80] A. Carrera, G. L. Gerton, et S. B. Moss, « The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins », *Dev. Biol.*, vol. 165, n° 1, p. 272-284, sept. 1994, doi: 10.1006/dbio.1994.1252.

- [81] R. M. Turner, L. R. Johnson, L. Haig-Ladewig, G. L. Gerton, et S. B. Moss, « An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. Genomic organization, protein kinase A-RII binding, and distribution of the precursor in the sperm tail », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 48, p. 32135-32141, nov. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.48.32135.
- [82] S. Carracedo *et al.*, « The sperm specific proAKAP4 polypeptide exhibited conserved functions, localizations and metabolism among mammals », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 220, p. 106448, sept. 2020, doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106448.
- [83] Y. Hu, H. Yu, A. J. Pask, D. A. O'Brien, G. Shaw, et M. B. Renfree, « A-kinase anchoring protein 4 has a conserved role in mammalian spermatogenesis », *Reprod. Camb. Engl.*, vol. 137, n° 4, p. 645-653, avr. 2009, doi: 10.1530/REP-08-0337.
- [84] D. A. Skerrett-Byrne *et al.*, « Proteomic analysis of koala (*Phascogale cinereus*) spermatozoa and prostatic bodies », *Proteomics*, vol. 21, n° 19, p. e2100067, oct. 2021, doi: 10.1002/pmic.202100067.
- [85] P. R. Brown, K. Miki, D. B. Harper, et E. M. Eddy, « A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum », *Biol. Reprod.*, vol. 68, n° 6, p. 2241-2248, juin 2003, doi: 10.1095/biolreprod.102.013466.
- [86] L. R. Johnson *et al.*, « Assembly of AKAP82, a protein kinase A anchor protein, into the fibrous sheath of mouse sperm », *Dev. Biol.*, vol. 192, n° 2, p. 340-350, déc. 1997, doi: 10.1006/dbio.1997.8767.
- [87] B. Mohapatra, S. Verma, S. Shankar, et A. Suri, « Molecular cloning of human testis mRNA specifically expressed in haploid germ cells, having structural homology with the A-kinase anchoring proteins », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 244, n° 2, p. 540-545, mars 1998, doi: 10.1006/bbrc.1998.8079.
- [88] M. Delehedde, S. Carracedo, M. Selleslagh, B. Lamia, et N. Sergeant, « ProAKAP4 polypeptide as a biomarker of sperm functionality and male fertility disorders », vol. 2, p. 13-19, janv. 2020.
- [89] R. M. O. Turner, R. L. M. Eriksson, G. L. Gerton, et S. B. Moss, « Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82 », *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 5, n° 9, p. 816-824, sept. 1999, doi: 10.1093/molehr/5.9.816.
- [90] M. Delehedde *et al.*, « Assessment of the sperm specific protein proAKAP4 as a marker to evaluate sperm quality and fertility in Holstein bulls. », vol. 43, p. 472, juill. 2019.
- [91] S. B. Moss, R. M. Turner, K. L. Burkert, H. VanScoy Butt, et G. L. Gerton, « Conservation and function of a bovine sperm A-kinase anchor protein homologous to mouse AKAP82 », *Biol. Reprod.*, vol. 61, n° 2, p. 335-342, août 1999, doi: 10.1095/biolreprod61.2.335.

- [92] J. M. Teijeiro, M. O. Cabada, et P. E. Marini, « Sperm binding glycoprotein (SBG) produces calcium and bicarbonate dependent alteration of acrosome morphology and protein tyrosine phosphorylation on boar sperm », *J. Cell. Biochem.*, vol. 103, n° 5, p. 1413-1423, avr. 2008, doi: 10.1002/jcb.21524.
- [93] M. F. Riesco *et al.*, « ProAKAP4 as Novel Molecular Marker of Sperm Quality in Ram: An Integrative Study in Fresh, Cooled and Cryopreserved Sperm », *Biomolecules*, vol. 10, n° 7, p. 1046, juill. 2020, doi: 10.3390/biom10071046.
- [94] R. M. O. Turner, R. Casas-Dolz, K. L. Schlingmann, et S. Hameed, « Characterization of an A-kinase anchor protein in equine spermatozoa and examination of the effect of semen cooling and cryopreservation on the binding of that protein to the regulatory subunit of protein kinase-A », *Am. J. Vet. Res.*, vol. 66, n° 6, p. 1056-1064, juin 2005, doi: 10.2460/ajvr.2005.66.1056.
- [95] C. Di, « Are AKAP4 and proAKAP4 Found in Canine Semen? Preliminary Results », *J. Aerosp. Eng. Mech.*, vol. 3, n° 1, Art. n° 1, mars 2021, doi: 10.36959/758/542.
- [96] K. N. Jha et S. Shivaji, « Identification of the major tyrosine phosphorylated protein of capacitated hamster spermatozoa as a homologue of mammalian sperm a kinase anchoring protein », *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 61, n° 2, p. 258-270, févr. 2002, doi: 10.1002/mrd.1155.
- [97] G. Jagan Mohanarao et S. K. Atreja, « Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 123, n° 1-2, p. 40-47, janv. 2011, doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.11.013.
- [98] A. Ugarelli, B. Medranda, A. Santiani, et S. Evangelista, « Identification of six genes related to fertility in alpacas », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 194, p. e12-e13, juill. 2018, doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.030.
- [99] C. Malo, S. Carracedo, M. Delehedde, N. Sergeant, et J. A. Skidmore, « Identification of proAKAP4 concentration variations in dromedary sperm and their correlation with monthly semen parameters », *Reprod. Fertil.*, vol. 2, n° 4, p. 268-279, déc. 2021, doi: 10.1530/RAF-21-0055.
- [100] P. Dobrynin *et al.*, « Genomic legacy of the African cheetah, *Acinonyx jubatus* », *Genome Biol.*, vol. 16, n° 1, p. 277, déc. 2015, doi: 10.1186/s13059-015-0837-4.
- [101] H. Sarkar, S. Arya, U. Rai, et S. S. Majumdar, « A Study of Differential Expression of Testicular Genes in Various Reproductive Phases of *Hemidactylus flaviviridis* (Wall Lizard) to Derive Their Association with Onset of Spermatogenesis and Its Relevance to Mammals », *PLoS One*, vol. 11, n° 3, p. e0151150, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151150.

- [102] B. Nixon *et al.*, « Modification of Crocodile Spermatozoa Refutes the Tenet That Post-testicular Sperm Maturation Is Restricted To Mammals », *Mol. Cell. Proteomics MCP*, vol. 18, n° Suppl 1, p. S58-S76, mars 2019, doi: 10.1074/mcp.RA118.000904.
- [103] C. W. Dessauer, « Adenylyl cyclase--A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling », *Mol. Pharmacol.*, vol. 76, n° 5, p. 935-941, nov. 2009, doi: 10.1124/mol.109.059345.
- [104] M. Delehedde, « ProAKAP4 polypeptide as a biomarker of sperm functionality and male fertility disorders », 2019.
- [105] J. Auger *et al.*, « Modified expression of several sperm proteins after chronic exposure to the antiandrogenic compound vinclozolin », *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.*, vol. 117, n° 2, p. 475-484, oct. 2010, doi: 10.1093/toxsci/kfq199.
- [106] A. Barbonetti, C. Castellini, N. Di Giammarco, G. Santilli, S. Francavilla, et F. Francavilla, « In vitro exposure of human spermatozoa to bisphenol A induces pro-oxidative/apoptotic mitochondrial dysfunction », *Reprod. Toxicol. Elmsford N*, vol. 66, p. 61-67, déc. 2016, doi: 10.1016/j.reprotox.2016.09.014.
- [107] T. R. Dias, A. Agarwal, P. N. Pushparaj, G. Ahmad, et R. Sharma, « Reduced semen quality in patients with testicular cancer seminoma is associated with alterations in the expression of sperm proteins », *Asian J. Androl.*, vol. 22, n° 1, p. 88-93, avr. 2019, doi: 10.4103/aja.aja_17_19.
- [108] A. Agarwal, E. Tvrda, R. Sharma, S. Gupta, G. Ahmad, et E. S. Sabanegh, « Spermatozoa protein profiles in cryobanked semen samples from testicular cancer patients before treatment », *Fertil. Steril.*, vol. 104, n° 3, p. e260, sept. 2015, doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.07.817.
- [109] A. Agarwal *et al.*, « Differential proteomic profiling of spermatozoal proteins of infertile men with unilateral or bilateral varicocele », *Urology*, vol. 85, n° 3, p. 580-588, mars 2015, doi: 10.1016/j.urology.2014.11.030.
- [110] A. Pilatz *et al.*, « Acute epididymitis induces alterations in sperm protein composition », *Fertil. Steril.*, vol. 101, n° 6, p. 1609-1617.e1-5, juin 2014, doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.011.
- [111] A. Noblanc, A. Kocer, et J. R. Drevet, « Protection post-testiculaire des gamètes mâles contre les dommages radicalaires: Le rôle de l'épididyme », *médecine/sciences*, vol. 28, n° 5, p. 519-525, mai 2012, doi: 10.1051/medsci/2012285017.
- [112] T. W. Ijiri *et al.*, « Thiol changes during epididymal maturation: a link to flagellar angulation in mouse spermatozoa? », *Andrology*, vol. 2, n° 1, p. 65-75, janv. 2014, doi: 10.1111/andr.147.

- [113] G. M. Dias *et al.*, « Thiol-disulfide proteins of stallion epididymal spermatozoa », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 145, n° 1-2, p. 29-39, févr. 2014, doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.12.007.
- [114] L. Rahamim Ben-Navi, T. Almog, Z. Yao, R. Seger, et Z. Naor, « A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa », *Sci. Rep.*, vol. 6, n° 1, Art. n° 1, nov. 2016, doi: 10.1038/srep37922.
- [115] P. E. Visconti *et al.*, « Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation », *Dev. Biol.*, vol. 192, n° 2, p. 351-363, déc. 1997, doi: 10.1006/dbio.1997.8768.
- [116] S. Ficarro *et al.*, « Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 13, p. 11579-11589, mars 2003, doi: 10.1074/jbc.M202325200.
- [117] R. A. Griffin *et al.*, « Mass spectrometry reveals distinct proteomic profiles in high- and low-quality stallion spermatozoa », *Reprod. Camb. Engl.*, vol. 160, n° 5, p. 695-707, nov. 2020, doi: 10.1530/REP-20-0284.
- [118] Y.-F. Li *et al.*, « CABYR isoforms expressed in late steps of spermiogenesis bind with AKAPs and ropporin in mouse sperm fibrous sheath », *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE*, vol. 8, p. 101, août 2010, doi: 10.1186/1477-7827-8-101.
- [119] K. Miki, W. D. Willis, P. R. Brown, E. H. Goulding, K. D. Fulcher, et E. M. Eddy, « Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility », *Dev. Biol.*, vol. 248, n° 2, p. 331-342, août 2002, doi: 10.1006/dbio.2002.0728.
- [120] X. Fang *et al.*, « Proteomics and single-cell RNA analysis of Akap4-knockout mice model confirm indispensable role of Akap4 in spermatogenesis », *Dev. Biol.*, vol. 454, n° 2, p. 118-127, oct. 2019, doi: 10.1016/j.ydbio.2019.06.017.
- [121] I. Bastan et E. Akcay, « Quality assessment of frozen bull semen with the precursor A-kinase anchor protein 4 biomarker », *Andrologia*, vol. 53, n° 9, p. e14164, oct. 2021, doi: 10.1111/and.14164.
- [122] R. M. Turner *et al.*, « Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath », *J. Androl.*, vol. 22, n° 2, p. 302-315, 2001.
- [123] B. Baccetti, G. Collodel, M. Estenoz, D. Manca, E. Moretti, et P. Piomboni, « Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia », *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 20, n° 10, p. 2790-2794, oct. 2005, doi: 10.1093/humrep/dei126.

- [124] B. Baccetti, G. Collodel, L. Gambera, E. Moretti, F. Serafini, et P. Piomboni, « Fluorescence in situ hybridization and molecular studies in infertile men with dysplasia of the fibrous sheath », *Fertil. Steril.*, vol. 84, n° 1, p. 123-129, juill. 2005, doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.01.128.
- [125] E. Moretti, G. Scapigliati, N. A. Pascarelli, B. Baccetti, et G. Collodel, « Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility », *Asian J. Androl.*, vol. 9, n° 5, p. 641-649, sept. 2007, doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00267.x.
- [126] E. Moretti, N. Pascarelli, G. Belmonte, T. Renieri, et G. Collodel, « Sperm with fibrous sheath dysplasia and anomalies in head-neck junction: Focus on centriole and centrin 1 », *Andrologia*, vol. 49, août 2016, doi: 10.1111/and.12701.
- [127] R. Pereira, J. Oliveira, L. Ferraz, A. Barros, R. Santos, et M. Sousa, « Mutation analysis in patients with total sperm immotility », *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 32, n° 6, p. 893, juin 2015, doi: 10.1007/s10815-015-0474-6.
- [128] R. M. Turner, J. A. Foster, G. L. Gerton, S. B. Moss, et P. Patrizio, « Molecular evaluation of two major human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82, in stump tail sperm », *Fertil. Steril.*, vol. 76, n° 2, p. 267-274, août 2001, doi: 10.1016/s0015-0282(01)01922-7.
- [129] M. Dordas-Perpinyà *et al.*, « ProAKAP4 Semen Concentrations as a Valuable Marker Protein of Post-Thawed Semen Quality and Bull Fertility: A Retrospective Study », *Vet. Sci.*, vol. 9, n° 5, p. 224, mai 2022, doi: 10.3390/vetsci9050224.
- [130] M. Hashemitabar, S. Sabbagh, M. Orazizadeh, A. Ghadiri, et M. Bahmanzadeh, « A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between normozoospermia and asthenozoospermia », *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 32, n° 6, p. 853-863, juin 2015, doi: 10.1007/s10815-015-0465-7.
- [131] L. Gu, X. Liu, J. Yang, et J. Bai, « A new hemizygous missense mutation, c.454T>C (p.S152P), in AKAP4 gene is associated with asthenozoospermia », *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 88, n° 9, p. 587-597, sept. 2021, doi: 10.1002/mrd.23529.
- [132] L. Visser *et al.*, « A comprehensive gene mutation screen in men with asthenozoospermia », *Fertil. Steril.*, vol. 95, n° 3, p. 1020-1024.e1-9, mars 2011, doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.067.
- [133] R. J. Aitken, Z. Gibb, M. A. Baker, J. Drevet, et P. Gharagozloo, « Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa », *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 28, n° 2, p. 1-10, janv. 2016, doi: 10.1071/RD15325.
- [134] B. Nixon *et al.*, « A Kinase Anchor Protein 4 Is Vulnerable to Oxidative Adduction in Male Germ Cells », *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 7, déc. 2019, doi: 10.3389/fcell.2019.00319.

- [135] R. Sharma *et al.*, « Proteomic analysis of human spermatozoa proteins with oxidative stress », *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE*, vol. 11, p. 48, mai 2013, doi: 10.1186/1477-7827-11-48.
- [136] M. A. Baker *et al.*, « Defining the mechanisms by which the reactive oxygen species by-product, 4-hydroxynonenal, affects human sperm cell function », *Biol. Reprod.*, vol. 92, n° 4, p. 108, avr. 2015, doi: 10.1095/biolreprod.114.126680.
- [137] K. Nowicka-Bauer et B. Nixon, « Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility », *Antioxid. Basel Switz.*, vol. 9, n° 2, p. 134, févr. 2020, doi: 10.3390/antiox9020134.
- [138] M. Delehedde *et al.*, « ProAKAP4 concentrations as an indicator of good spermatogenesis and sperm quality under oxidative stress conditions. », *Andrology*, vol. 7, p. 85, mars 2019.
- [139] R. Singh *et al.*, « Database on spermatozoa transcriptogram of catagorised Frieswal crossbred (Holstein Friesian X Sahiwal) bulls », *Theriogenology*, vol. 129, p. 130-145, avr. 2019, doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.025.
- [140] A. Kowalczyk, E. Gałęska, et A. Bubel, « The Concentration of ProAKAP4 and Other Indicators of Cryopotential of Spermatozoa Cryopreserved in Extender with Holothuroidea Extract Addition », *Anim. Open Access J. MDPI*, vol. 12, n° 4, p. 521, févr. 2022, doi: 10.3390/ani12040521.
- [141] D. Couazer *et al.*, « ProAKAP4 as a valuable marker to assess sperm quality in dogs », *Reprod. Domest. Anim.*, vol. 54, p. 91-92, sept. 2019.
- [142] S. Michaud *et al.*, *Expression of proAKAP4 in dog semen as promising marker of sperm quality*. 2019.
- [143] M. Delehedde *et al.*, « Concentration of proAKAP4 as a pertinent read-out of sperm quality in mammals », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 194, p. e24, juill. 2018, doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.053.
- [144] Q. Dewulf, L. Briand-Amirat, S. Eddarkaoui, F. Chambonnet, M. Delehedde, et N. Sergeant, « The Effects of Freeze-Thaw Cycles and of Storage Time on the Stability of Proakap4 Polypeptide in Raw Sperm Samples: Implications for Semen Analysis Assessment in Breeding Activities », *Vet. Sci.*.
- [145] D. Martín-Hidalgo, B. Macías-García, L. J. García-Marín, M. J. Bragado, et L. González-Fernández, « Boar spermatozoa proteomic profile varies in sperm collected during the summer and winter », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 219, p. 106513, août 2020, doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106513.
- [146] C. Lv *et al.*, « The proteomic characterization of ram sperm during cryopreservation analyzed by the two-dimensional electrophoresis coupled with mass spectrometry », *Cryobiology*, vol. 97, p. 37-45, déc. 2020, doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.10.011.

- [147] D. Blommaert *et al.*, « Expression, localization, and concentration of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine semen: Promising marker correlated to the total and progressive motility in thawed spermatozoa », *Theriogenology*, vol. 131, p. 52-60, juin 2019, doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.03.011.
- [148] D. Blommaert *et al.*, « First results about ProAKAP4 concentration in stallion semen after cryopreservation in two different freezing media », *Cryobiology*, vol. 102, p. 133-135, oct. 2021, doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.07.009.
- [149] M. Dordas-Perpinya *et al.*, « ProAKAP4 concentrations in stallion and donkey: Comparison with kinetic parameters, motility and concentration », oct. 2021.
- [150] M. Dordas-Perpinyà *et al.*, « ProAKAP4 as a motility long-lasting marker in Catalan donkey spermatozoa », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 262, p. 107427, mars 2024, doi: 10.1016/j.anireprosci.2024.107427.
- [151] W. Xu *et al.*, « Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility », *J. Proteomics*, vol. 75, n° 17, p. 5426-5436, sept. 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.06.021.
- [152] C. Frapsauce *et al.*, « Proteomic identification of target proteins in normal but nonfertilizing sperm », *Fertil. Steril.*, vol. 102, n° 2, p. 372-380, août 2014, doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.039.
- [153] L. Anel-Lopez *et al.*, « Comparing the Effect of Different Antibiotics in Frozen-Thawed Ram Sperm: Is It Possible to Avoid Their Addition? », *Front. Vet. Sci.*, vol. 8, p. 656937, mai 2021, doi: 10.3389/fvets.2021.656937.
- [155] R. Bhilawadikar *et al.*, « Levels of Tektin 2 and CatSper 2 in normozoospermic and oligoasthenozoospermic men and its association with motility, fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate », *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 30, n° 4, p. 513-523, avr. 2013, doi: 10.1007/s10815-013-9972-6.
- [156] S. Vijayaraghavan, S. A. Goueli, M. P. Davey, et D. W. Carr, « Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 8, p. 4747-4752, févr. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.8.4747.
- [157] S. Janati Idrissi *et al.*, « Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process », *Sci. Rep.*, vol. 11, p. 11618, juin 2021, doi: 10.1038/s41598-021-90870-8.
- [159] A. Reis *et al.*, « 40 Toward a standardised annotation of morphokinetic parameters for an automatic early prediction of the in vitro development potential of bovine embryos », *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 31, p. 146, janv. 2019, doi: 10.1071/RDv31n1Ab40.
- [160] S. Carracedo *et al.*, « ProAKAP4 protein marker: Towards a functional approach to male fertility », *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 247, p. 107074, déc. 2022, doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.107074.

[162] A. D. Ealy, L. K. Wooldridge, et S. R. McCoski, « BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle », *J. Anim. Sci.*, vol. 97, n° 6, p. 2555-2568, mai 2019, doi: 10.1093/jas/skz116.

[163] L. Breiman, « Bagging predictors », *Mach. Learn.*, vol. 24, n° 2, p. 123-140, aout 1996, doi : 10.1007/BF00058655.

THESES DE DOCTORAT :

[43] N. Le Brusq, « Élaboration d'un guide de lecture standardisé de paramètres morphocinétiques précoces pour la sélection d'embryons bovins produits in vitro en vue du transfert », 2018.

[54] J. Sigala, « Qualité du protéome du spermatozoïde humain et infertilité ».

[68] C. Cabannes, « Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine ».

[161] L. Post, « Validation de méthode du CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) Hamilton Thorne CEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de spermologie ».

AUTRES (SITES INTERNETS, COURS) :

[1] « FicheCne_Emplois.pdf », consulté le : 16 septembre 2024. Disponible sur : https://cne-elevagesruminants.fr/wp-content/uploads/ServicesElevageRuminants/FicheCne_Emplois.pdf

[2] C. Hanzen, « La production d'embryons in vitro », cours, consulté le : 3 octobre 2024. Disponible sur : https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/70627/1/R31_Embryons_invitro_2016.pdf

[3] J. H. Viana, « 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals », *N. Am.*, 2022.

Annexe 1 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez le taureau

| Auteurs et année | Objectif(s) de l'étude | Matériels et méthode | Conclusions principales |
|---|--|---|--|
| <p>Peddinti et al. 2008 [7]</p> | <p>Comparaison des protéomes de spermatozoïdes issus de taureaux ayant une haute fertilité et de taureaux ayant une faible fertilité</p> | <p>6 taureaux : Fertilité basée sur test de descendance 3 taureaux « haute fertilité » 3 taureaux « faible fertilité »</p> <p>Identification des protéines par spectrométrie de masse puis quantification</p> | <p>Expression plus élevée de 125 protéines dans la semence à haute fertilité dont AKAP4</p> |
| <p>Delehedde et al. 2019 [90]</p> | <p>Évaluation de la corrélation de la concentration en proAKAP4, les paramètres spermatiques et la fertilité après décongélation</p> | <p>13 taureaux : Index de fertilité variables 104 paillettes (0,2 ml) à 80M spz/ml</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques : Concentration, motilité</p> <p>Quantification et caractérisation de proAKAP4 (Bull 4 MID, Western blot, cytométrie en flux, microscopie électronique)</p> | <p>Variations marquées de proAKAP4 entre les éjaculats Variations en proAKAP4 comprise entre 8,62 ng/10M spz et 95,5 ng/10M spz Corrélation positive avec motilité progressive Concentration en proAKAP4 reflète la proportion de spermatozoïdes fonctionnels. Absence de proAKAP4 dans les débris cellulaires</p> |
| <p>Singh et al. 2019 [139]</p> | <p>Étude de l'abondance des transcrits de spermatozoïdes dans le sperme de taureaux de race croisée</p> | <p>6 taureaux de race croisée</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques : volume, concentration, nombre de spermatozoïdes, la motilité, taux de conception</p> <p>3 taureaux : bonne qualité spermatique 3 taureaux : mauvaise qualité spermatique</p> <p>Isolation et quantification de l'ARN</p> | <p>5 transcrits avec un niveau d'expression plus élevé chez les taureaux possédant une bonne qualité spermatique dont AKAP4</p> |
| <p>Bastan et al. 2021 [121]</p> | <p>Évaluation de corrélation entre la concentration en proAKAP4 et la qualité spermatique</p> | <p>6 taureaux 60 paillettes issues d'éjaculats différents</p> <p>A 0h et 3h après décongélation :</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques : morphologie, motilité</p> <p>Quantification de la proAKAP4 (Bull 4MID) et élaboration de 3 groupes selon concentration en proAKAP4 des échantillons :</p> <p>Concentration faible : <25 ng/10M spz Concentration modérée : 25 à 39 ng/10M spz Concentration forte : >40 ng/10M spz</p> | <p>Corrélation positive entre proAKAP4 et la motilité totale, progressive, VSL, VCL à 3h post décongélation</p> <p>Corrélation négative entre proAKAP4 et le pourcentage de queue anormale</p> |
| <p>Dordas-Perpinya et al. 2022 [129]</p> | <p>Évaluation des valeurs de proAKAP4 avec les descripteurs classiques de la motilité et les résultats de fertilité dans des conditions post décongélation</p> | <p>10 taureaux / 4 collectes chacun</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques : concentration, motilité totale et progressive, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF</p> <p>Quantification et caractérisation de proAKAP4 (Bull 4 MID, Western blot)</p> <p>Taux de non-retour en chaleur à 90j (calculé à partir de 100 IA réalisées)</p> | <p>Corrélation positive entre proAKAP4 et la motilité progressive, LIN, STR</p> <p>Absence de corrélation significative entre proAKAP4 et VCL, VAP, VSL</p> <p>Corrélation positive entre proAKAP4 et le taux de non-retour en chaleur à 90j</p> |

| | | | |
|--|--|--|---|
| <p>Kowalczyk et al.</p> <p>2022</p> <p>[140]</p> | <p>Évaluer la concentration en proAKP4 des spermatozoïdes congelés dans un dilueur additionné d'Holothuroïda</p> | <p>9 taureaux</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques : motilité, intégrité acrosomique</p> <p>Quantification de proAKAP4 (Bull 4MID)</p> | <p>Corrélation positive entre proAKAP4 et motilité progressive, VSL, vitalité, intégrité acrosomique</p> <p>L'ajout d'extrait d'Holothuroïda améliore la survie des spermatozoïdes, préserve la structure de l'acrosome, augmente les paramètres de motilité.</p> <p>Une supplémentation en Holothuroïda est associée à une concentration en proAKAP4 plus élevée</p> |
|--|--|--|---|

Annexe 2 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez le chien

| Auteurs et année | Objectif(s) de l'étude | Matériels et méthode | Conclusions principales |
|--|---|--|--|
| <p>Le Couazer et al.</p> <p>2019</p> <p>[141]</p> | <p>Évaluation de la pertinence de la concentration en proAKAP4 comme paramètre de la qualité du sperme frais de chien</p> | <p>12 chiens adultes 17 éjaculats complets (fractions spermatique, urétrale et prostatique)</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques : concentration, motilité totale, progressive, VAP, VSL, VCL</p> <p>Quantification et caractérisation de proAKAP4 (Dog 4 MID, Western blot, cytométrie en flux, microscopie électronique, immunofluorescence)</p> | <p>Moyenne en proAKAP4 : 26,41 ng/ml</p> <p>Variations en proAKAP4 comprises entre 12,46 ng/ml et 61,44 ng/ml</p> <p>Corrélation positive entre proAKAP4 et la motilité totale et progressive, VAP, VSL, VCL</p> <p>Absence de corrélation significative entre proAKAP4 et la concentration en spermatozoïde</p> |
| <p>Le Couazer et al.</p> <p>2019</p> <p>[142]</p> | <p>Évaluation de l'expression et de la localisation de proAKAP4 et AKAP4</p> | <p>10 chiens</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques</p> <p>Quantification et caractérisation de proAKAP4 et AKAP4 (Dog 4MID, Western blot, cytométrie en flux, microscopie électronique, immunofluorescence)</p> | <p>Variations en proAKAP4 comprises entre 2,37 ng/10M spz et 132 ng/10M spz</p> <p>Différentes populations de spermatozoïdes avec des niveaux d'expression de proAKAP4 différents</p> <p>Présence de spermatozoïdes n'exprimant pas proAKAP4</p> |

Annexe 3 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez le porc

| Auteurs et année | Objectif(s) de l'étude | Matériels et méthode | Conclusions principales |
|---|---|--|--|
| <p>Sergeant et al.</p> <p>Résultats mentionnés [61] mais non publiés</p> | <p>Évaluation de la corrélation entre proAKAP4, la fertilité et la prolificité</p> | <p>13 verrats</p> <p>Paramètres spermatiques similaires</p> <p>Quantification de la proAKAP4 (Pig 4MID) et élaboration de 2 groupes selon une concentration seuil (45ng/10M)</p> <p>Insémination de 210 truies</p> <p>1 groupe inséminé avec la semence à faible concentration de proAKAP4</p> <p>1 groupe inséminé avec la semence ayant une forte concentration en proAKAP4</p> <p>Mesure des indices de fécondité et de prolificité</p> | <p>Grande variation de la proAKAP4 entre les verrats</p> <p>Le groupe de truies inséminées avec la semence ayant une concentration plus élevée en proAKAP4 présente une augmentation de l'indice de fécondité et une augmentation de l'indice de prolificité (+2,05)</p> |
| <p>Delehedde et al.</p> <p>2018</p> <p>[143]</p> | <p>Évaluation de la pertinence de la quantification de proAKAP4 comme paramètre de la qualité du sperme</p> | <p>20 verrats</p> | <p>Variation en proAKAP4 comprise entre 3,7ng/10M spz et 24,25 ng/10M spz</p> <p>Corrélation positive entre proAKAP4 et la motilité totale et progressive</p> |
| <p>Dewulf et al.</p> <p>2019</p> <p>[144]</p> | <p>Étude de la stabilité de proAKAP4 au cours de la procédure de congélation/décongélation et du processus de conservation longue durée à -20°C</p> | <p>Pour chaque éjaculat :</p> <p>2 paillettes pour l'expérience gel/dégel</p> <p>3 pour l'expérience de stockage long</p> <p>Mesure à T0</p> <p>Expérience gel/dégel</p> <p>Succession de cycles gel/dégel 10 fois</p> <p>Expérience stockage longue durée : Stockage à -20°C pendant 1, 3 et 6 mois</p> <p>Quantification et caractérisation de proAKAP4 et AKAP4 (Pig 4MID, Western blot)</p> | <p>Absence de différence significative dans les concentrations en proAKAP4 au cours des cycles gel/dégel</p> <p>Absence de différence significative dans les concentrations en proAKAP4 lors du processus de conservation longue durée</p> |
| <p>Martin-Hidalgo et al.</p> <p>2020</p> <p>[145]</p> | <p>Élucider les variations possibles des profils protéomiques des spermatozoïdes collectés au cours de l'été et de l'hiver (qualité spermatique des verrats moindre en été)</p> | <p>Collecte en février/mars</p> <p>Collecte en juin/juillet</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques : motilité, viabilité, potentiel de membrane mitochondriale, intégrité acrosomique, organisation des lipides de la membrane plasmique</p> <p>Identification des protéines par spectrométrie de masse puis quantification</p> | <p>Viabilité et potentiel de membrane mitochondriale moindres l'été</p> <p>85 protéines moins abondantes dans les spermatozoïdes collectés en été</p> <p>AKAP4 moins abondante dans les spermatozoïdes collectés en été</p> |

Annexe 4 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez le bélier

| Auteurs et année | Objectif(s) de l'étude | Matériels et méthode | Conclusions principales |
|--|--|--|---|
| <p>Riesco et al. 2020 [93]</p> | <p>Analyse intégrative de la qualité du sperme de bélier dans les échantillons frais, réfrigérés et congelés</p> | <p>8 béliers adultes 2 collectes/semaine/bélier pendant la saison de reproduction</p> <p>3 groupes d'échantillons : Frais, réfrigérés, congelés</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques : volume, concentration, viabilité, motilité massale, totale, progressive, VCL, Potentiel d'oxydo-réduction, lésions de l'ADN</p> <p>Quantification caractérisation de la proAKAP4 (Ram 4MID, cytométrie en flux)</p> | <p>Diminution de la motilité totale et progressive ainsi que de la vitalité dans les échantillons congelés.</p> <p>Diminution de l'expression de proAKAP4 dans les échantillons congelés.</p> <p>Diminution des concentrations en proAKAP4 dans les échantillons refroidis par rapport aux échantillons frais.</p> <p>Diminution des concentrations en proAKAP4 dans les échantillons congelés par rapport aux échantillons réfrigérés.</p> <p>Corrélation positive entre proAKAP4 et les motilités totale et progressive</p> <p>Corrélation positive entre proAKAP4 et la viabilité</p> <p>Corrélation négative entre proAKAP4 et l'apoptose et les lésions de l'ADN</p> |
| <p>Lv et al. 2020 [146]</p> | <p>Analyser les effets de la congélation sur le profil protéique du sperme de bélier</p> | <p>5 béliers</p> <p>Identification des protéines par spectrométrie de masse puis quantification</p> | <p>39 protéines différemment exprimées</p> <p>28 protéines sous exprimées dans le sperme congelé dont AKAP4.</p> |

Annexe 5 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez l'étalon et l'âne

| Auteurs et année | Objectif(s) de l'étude | Matériels et méthode | Conclusions principales |
|--|---|---|--|
| Blommaert et al. 2018 [147] | Évaluation de la corrélation entre la motilité totale et progressive et la concentration en proAKAP4 dans le sperme décongelé | 13 étalons 17 éjaculats Analyse des paramètres spermatiques : motilité Quantification et caractérisation de la proAKAP4 (Horse 4MID, Western blot, cytométrie en flux, microscopie électronique, immunofluorescence) | Moyenne en proAKAP4 : 7,372 ng/ml Variations en proAKAP4 comprises entre 3,45ng/ml et 13,22 ng/ml Corrélation positive entre proAKAP4 et les motilités totale et progressive après décongélation |
| Delehedde et al. 2018 [143] | Évaluation de la pertinence de la quantification de proAKAP4 comme paramètre de la qualité du sperme | 15 étalons Analyse des paramètres spermatiques : motilité | Variations en proAKAP4 comprises entre 2,6 ng/10M spz et 20,2 ng/10M spz Corrélation positive entre proAKAP4 et les motilités totale et progressive |
| Griffin et al. 2020 [117] | Comparaison du profil protéomique de spermatozoïdes de haute et de faible qualité Identification de biomarqueurs de la qualité de l'éjaculat | 4 étalons Normozoospermiques 12 échantillons issus de 3 éjaculats par étalons Utilisation d'un gradient de percoll pour isoler les populations de spermatozoïdes de haute (ceux du culot) et mauvaise qualité Analyse des paramètres spermatiques : motilité, morphologie Analyse protéomique (spectrométrie de masse) | Les spermatozoïdes de haute qualité présentent des motilités totale et progressive plus élevées ainsi qu'une proportion plus élevée de cellule morphologiquement normale. 22 protéines significativement plus abondante dans la population de spermatozoïdes de haute qualité dont AKAP4 et HK1 Corrélation positive entre proAKAP4 et les motilités totale et progressive, VAP, VSL |
| Blommaert et al. 2021 [148] | Comparaison de la concentration en proAKAP4 dans le sperme congelé avec deux diluants différents | 5 étalons Deux diluants utilisés : INRA FREEZE Milieu SPERLIN Chaque éjaculat divisé entre les deux diluants Mesures à 0h et 3h après décongélation Analyse des paramètres spermatiques : concentration, motilité Quantification de proAKAP4 (Horse 4MID) | 0h après décongélation : proAKAP4, viabilité et motilité totale plus élevées pour le diluant SPERLIN 4h après décongélation : proAKAP4, viabilité et motilités totale et progressive plus élevées pour le diluant SPERLIN |
| Dordas-Perpinya et al. 2022 [149] | Évaluation des concentrations en proAKAP4 des semences d'étalon et d'ânes Évaluation de la corrélation entre la concentration en proAKAP4 et les paramètres cinétiques | 5 éjaculats de 5 étalons 3 éjaculats de 3 ânes Analyse des paramètres spermatiques : motilité, concentration, viabilité Quantification de la proAKAP4 (Horse 4MID) | Pas de différence significative entre les concentrations en proAKAP4 des ânes et des étalons Étalons : Variations en proAKAP4 comprises entre 2,15 ng/10M et 7,35 ng/10M spz Ânes : Variations en proAKAP4 comprises entre 2,38 ng/10M et 8,46 ng/10M spz Étalons : Corrélation négative entre proAKAP4 et concentration Âne : Corrélation positive entre proAKAP4 et motilité progressive |

| | | | |
|--|---|--|---|
| <p>Dordas-Perpinya et al.</p> <p>2024</p> <p>[150]</p> | <p>Quantifier et caractériser la proAKAP4 dans le sperme d'ânes</p> | <p>12 éjaculats d'ânes</p> <p>Mesures à 0h, 1h et 3h après décongélation :</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques : motilité, potentiel de membrane mitochondriale</p> <p>Quantification de la proAKAP4 (Horse 4MID)</p> | <p>Corrélation positive entre proAKAP4 et les motilités totale et progressive après décongélation</p> <p>proAKAP4 affectée par la présence de cryoprotecteur avec une consommation importante observée au cours de la première heure suivant la décongélation</p> |
|--|---|--|---|

Annexe 6 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez les camélidés

| Auteurs et année | Objectif(s) de l'étude | Matériels et méthode | Conclusions principales |
|--|---|--|--|
| <p>Malo et al.</p> <p>2021</p> <p>[99]</p> | <p>Quantification et caractérisation de la proAKAP4 dans le sperme de camélidés</p> <p>Évaluation de la corrélation avec la qualité spermatique</p> <p>Évaluation de la dynamique saisonnière</p> | <p>6 chameaux</p> <p>Collecte des échantillons chaque semaine de novembre à avril (saison du rut)</p> <p>Analyse des paramètres spermatiques : Volume, viscosité, concentration, production totale, motilité progressive, totale, vitalité, intégrité acrosomique, anomalies morphologiques</p> <p>Quantification et caractérisation de la proAKAP4 (dromadary 4MID, Western blot, microscopie électronique)</p> | <p>Variation saisonnière de la concentration en proAKAP4</p> <p>Corrélation positive entre proAKAP4 et le volume, la viscosité et la motilité totale</p> |

Annexe 7 : Études portant sur la proAKAP4/AKAP4 comme biomarqueur de la qualité spermatique chez l'homme

| Auteurs et année | Objectif(s) de l'étude | Matériels et méthode | Conclusions principales |
|--|---|--|--|
| <p>Xu et al.</p> <p>2012</p> <p>[151]</p> | <p>Dépister et étudier les protéines différemment exprimées dans le sperme de patients infertiles mais normozoospermiques selon les critères de l'OMS</p> | <p>10 patients infertiles normozoospermiques</p> <p>Groupe témoin : 10 patients fertiles (donneur de sperme)</p> <p>Identification des protéines par spectrométrie de masse puis quantification</p> | <p>24 protéines différemment exprimées dont AKAP4.</p> <p>AKAP4 sous exprimée dans le groupe de patients infertiles</p> |
| <p>Frapsauce et al.</p> <p>2014</p> <p>[152]</p> | <p>Dépister et étudier les protéines différemment exprimées dans le sperme de patients infertiles mais normozoospermiques selon les critères de l'OMS</p> | <p>3 patients normozoospermiques avec échec de fécondation en FIV conventionnelle (suite à une liaison déficiente à la zone pellucide)</p> <p>Groupe témoin : 3 hommes présentant des taux de fécondation et de clivage normaux après FIV conventionnelle</p> <p>Identification des protéines par spectrométrie de masse puis quantification</p> | <p>17 protéines différemment exprimées dont AKAP4.</p> <p>AKAP4 sous exprimée dans le groupe de patients infertiles</p> |
| <p>Sergeant et al.</p> <p>2016</p> <p>□</p> | <p>Identification et caractérisation des protéines des spermatozoïdes dans des échantillons normozoospermiques humains</p> | <p>Échantillons normozoospermiques</p> | <p>Un niveau d'expression de proAKAP4 supérieur ou égal à la valeur de référence est associé à une bonne qualité spermatique</p> <p>Un niveau d'expression de proAKAP4 inférieur à la valeur de référence est associé à une mauvaise qualité spermatique</p> <p>Corrélation positive entre la proAKP4 et la motilité progressive</p> |

Annexe 8 : Liste et caractéristiques des échantillons envoyés pour quantification de la proAKAP4

| Taureaux | Date séance FIV | Type d'échantillon | Volume | Contenant | Concentration en spz (en M/mL) |
|-----------------|------------------------|---------------------------|---------------|------------------|---------------------------------------|
| T1 | / | P | 0,25 mL | Paillette | 80 |
| | / | P | 0,25 mL | Paillette | 80 |
| | 24/01/2023 | Sp | 2 x 20µL | Eppendorf | 80 |
| | | Cul | 2 x 7µL | Eppendorf | 4,5 |
| | 30/01/2023 | Sp | 2 x 20µL | Eppendorf | 80 |
| | | Cul | 2 x 7µL | Eppendorf | 4,5 |
| T2 | / | P | 0,25 mL | Paillette | 80 |
| | / | P | 0,25 mL | Paillette | 80 |
| | 05/12/2022 | Sp | 2 x 20µL | Eppendorf | 80 |
| | | Cul | 2 x 7µL | Eppendorf | 3 |
| | 12/12/2022 | Sp | 2 x 20µL | Eppendorf | 80 |
| | | Cul | 2 x 7µL | Eppendorf | 3 |
| T3 | / | P | 0,25 mL | Paillette | 80 |
| | / | P | 0,25 mL | Paillette | 80 |
| | 07/11/2022 | Sp | 2 x 20µL | Eppendorf | 80 |
| | | Cul | 2 x 7µL | Eppendorf | 3,3 |
| | 14/11/2022 | Sp | 2 x 20µL | Eppendorf | 80 |
| | | Cul | 2 x 7µL | Eppendorf | 3,75 |
| T4 | / | P | 0,25 mL | Paillette | 70 |
| | / | P | 0,25 mL | Paillette | 70 |
| | 05/10/2022 | Sp | 2 x 20µL | Eppendorf | 70 |
| | | Cul | 2 x 7µL | Eppendorf | 2,7 |
| | 17/10/2022 | Sp | 2 x 20µL | Eppendorf | 70 |
| | | Cul | 2 x 7µL | Eppendorf | 3 |
| T5 | / | P | 0,25 mL | Paillette | 80 |
| | / | P | 0,25 mL | Paillette | 80 |
| | 21/11/2022 | Sp | 2 x 20µL | Eppendorf | 80 |
| | | Cul | 2 x 7µL | Eppendorf | 3,75 |
| | 28/11/2022 | Sp | 2 x 20µL | Eppendorf | 80 |
| | | Cul | 2 x 7µL | Eppendorf | 3,75 |

Justine PALARD-DE MEYER

EVALUATION DE LA CORRELATION ENTRE LA CONCENTRATION EN PROAKAP4 DANS LE SPERME ET LA QUALITE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE A J7 APRES FECONDATION IN VITRO CHEZ LES BOVINS

EVALUATION OF THE CORRELATION BETWEEN PROAKAP4 CONCENTRATION IN SEMEN AND THE QUALITY OF EMBRYO DEVELOPMENT ON D7 AFTER IN VITRO FERTILIZATION IN BOVINE ANIMALS

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 07/11/2024

RESUME en français (1700 caractères)

L'A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) est une protéine de structure spécifique des spermatozoïdes, strictement localisée au niveau du flagelle. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur : la proAKAP4. Au stade mature, l'AKAP4 permet de recruter la protéine kinase A (PKA) au sein de la gaine fibreuse et favorise ainsi la phosphorylation locale des substrats ainsi que la régulation des fonctions flagellaires telles que l'initiation et l'entretien de la motilité spermatique. Pour ces raisons, la proAKAP4 est pressentie pour être un bon marqueur de fertilité chez les bovins. Cependant, la plupart des études concernent la fertilité *in vivo*. Notre travail est une étude clinique menée en simple aveugle donc l'objectif était d'étudier l'intérêt de la proAKAP4 comme biomarqueur de la fertilité mâle *in vitro* chez le taureau. Pour cela, nous avons évalué la stabilité de la proAKAP4 tout au long de la chaîne de préparation de la semence (Étude 1) puis nous avons confronté les concentrations obtenues avec les résultats du développement embryonnaire après fécondation *in vitro* (Étude 2 et 2bis). Dans les conditions de terrain dans lesquelles a été réalisée notre étude, seules les paillettes étaient capables de fournir une information suffisamment standardisée. Les échantillons intermédiaires prélevés le long de la chaîne de préparation de la semence ont présenté une variabilité trop importante. Ce résultat n'est pas en faveur de l'utilisation de ces échantillons pour le dosage de la proAKAP4. Par ailleurs, nous avons démontré une corrélation positive entre la concentration en proAKAP4 de la paillette et le taux d'embryons transférables obtenus après fécondation *in vitro* ainsi qu'une corrélation négative entre la concentration en proAKAP4 et la production d'embryons de catégorie D, catégorie la plus éloignée de la trajectoire morphocinétique « normale » décrite dans la littérature. Ces données suggèrent donc que la proAKAP4 pourrait être utilisée comme biomarqueur afin de sélectionner les taureaux ayant une meilleure fertilité *in vitro* et donc permettre d'obtenir un nombre plus important d'embryons transférables produits *in vitro* ainsi que des embryons de meilleure qualité, d'avantage susceptibles de poursuivre leur développement.

MOTS CLES : BOVIN, TAUREAU, proAKAP4, SPERME, DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE, FECONDATION IN VITRO, BIOMARQUEUR, FERTILITE

DATE DE SOUTENANCE : 07/11/2024