



**HAL**  
open science

# Biotechnologie de la reproduction chez le bovin Découverte et étude de nouvelles biomolécules d'intérêt

Jean-Pascal Hograindleur

► **To cite this version:**

Jean-Pascal Hograindleur. Biotechnologie de la reproduction chez le bovin Découverte et étude de nouvelles biomolécules d'intérêt. Biotechnologies. 2018. hal-01828903

**HAL Id: hal-01828903**

**<https://ephe.hal.science/hal-01828903>**

Submitted on 18 Dec 2018

**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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par

Jean-Pascal HOGRAINDLEUR

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE :

# Biotechnologie de la reproduction chez le bovin

*Découverte et étude de nouvelles biomolécules d'intérêt*

Soutenu le 22 Juin 2018

devant le jury suivant :

Dr. Françoise TROUSSE - MC EPHE  
Dr. Christophe ARNOULT - DR CNRS  
Dr. Véronique FRACHET - MC EPHE  
Dr. Natalie BEAUJEAN - DR INRA  
Dr. Jessica ESCOFFIER - CR INSERM  
Dr. Olivier CARION - IMV Technologies

– Président  
– Tuteur scientifique  
– Tuteur pédagogique  
– Rapporteur  
– Examineur  
– Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. Christophe ARNOULT

Directeur : Pr. Pierre HAINAUT

Laboratoire : Institut pour l'Avancée des Biosciences, Equipe GETI

Et de

Dr. Véronique FRACHET

Laboratoire CaCys, Grenoble EPHE (Science et Vie de la Terre) Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématique de l'EPHE : Génomes, Cancer et Thérapies.



# Remerciements

## ***Aux membres du jury***

*Au Docteur Françoise Trousse pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et qui me fait l'honneur de présider ce jury de ma soutenance.*

*Je remercie le Docteur Natalie Beaujean pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce travail.*

*Je remercie le Docteur Jessica Escoffier et le Docteur Olivier Carion pour avoir accepté d'être membres du jury en examinant ce travail.*

*Je tiens à remercier le Docteur Véronique Frachet pour son aide et sa patience dans mon encadrement au cours de ces trois années. Je tiens aussi à remercier l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.*

*Un grand merci au Docteur Christophe Arnoult pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je suis pleinement reconnaissant pour la confiance et la patience que tu as su me témoigner durant mes années de diplôme mais aussi de BTS. Tes conseils et ton expérience m'ont permis d'aller au bout de mes travaux.*

## ***A mes collègues et collaborateurs***

*Je tiens à remercier l'équipe du laboratoire dans laquelle j'ai évolué toute ces dernières années : Guillaume, Sylvianne, Pierre, Serge, Roland, Sandra, Marie, Emilie, Magalie, Zine, Emeline, Flore, Charles, Véronique, Sevan, Flora.*

*Je remercie aussi toute l'équipe du CECOS de Grenoble avec qui j'ai gardé de très bon souvenirs depuis mes débuts (BTS) : Julien, Sophie, Onofira, Mylène, Solange, Claire, Nathalie, Govinda, Claudine, Lynda, Martine, Nicole, Emilie, Bernadette, Pierre et Jean-Baptiste.*

*Tous mes remerciements aux personnes de l'IAB avec qui j'ai pu travailler et passer d'agréables moments tout particulièrement à : Mathieu, Emeline, Tristan, Dalenda, Corinne et Natasha.*

*Merci aux membres de la station de primatologie du Rousset pour leur accueil à la station tout particulièrement à Messieurs les Docteurs Romain Lacoste et Pao Molina, ce fût une expérience très enrichissante.*

*Je tiens à remercier tout le personnel de la société IMV technologies sans qui je n'aurai pas pu effectuer ces travaux de recherches.*

***A ma famille et mes amis***

*Un grand merci à ma famille, pour le soutien apporté durant toutes ces années : Aimée, René, Denise, Gilbert, Pierre, Chantal, Marc-André, René-Gilles, Claire et Etienne. Je vous dois beaucoup.*

*Je tiens enfin à remercier tout mes amis sans qui toutes mes années d'études n'auraient pas été si agréables : Yoann, Baptisté, Pierre, Pauline, Fabrice, Sonia, Jérémy, Pauline, Simon, Valentin, Johanna, Martin, Marine, Ludz, Simon, Thomas, Elisa, Arthur, Laura, Elodie, Bertrand, Laurine, Philou, Rémy, Maël...*

## Sommaire

I.	Le spermatozoïde .....	- 1 -
1.	Morphologie .....	- 1 -
1.1	Tête.....	- 2 -
1.2	Le flagelle.....	- 2 -
2.	La physiologie spermatique .....	- 6 -
2.1.	Mobilité.....	- 7 -
2.2	Capacitation.....	- 9 -
2.3	Réaction acrosomique.....	- 11 -
II.	L'ovocyte et son follicule .....	- 14 -
1.	Ovogenèse et Folliculogenèse.....	<b>-14-</b>
2.	Interaction entre ovocytes et cellules folliculaire.....	- 16 -
3.	Ovogenèse : Croissance ovocytaire .....	- 18 -
III.	La fécondation .....	- 25 -
IV.	Les biotechnologies de la reproduction chez le bovin .....	- 28 -
1.	Le modèle bovin .....	- 28 -
1.1	Physiologie de la reproduction.....	- 28 -
1.2.	Etat des lieux du cheptel bovin français .....	- 29 -
2.	L'insémination artificielle.....	- 31 -
2.1.	Présentation .....	- 31 -
2.2.	Les bénéfices de l'IA .....	- 31 -
2.3.	Les désavantages de l'IA .....	- 32 -
3.	Congélation de la semence.....	- 35 -
3.1.	Les dégâts associés à la cryoconservation.....	- 35 -
3.2.	Les cryoprotectants.....	- 37 -
V.	Les autres biotechnologies de la reproduction en élevage bovin .....	- 39 -
1.	Encapsulation.....	- 39 -

2.	Microfluidique .....	- 40 -
3.	Sexage .....	- 40 -
4.	Recherche de marqueurs .....	- 41 -
5.	Biocapteurs .....	- 43 -
6.	Modifications génétiques .....	- 43 -
VI.	Objectifs scientifiques de l'étude et contexte de recherche.....	- 46 -
VII.	Matériel et Méthode .....	- 50 -
1.	Analyse CASA.....	- 50 -
2.	Récupération des spermatozoïdes.....	- 52 -
3.	Origine du venin .....	- 53 -
4.	Vitalité des spermatozoïdes.....	- 53 -
5.	Fécondation <i>in vitro</i> chez le modèle bovin .....	- 54 -
5.1	Solutions stocks .....	- 54 -
5.2	Manipulation.....	- 60 -
5.3	Discussion .....	- 64 -
VIII.	Résultats .....	- 67 -
IX.	Discussion.....	- 80 -
X.	Conclusion .....	- 82 -
XI.	Perspectives .....	- 83 -
XII.	Références bibliographiques .....	- 85 -
XIII.	Annexes .....	- 104 -

## SOMMAIRE DES FIGURES :

Figure 1: Représentation schématique de la morphologie du spermatozoïde.....	1
Figure 2 : Représentation schématique de coupes transversales.....	3
Figure 3: Représentation schématique d'un axonème .....	4
Figure 4: Représentation schématique des gaines mitochondriales et fibreuses.....	6
Figure 5: Représentation schématique simplifiée des voies de signalisation de la mobilité spermatique. ....	8
Figure 5 : Représentation des trois principaux états de mobilité du spermatozoïde.....	9
Figure 6 : Représentation schématique des principaux événements de la capacitation. ....	10
Figure 7: Microscopie électronique des différentes étapes de la réaction acrosomique. ....	12
Figure 8: Représentation schématique de la voie de signalisation proposée pour la réaction acrosomique induite par P4.....	13
Figure 9: Classification des follicules sur les coupes histologiques d'ovaires. ....	15
Figure 10: Observation par microscopie confocale de complexes ovocyte-cumulus canins après immunoloration de la tubuline. ....	17
Figure 11: Activation/ Inactivation du complexe CDK1/cyclinB1 régulé par la cascade d'activation d'AMPc. ....	21
Figure 12: Temps-séquence de la maturation méiotique.....	22
Figure 12: Schéma des mécanismes transcriptionnels de l'ovocyte.....	24
Figure 13: Nombre de spermatozoïdes présent dans les différentes parties du tractus génital après éjaculation chez l'homme.....	25
Figure 14: Izumo et Juno sont les deux principales molécules nécessaires à la fusion spermatozoïde-ovocyte.....	26
Figure 15: Schémas représentatif de l'apport de la PLC zeta par le spermatozoïde à l'ovocyte	27
Figure 16: Histogrammes de l'évolution et la production du cheptel bovin français .....	30
Figure 17: Influence de la fréquence des observations pour la détection des chaleurs.....	33
Figure 18: Meilleure fenêtre pour l'insémination artificielle en fonction des différentes phases du cycle. ....	33
Figure 19: Taux de réussite d'insémination artificielle de 2004 à 2012.....	34
Figure 20: Taux de refroidissement optimal pour la congélation d'une cellule. ....	36
Figure 21: Modèle d'automate CASA. ....	50
Figure 22: Représentation des différentes trajectoires de la tête obtenue par analyses de l'automate CASA.....	51
Figure 23: Test de Williams sur spermatozoïde humain.....	54
Figure 24: Organisation de COC's en quatre classes selon la qualité. ....	64
Figure 25: Photo d'ovocytes de souris sous loupe binoculaire ayant entamés la division cellulaire.....	65
Figure 26: Qualité des ovocytes et embryons à différents stades.....	65
Figure 27: Identification d'une fraction active .....	68
Figure 28: Effet de la fraction 8 sur les spermatozoïdes humain.....	69
Figure 29: Effet de la fraction 8 sur les spermatozoïdes bovin.....	70
Figure 30: Traitement de la fraction 8 par la protéinase K. ....	71



Figure 31: Analyse par spectromètre de masse des fraction du venin brut de <i>Maurus Palmatus</i> purifié. ....	72
Figure 32: Activité du composé 7,8 kDa sur spermatozoïdes humains. ....	73
Figure 33: Activité de la spermaurine sur les spermatozoïdes congelés de mammifères. ....	74
Figure 34: Vitalité des spermatozoïdes humains exposés à la spermaurine.....	75
Figure 35: Activité de la spermaurine sur des spermatozoïdes testiculaires chez le primate non-humain.....	77
Figure 36: La spermaurine purifié améliore la fécondation <i>in vitro</i> chez le modèle murin.....	78



## Liste des abréviations :

### A

ACP : Agent CryoProtecteur

ADN : Acide DéoxyriboNucléique

AKAP : A Kinase Anchoring Protein

ALH : Amplitude Lateral of the Head

AMPC : Adénosine MonoPhosphate cyclic

AR : Acrosomial Reaction

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

### B

BHV : Bovine HerpesVirus

BMP : Bone Morphogenic Proteins

BSA : Bovine Serum Albumin

### C

CASA : Computer Assisted Semen Analysis

CatSper : Cation channels of Sperm

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

COC : Complexe Ovocyte-Cumulus

CPEB : Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding

### D

DIV : Développement *In Vitro*

### E

EGF : Epidermal GrowthFactor

eIf : Eukaryotic Initiation Factor

EPHE : Ecole Pratique des Hautes Etudes

## **F**

FGF2 : Fibroblast Growth Factor

FIV : Fécondation *In Vitro*

FISH : Fluorescence *In Situ* Hybridization

FSH : Hormone Folliculostimulante

FSIP2 : Fibrous Sheath Interacting Protein 2

## **G**

GDF : Growth and Differentiation Factor

GETI : Génétique Epigénétique et Thérapie de l'Infertilité

GMP : Guanosine MonoPhosphate

GVBD : Germinal Vesicle BreakDown

## **I**

IA : Insémination Artificielle

IAB : Institut pour l'Avancée des Biosciences

ICSI : Injection Intracytoplasmique

IETS : International Embryo Transfer Society

IP3 : Inositol 1,4,5 tri-Phosphate

## **K**

KGF : Keratinocyte Growth Factor

## **L**

LH : Luteinizing Hormone

## **M**

m7G : 7-methylguanylate

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MIV : Maturation *In Vitro*

MPF : M-Phase Promoting Factor

MTOC : MicroTubule Organizing Center

## **N**

NBC : sodium Bicarbonate Cotransporter

NEBD : Nuclear Envelope BreakDown

## **P**

P4 : progestérone

PAP : poly(A) polymerase protein

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDE : PhosphodiEstérase

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PIP<sub>2</sub> : Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisPhosphate

PKA : Protéine Kinase A

PL : Phospholipase

PTK : Protéine Tyrosine Kinase

PTZs : Projections TransZonales

## **R**

ROS : Reactive Oxygen Species

## **V**

VAP : Velocity Average Path

VCL : CurviLinear Velocity

VSL : Straight-Line Velocity

## **Z**

ZP : Zone pellucide

# Introduction

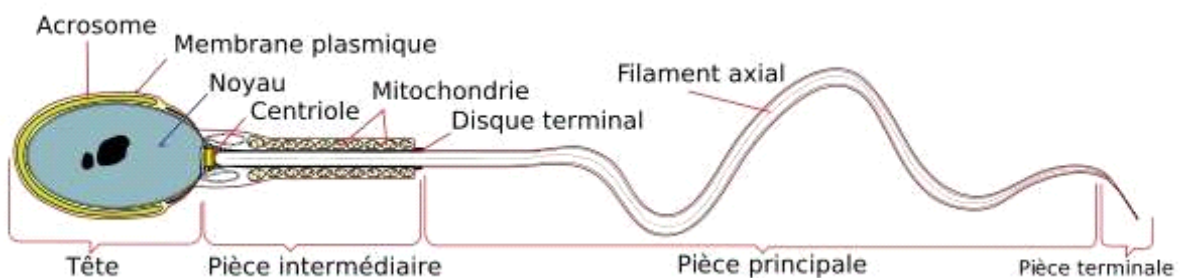
La reproduction humaine est basée sur la rencontre et la fusion du spermatozoïde, gamète mâle haploïde produit dans le testicule, et l'ovocyte, gamète femelle haploïde produit dans l'ovaire. Stockés dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes seront mélangés aux fluides séminaux puis déposés dans le vagin lors de l'éjaculation. Le spermatozoïde devra présenter une mobilité progressive pour progresser dans le tractus génital féminin et atteindre l'ovocyte. Durant son transit, le gamète mâle subira un ensemble de phénomènes physiologiques qui lui permettront d'acquieser son pouvoir fécondant.

## I. Le spermatozoïde

Le spermatozoïde est produit dans le testicule durant le processus de spermatogenèse. Chez le bovin, la spermatogenèse dure 54 jours et comporte 14 stades de différenciations cellulaires. Succinctement, la première étape est appelée spermatocytogenèse, elle-même divisée en deux phases, l'une mitotique et l'autre méiotique. Durant la phase mitotique, les spermatogonies vont se multiplier, renouvelant constamment la réserve de cellules souches via les spermatogonies de type A, et produire les cellules qui vont se différencier en spermatozoïdes, les spermatogonies de type B. Ces dernières vont subir la phase méiotique permettant d'obtenir des cellules rondes haploïdes, appelées spermatides. Durant une seconde étape appelée spermiogenèse, les spermatides vont entrer dans un profond remaniement structurel impliquant la compaction du noyau et la formation de l'acrosome, de la pièce intermédiaire et du flagelle.

### 1. Morphologie

Le destin physiologique du spermatozoïde est la délivrance du matériel génétique et d'éléments régulateur du développement précoce de l'embryon à l'intérieur du gamète femelle. Pour accomplir cela, il présente une morphologie singulière et se compose de deux segments distincts : la tête et le flagelle.



*Figure 1. Représentation schématique de la morphologie du spermatozoïde.*

## 1.1 Tête

La tête est formée par un noyau contenant le matériel génétique recouvert d'une vésicule géante d'exocytose nommée l'acrosome.

### a. Le noyau

Pendant la spermiogenèse, l'ADN spermatique est condensé via le remplacement graduel des histones par des protéines de transition spécifiques au testicule, puis par des protamines offrant un état de compaction six fois plus dense que celui de la chromatine nucléosomale des cellules somatiques (Braun et al. 2001). Cette compaction entraîne une impossibilité de transcription et de traduction au sein du noyau mais offre une protection adéquate du matériel génétique lors de son transit dans les tractus génitaux. Durant sa fabrication, le gamète mâle perd la majeure partie de son cytoplasme, lui conférant sa forme hydrodynamique d'ovoïde légèrement aplati (Malo et al. 2006).

### b. L'acrosome

L'acrosome est formé à partir de l'appareil de Golgi durant la spermiogenèse. Son phénomène d'exocytose est appelé réaction acrosomique. C'est une vésicule contenant des enzymes hydrolytiques et protéolytiques qui vont être déversée par exocytose lors de la réaction acrosomique. Ces molécules vont assister une grande variété d'actions physiologiques. La réaction acrosomique permet entre autres de faciliter la progression du spermatozoïde dans les cellules du cumulus grâce à l'action de l'hyaluronidase, (Ponce et al., 1994) permettre l'adhésion et la pénétration de la zone pellucide grâce à l'acrosine (Ferrer et al., 2012), ou encore permettre le démasquage de la protéine IZUMO qui va jouer un rôle essentiel en s'arrimant à son récepteur ovocytaire Juno et induire la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte (Bianchi, Doe, Goulding, & Wright, 2014; N.Inoue et al. 2013).

## 1.2 Le flagelle

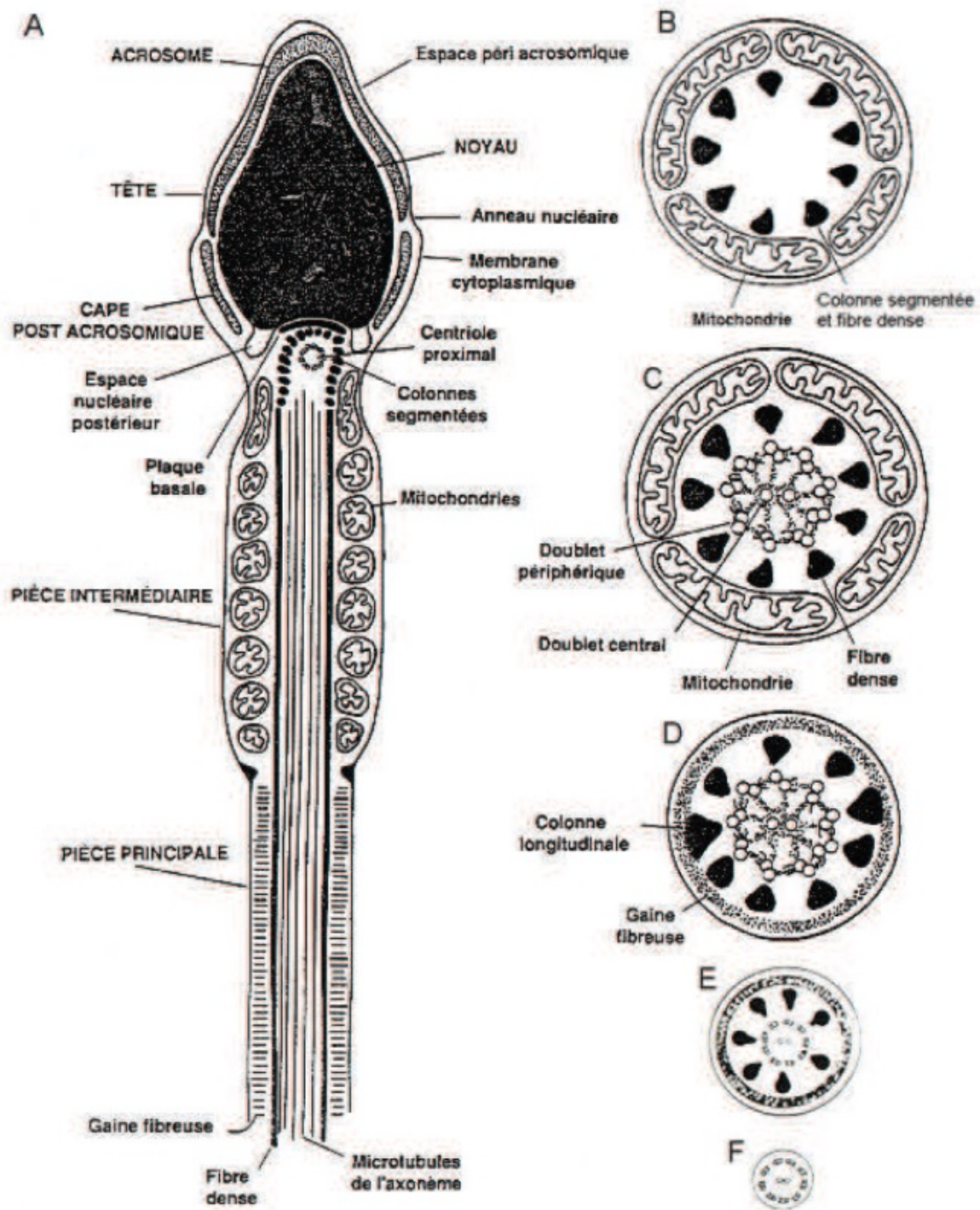
Pour progresser dans le tractus génital féminin à la rencontre de l'ovocyte et traverser les cellules du cumulus, un système de propulsion est nécessaire au spermatozoïde. Celui-ci se présente sous la forme d'un flagelle, composé de 3 segments : une pièce intermédiaire, une pièce principale et une pièce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

### a. Le col

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



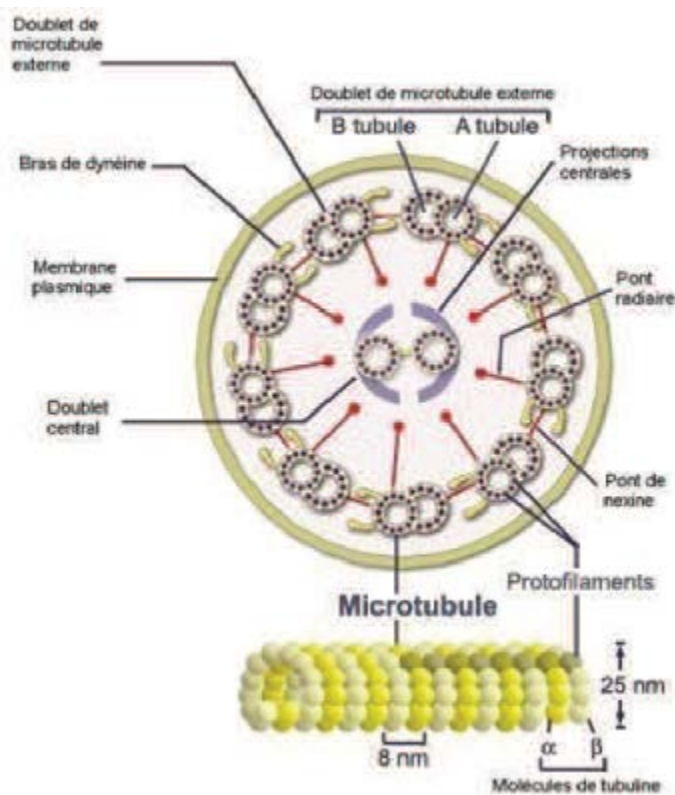
mobilité du flagelle. Les colonnes sont à l'origine des fibres denses qui entourent l'axonème.



**Figure 2.** Représentation schématique de coupes transversales de (A) spermatozoïde (pièce principale du flagelle tronquée et pièce terminale non représentée) (B) col (C) pièce intermédiaire (D) début de pièce principale (E) fin de pièce principale (F) pièce terminale (Martinez, 2016)

### b. L'axonème

L'axonème est la partie axiale et motrice d'un cil ou d'un flagelle d'une cellule eucaryote. Cette structure complexe s'étend sur toute la longueur du flagelle et est le principal responsable de l'activité motrice du spermatozoïde. L'axonème est composé de 9 doublets de microtubules organisés autour de deux singlets de microtubule (paire centrale). L'ensemble est organisé dans une conformation dite 9 + 2 (Gibbons 1981 ; Inaba 2015). Chaque doublet met en association un microtubule A et un microtubule B. Ces paires de microtubules sont reliées par des ponts de nexine qui permettent un rôle de maintien structural tout en conservant une élasticité nécessaire à la propulsion. Chaque microtubule A possède deux bras de dynéine tendant vers le microtubule B voisin. La paire central est enveloppée d'un complexe protéique vers lequel tendent les ponts radiaires des doublets extérieurs. L'oscillation est due à un mouvement des bras de dynéines qui font glisser les doublets les uns par rapport aux autres. La paire centrale (via les ponts radiaires, à un rôle de centre organisateur du mouvement).



**Figure 3.**

### **Représentation schématique d'un axonème.**

Neuf doublets périphériques de microtubules A et B reliés entre eux par un pont de nexine entourent une paire centrale. Chaque microtubule est formé de protofilaments de tubuline. Chaque tubule A possède des bras de dynéine internes et externes et des ponts radiaires orientés en direction des projections du doublet central (Inaba, 2007 modifié).

### c. *Les fibres denses*

Issues des colonnes segmentées du col, les fibres denses sont des structures protéiques au nombre de neuf présentes sur toute la longueur du spermatozoïde à l'exception de la pièce terminale. Disposées en regard de chaque microtubule, elles possèdent à la fois un rôle structural et une fonction mécanique. La rigidité des fibres denses permet une protection du flagelle lors de son parcours dans les voies génitales mâle puis femelle, et leur disposition asymétrique permet une contrainte structurelle qui va favoriser la transformation du battement flagellaire en un mouvement de type hélicoïdal (Oko 1988, Lindemann 1996, Shao et al., 1997).

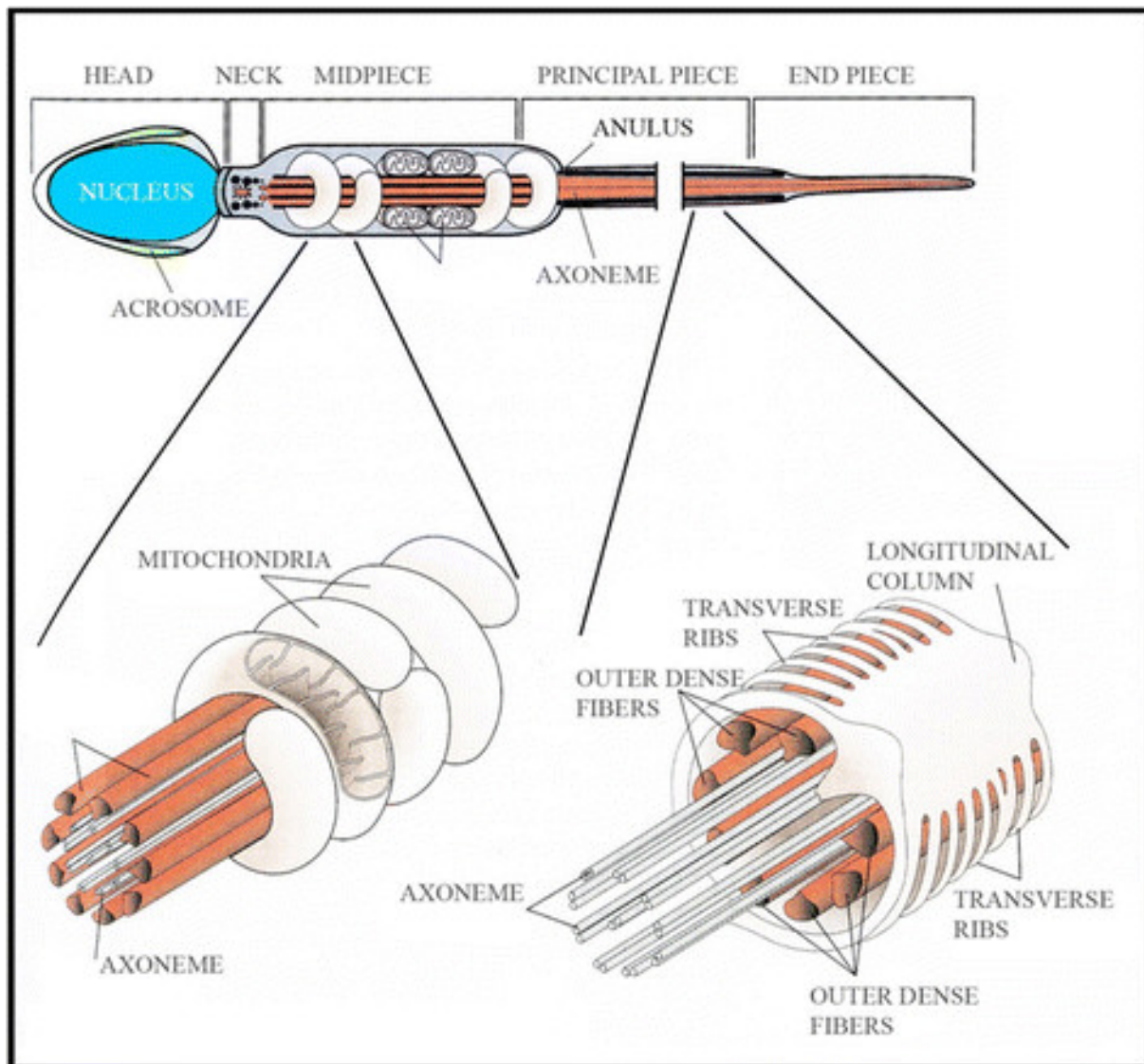
### d. *La gaine mitochondriale*

La gaine mitochondriale est une structure hélicoïdale dont la formation débute lors de la spermiogénèse (Phillips, 1977). Chez l'humain onze à treize tours de mitochondries sont organisées en spirale autour de la pièce intermédiaire et forment une gaine qui va générer sous forme d'ATP une partie de l'énergie nécessaire à la mobilité spermatique via le processus de phosphorylation oxydative. Bien que l'importance de l'activité mitochondriale dans la fécondation a été soulignée par Rossato *et al.* dès 1999, la gaine mitochondriale n'est pas l'unique pourvoyeur d'énergie du spermatozoïde, la gaine fibreuse remplissant également cette fonction (Narisawa et al. 2002).

### e. *La gaine fibreuse*

A l'image de la gaine mitochondriale qui enserre la pièce intermédiaire, la gaine fibreuse est une structure protéique qui entoure l'axonème et les fibres denses au niveau de la pièce principale. La gaine est structurée sous la forme d'un manchon composé de deux colonnes longitudinales reliées par des stries de fibres. Au-delà de son rôle mécanique essentiel à une mobilité spermatique normale (Eddy et al., 2003), la gaine fibreuse possède également de nombreuses protéines impliquées dans les processus de signalisation du spermatozoïde, dont les plus abondantes sont les protéines AKAP4 et AKAP 3 (A Kinase Anchoring Protein). Elle possède ainsi une fonction de production énergétique par génération d'ATP qui sera essentielle pour les processus de phosphorylation des protéines, de capacitation et d'hyperactivation flagellaire (Burgos 1995, Eddy 2003, Eddy 2007, Newell 2008). Elle joue aussi un rôle de régulation des voies de signalisation via l'interaction des protéines AKAP avec d'autres protéines impliquées dans la physiologie spermatique et principalement les protéines kinases AMP-cycliques dépendantes (PKA). Les protéines AKAP interagissent également avec les protéines CABYR, SPA17, ROPN1L, ROPN1. Plus récemment, les travaux de notre équipe ont aussi démontré une interaction des protéines AKAP avec FSIP2 ou FibrousSheath

Interaction Protein 2 (Miki 2002, Chiriva 2009, Fiedler 2013).



*Figure 4. Représentation schématique des gaines mitochondriales et fibreuses (Andolfi, 2015).*

## 2. La physiologie spermatique

Le spermatozoïde est une cellule autonome au destin physiologique tout particulier. Créé lors de la spermatogénèse dans le testicule, sa formation est inachevée et sera terminée lors du transit à travers un organe particulier qu'est l'épididyme. A la fin du transit, il est ensuite stocké dans la queue de l'épididyme pendant une période indéterminée. Il traverse ensuite les voies génitales masculines lors de l'éjaculation puis progressera dans les voies féminines jusqu'à l'ovocyte qu'il fécondera. Isolé de son tissu d'origine, il est primordial que le spermatozoïde soit équipé d'un système de communication perfectionné pour interagir de façon efficace avec son environnement et accomplir sa tâche. C'est ainsi que le spermatozoïde possède le répertoire le

plus étendu de protéines transmembranaires du corps humain dont certaines lui sont exclusives. Les canaux et pompes ioniques sont les acteurs majeurs de la physiologie spermatique.

### 2.1. Mobilité

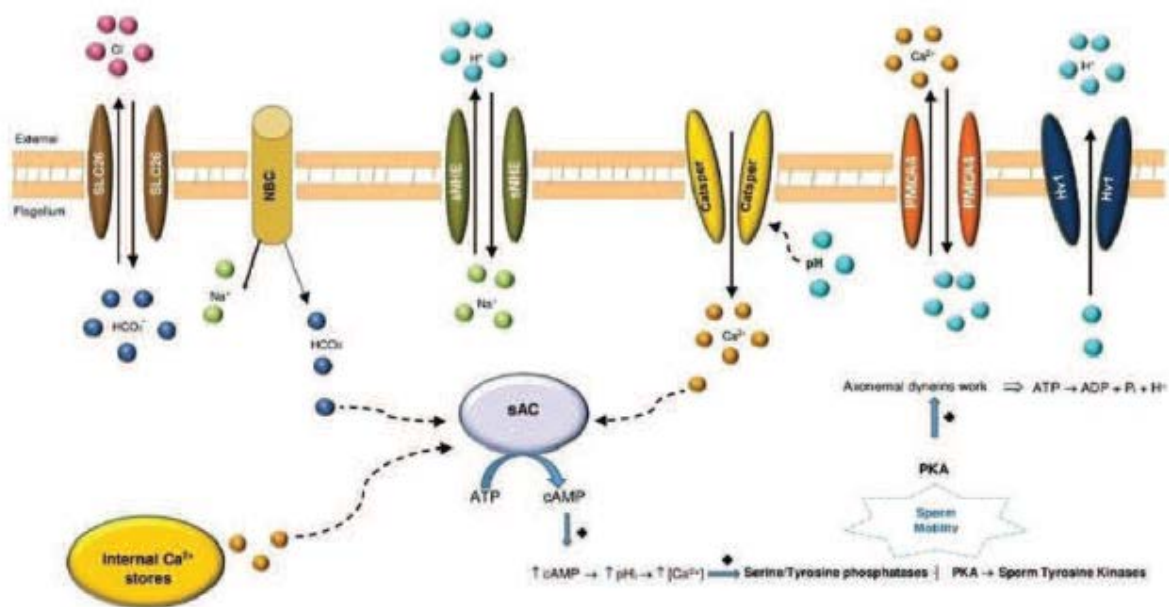
La régulation de la motilité des spermatozoïdes *in vivo* a lieu à trois niveaux : le réservoir épидидymaire (queue de l'épididyme et canal déférent) où le spermatozoïde est dans un état de quiescence ; l'éjaculation où le spermatozoïde acquiert une mobilité progressive qui permettra à certains d'entre eux de progresser dans la glaire cervicale et traverser le col de l'utérus; et le réservoir situé à la jonction utéro-tubaire où l'on assiste à l'hyperactivation flagellaire qui autorisera les spermatozoïdes à pénétrer le complexe folliculaire.

#### *a. La mobilité spermatique pré-éjaculation*

Dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes sont intrinsèquement capables de mobilité, mais demeurent quiescents jusqu'à leur éjaculation. Des protéines spécifiques inhibitrices de la mobilité telles que l'immobiline, la carnitine ou la glycerylphosphorylcholine ont été identifiées dans le liquide épидидymaire murin (Turner, 1982 ; Usselman, 1983) ou la séménogéline ou l'endocannabinoïde 2-arachidonoylglycerol chez l'humain (Hamamah, 1998, Cobellis, 2010). Ces facteurs semblent en revanche inopérant chez le bovin dont la quiescence serait plutôt maintenue par un facteur inhibiteur pH-dépendant (Carr, 1984 ; Acott, 1984). Bien que ces facteurs inhibiteurs jouent un rôle certain, il est admis que la mobilité des spermatozoïdes est majoritairement inhibée par le pH acide de l'environnement épидидymaire qui inactive les dynéines ATPases pH-dépendantes à l'origine du battement du flagelle. Le liquide épидидymaire bovin est caractérisé par un pH de 5,5 pour un pH cytosolique des spermatozoïdes épидидymaux de 6,5 (Babcock, 1983) et des concentrations extrêmement faibles de bicarbonate (Mann, 1981), facteur clé de la motilité des spermatozoïdes.

#### *b. La mobilité spermatique post-éjaculation*

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes éjaculés sont mélangés avec le liquide séminal provenant de la prostate et exposé à un pH plus basique et des concentrations d'ions bicarbonate et calcium modifiées. On assiste alors à une alcalinisation du pH intracellulaire qui a pour effet d'activer des canaux ioniques pH dépendant comme CatSper et augmenter la concentration de calcium et de bicarbonate en sein de la cellule. Cette élévation aura pour effet d'activer la cascade d'adénylate cyclase (sAC) et d'entraîner la phosphorylation des protéines par la protéine kinase A (PKA), activant une mobilité spermatique progressive. Les protéines inhibitrices de la surface des spermatozoïdes sont également éliminées.

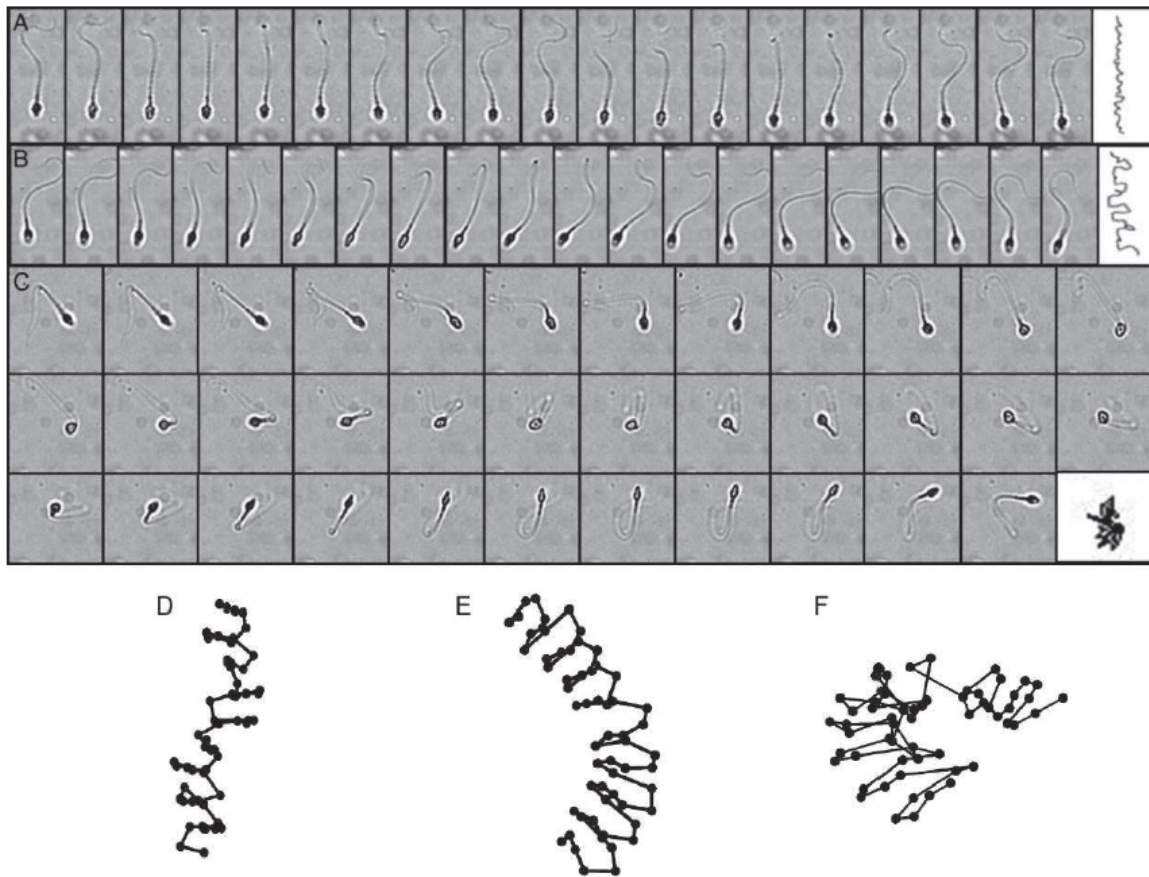


**Figure 5. Représentation schématique simplifiée des voies de signalisation de la mobilité spermatique.** L'activation du co-transporteur NBC et la régulation du couple  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  par les transporteurs SLC26 augmentent la concentration bicarbonate intracellulaire qui va induire une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via CatSper. Les ions bicarbonate et calcium vont réguler les sACs qui vont générer de l'AMPc qui vont activer les PKA. Les PKA vont activer les tyrosines kinases pour enclencher la cascade de phosphorylation des bras de dynéines axonémales. D'après (Pereira, 2015) modifié.

### c. L'hyperactivation flagellaire

Le processus d'hyperactivation accompagne une modification du mouvement flagellaire qui passe d'un battement symétrique de faible amplitude à un battement asymétrique de forte amplitude (Ishijima, 2015). Ce changement est nécessaire à la progression dans l'oviducte (ou trompes de Fallope chez la femme) et la pénétration du cumulus oophorus (Lishko, 2010).

L'hyperactivation est concomitante à l'augmentation du pH intracellulaire et des concentrations ioniques de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{HCO}_3^-$ . Ces augmentations sont également des acteurs clés du processus de capacitation.



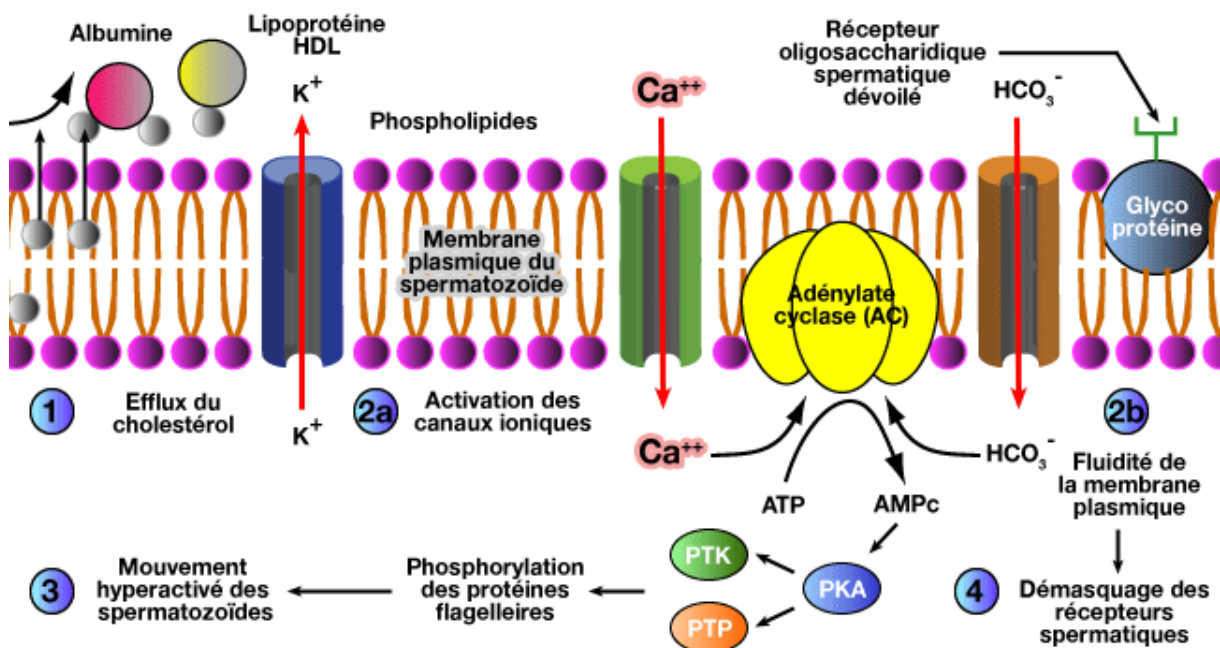
**Figure 5. Représentation des trois principaux états de mobilité du spermatozoïde.** Photographies représentatives de la mobilité flagellaire de spermatozoïdes exhibant une mobilité (A) progressive, (B) intermédiaire ou (C) hyperactivée. Les photographies sont montrées à 0.005 secondes d'intervalles. Les dernières images présentent le trajet de la tête lors de la séquence. La largeur de chaque photographie est de (A-B) 17 mm ou de (C) 30 mm. Représentation schématique d'exemples de trajets de têtes de spermatozoïdes présentant des mobilités de spermatozoïdes de plus en plus capacités (D) (E) intermédiaires ou (F) hyperactivés (Boryshpolets, 2015) modifié.

## 2.2 Capacitation

Au contact des sécrétions utérines, le spermatozoïde va réaliser un processus complexe de maturation nommé capacitation. Ce phénomène va engendrer plusieurs modifications physiologiques réversibles qui permettront au gamète mâle d'acquérir son pouvoir fécondant (Austin, 1952 ; Austin, 1958 ; Perreault, 1982 ; Visconti, 1999).

Ce processus induit un profond remaniement membranaire. En absence de capacitation, la forte présence de cholestérol associée à des locus de radeaux membranaires limite la fluidité et la

perméabilité de la membrane des spermatozoïdes. En arrivant dans les voies génitales féminines, le gamète mâle entre au contact d'accepteurs de cholestérol comme l'albumine et les lipoprotéines, qui vont induire une réorganisation de la membrane (Lin, 1996 ; Gadella, 2008 ; Visconti, 1999). Le réarrangement des protéines de la membrane plasmique s'accompagne de l'externalisation et la phosphorylation de récepteurs impliqués dans la réaction acrosomique (Salicioni, 2007 ; Arcelay, 2008 ; Visconti, 2011). Dans cette nouvelle configuration membranaire, la diffusion ionique est facilitée. On assiste à une hyperpolarisation de la membrane et le pH et les concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{HCO}_3^-$  augmentent (Arnoult, 1999 ; Jimenez-gonzalez, 2007 ; De La Vega-Bletran, 2012). Comme vu précédemment, ces modifications ioniques participent au phénomène d'hyperactivation flagellaire (Navarro, 2008 ; Darszon, 2011).



**Figure 6. Représentation schématique des principaux événements de la capacitation.**

L'efflux de cholestérol induit par les accepteurs va remodeler la membrane et faciliter les échanges ioniques. L'activation des canaux induit une augmentation des concentrations intracellulaires de calcium et bicarbonate qui vont stimuler la production d'AMPc par le biais des adénylate cyclases ou sACs. L'AMPc ainsi produit active à son tour les phosphorylations associées à la capacitation et indirectement l'hyperactivation flagellaire.

Dans le modèle bovin, même si le mécanisme sous-jacent n'est pas entièrement compris, il est possible d'utiliser *in vitro* de l'héparine pour stimuler la production d'AMPc intracellulaire et



induire la capacitation (Parrish, Susko-Parrish, Winer, & First, 1988 ; Cormier & Bailey, 2003; Parrish, 2014).

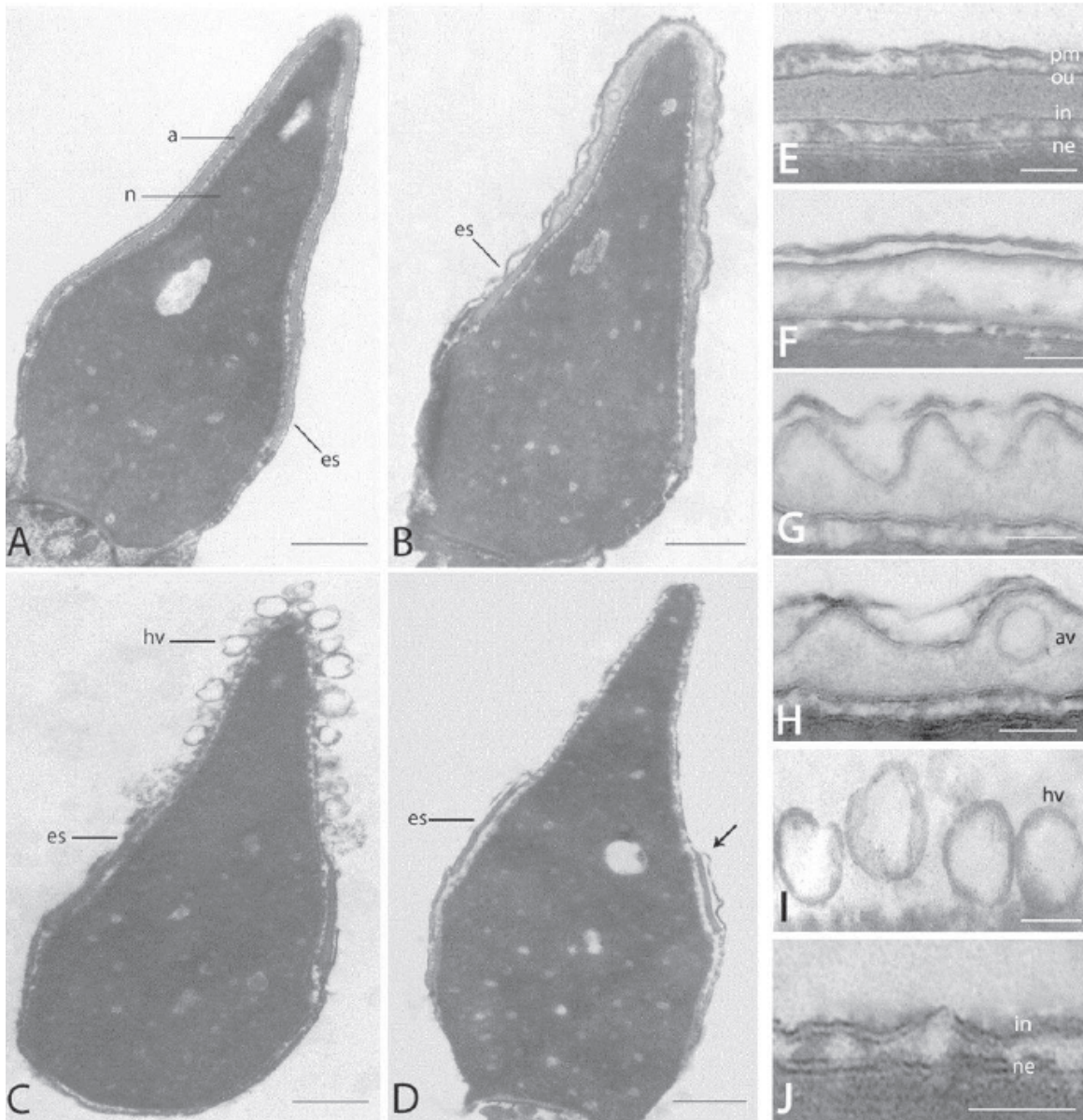
### 2.3 Réaction acrosomique

La réaction acrosomique est un phénomène d'exocytose irréversible, indispensable à la fusion entre le spermatozoïde et l'ovocyte. Les membranes plasmique et acrosomiale externe du spermatozoïde fusionnent et forment de petites vésicules hybrides qui se détachent du gamète mâle permettant ainsi la libération du contenu de l'acrosome. Sa complexité est encore le centre de nombreuses recherches notamment sur ses agonistes.

On connaît deux agonistes déclencheurs de la réaction acrosomique :

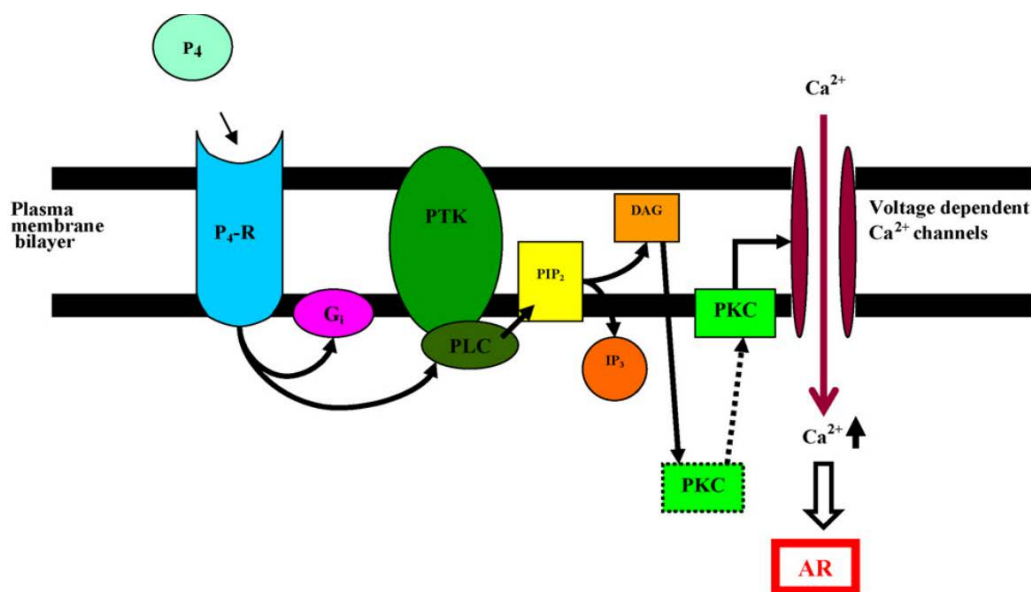
- La progestérone (P4), (Roldan, Murase & Shi, 1994) une hormone sécrétée par les cellules du cumulus, dont un récepteur P4R est présent sur la surface des spermatozoïdes matures et capacités (Blackmore and Lattanzio, 1991 ; Cheng et al., 1998b ; Pietrobon et al., 2003) ;
- La ZP3, glycoprotéine de la zone pellucide de l'ovocyte, (Bleil et al., 1983 ; Rodlan et al., 1994).

Il était historiquement admis que l'attachement du spermatozoïde à la ZP3 était le seul déclencheur de la réaction acrosomique. Le contenu de l'acrosome dégradant alors la zone pellucide pour assister la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte. Ce modèle fut cependant remis en cause en 2011, quand Inoue et al. ont prouvé que des spermatozoïdes ayant déjà effectué leurs réaction acrosomique restaient capable de féconder un ovocyte entouré de sa zone pellucide et de son cumulus chez le modèle murin (Inoue et al., 2011). Il fut alors démontré que la réaction acrosomique pouvait avoir lieu avant d'atteindre la zone pellucide sous l'action de la progestérone sécrétée par les cellules du cumulus (Inoue et al., 2011 ; Jin et al., 2011).



**Figure 7. Microscopie électronique des différentes étapes de la réaction acrosomique.** Electromicrographies de têtes de spermatozoïdes (A) intacts, (B) à acrosome enflé, (C) à acrosome vésiculé et (D) à acrosome réagi. A la fin de la réaction, la membrane interne devient partie intégrante de la membrane délimitant le spermatozoïde (flèche dans D). Les images E à J présentent l'état de la membrane de la tête lors de la réaction acrosomique avec (E) membrane typique, (F) acrosome enflé et membrane externe lisse, (G) acrosome enflé et membrane externe ondulée, (H) acrosome avec vésicules formées, (I) acrosome avec vésicules hybrides abondantes et (J) acrosome réagi. a, acrosome ; n, noyau ; es, segment équatorial segment ; hv, vésicule hybride ; pm, membrane plasmique ; ou, membrane acrosomale externe ; in, membrane acrosomale interne ; ne, enveloppe nucléaire ; av, vésicule acrosomale (Zanetti & Mayorga, 2009). Echelle = 500nm (A-D) et 100nm (E-J)

Le calcium joue un rôle majeur dans le déclenchement de la réaction acrosomique. Au cours de la capacitation la polymérisation des filaments d'actine a également lieu dans la tête du spermatozoïde et favorise le maintien de l'acrosome (Breitbart et Finkelstein, 2015). L'augmentation importante de calcium intracellulaire permet l'activation de la phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) qui catalyse la dégradation de PIP<sub>2</sub> (phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate) et produit ainsi du DAG (diacylglycérol) et de l'IP<sub>3</sub> (inositol triphosphate). L'IP<sub>3</sub> produit favorise la libération des stocks acrosomiques de calcium ce qui entraîne l'activation de PKC et la dégradation de F-actine ce qui permet le déclenchement de la réaction acrosomique (Ickowcz et al., 2012). Ce phénomène assiste le spermatozoïde lors de la traversée des cellules et la pénétration de la zone pellucide par le biais d'enzymes. La réaction acrosomique est nécessaire au démasquage de protéines de liaison essentielles à la fusion gamétique.



**Figure 8. Représentation schématique de la voie de signalisation proposée pour la réaction acrosomique induite par P4 dans les spermatozoïdes d'étalon (Rathi et al., 2003, modifié).** La progestérone (P4) agit sur un récepteur non génomique lié à la membrane plasmique (P4-R) qui est exposé pendant la capacitation. Ceci active la protéine tyrosine kinase (PTK) couplée à la phospholipase C (PLC) directement ou via une protéine G (G<sub>i</sub>). L'automate activé transforme le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylglycérol (DAG). Le rôle de l'IP<sub>3</sub> n'est pas encore clair, mais la DAG stimule la protéine kinase C (PKC) et la transloque vers la membrane plasmique. PKC ouvre alors les canaux Ca<sup>2+</sup> dépendant de la tension dans la membrane plasmique, ce qui conduit à l'afflux de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire. L'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire entraîne une exocytose acrosomique (AR). (Witte et al., 2007)

## II. L'ovocyte et son follicule

Les ovaires renferment l'ensemble des gamètes femelles présents à différents stades de développement. Aux nombres de deux, ils sont localisés dans la cavité pelvienne et sont constitués de deux grandes parties :

- La zone médullaire, située au centre de l'ovaire, comporte le système de vascularisation, le système neuronal, des reliquats embryonnaires et également des amas de cellules interstitielles.
- La région corticale contient des follicules ovariens à différents stades de croissance, des cellules conjonctives et le corps jaune lors de la phase lutéale.

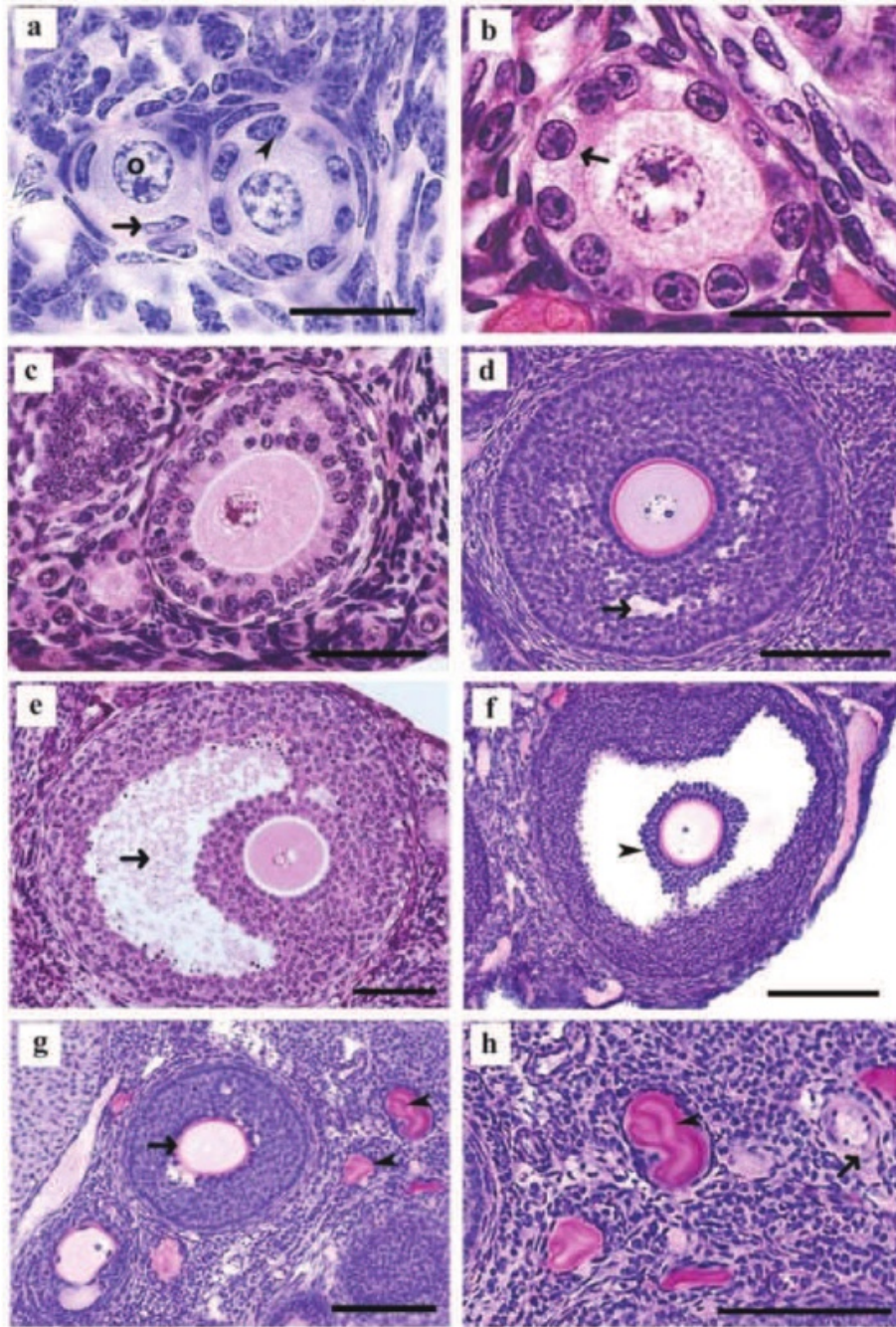
L'activité ovarienne devient cyclique à partir de la puberté, qui est de 8 mois chez la vache. L'ovaire joue deux rôles importants : la sécrétion de stéroïdes sexuels et la croissance, maturation puis libération de l'ovocyte. Ce dernier est produit selon trois processus qui sont étroitement liés : la folliculogénèse, l'ovogénèse et le cycle ovarien.

*Comme le développement folliculaire et la croissance ovocytaire se font parallèlement, nous allons parler du développement général du complexe ovocyte/follicule jusqu'à l'ovulation puis nous aborderons la maturation ovocytaire.*

### 1. Co-evolution de l'ovocyte et des cellules folliculaires au sein du follicule

La folliculogénèse est le processus de développement d'un follicule primordial jusqu'à l'ovulation d'un complexe ovocyte-cumulus mature. L'histoire de l'ovocyte et de ses cellules folliculaires débute lors de la vie fœtale. Des cellules germinales appelées ovogonies prolifèrent par mitose (Simtz et Cortvrint, 2002) dans l'ovaire. Ces cellules se bloquent ensuite en prophase de première division méiotique au stade diplotène et marquent ainsi la fin de leur prolifération. Chaque ovocyte s'entoure d'une couche de cellules de granulosa pour former le follicule primordial. Durant ce stade, ce complexe est quiescent, l'ovocyte ne grossit pas et les cellules qui l'entourent ne se multiplient pas. Leur croissance reprendra sous l'impulsion d'une activité hormonale. Les follicules primordiaux seront alors recrutés par groupe tout au long de la vie reproductive. Les follicules ovariens vont prendre différentes appellations durant leur développement. Basés sur un ensemble de critères morphologiques, nous distinguons : follicule primordial, follicule primaire, follicule secondaire, follicule pré-antral et follicule antral (ou DeGraaf).

La folliculogénèse est un processus continu qui se termine à 99% des cas par l'atrésie de l'ovocyte, l'ovulation demeurant un phénomène exceptionnel.



**Figure 9. Classification des follicules sur coupes histologiques d'ovaires.** (a) Follicules primordiaux composés d'un ovocyte (o) entouré d'une couche aplatie de cellules de la granulosa (↑). Les ovocytes cerclés de cellules majoritairement cubiques (▶) sont considérés primaires. (b) Les follicules primaires sont composés d'un ovocyte et d'une seule couche de cellules cubiques (↑). (c) Les follicules secondaires possèdent deux ou plusieurs couches de cellules cubiques sans antrum visible. (d) Les follicules pré-antraux présentent des espaces émergents et (e) les follicules antraux des cavités antrales définies (↑). Notons que la délimitation entre les deux stades est sujette à débats et qu'il existe de ce fait des divergences de nomenclature les concernant. (f) Le follicule pré-ovulatoire présente un ovocyte individualisé entouré des cellules du cumulus (↑). (g) Zone pellucide de follicule sain (↑) et vaisseau sanguin (▶). (h) Follicule atrésique (↑) et vaisseau sanguin (▶). Echelle = 20 mm (a-b), 50 mm (c), 100 mm (d-e-g-h) et 200 mm (f). Selon Myers, Britt, Wreford, Ebling, & Kerr, 2004 modifié.

## 2. Interaction entre ovocytes et cellules folliculaire

Le développement des cellules de la granulosa et la croissance ovocytaire sont des phénomènes étroitement liés qui se déroulent parallèlement et interagissent via de nombreux types d'échanges. Très tôt dans la folliculogénèse, on observe une communication entre l'ovocyte et les cellules qui l'entourent. Ces interactions évoluent et se font de plus en plus nombreuses au cours du développement.

Des signaux de contact sont détectés dès le stade précoce du follicule primordial, puis des extensions de cellules du cumulus apparaissent et pénètrent dans l'ovocyte parfois à proximité du noyau. Dans le follicule pré-antral les projections transzonales se multiplient et forment un réseau de communication entre les différentes couches de cellules mais aussi avec l'ovocyte. Ces connections se rétractent lorsque l'ovocyte reprend la méiose puis s'interrompent peu à peu suite à l'action des gonadotrophines. (Hyttel P, Greve T, Callesen H 1989).

Cinq types de communications ont été identifiés au cours de l'ovogénèse :

- Des signaux de contacts impliqués dans la transcription/activation de gènes cibles, tels que Notch (Borggreffe et Liefke, 2012)
- Des interactions ligands-récepteurs impliqués dans la croissance, la différenciation cellulaire.
- Des voies de signalisations autocrine-paracrine
- Les projections transzonales PTZs
- Récepteurs à tyrosine kinases

### a. Signaux de contacts

Un signal de contact se définit par une interaction physique entre une cellule émettant des signaux cellulaires et une cellule possédant le récepteur ciblé. Ces signaux apparaissent très tôt, dans le follicule primordial ils permettent l'activation de gènes maternels cibles. Le plus connu est la molécule transmembranaire Notch qui permet l'activation de la transcription de gène par sa translocation dans le noyau (Borggreffe et Liefke, 2012).

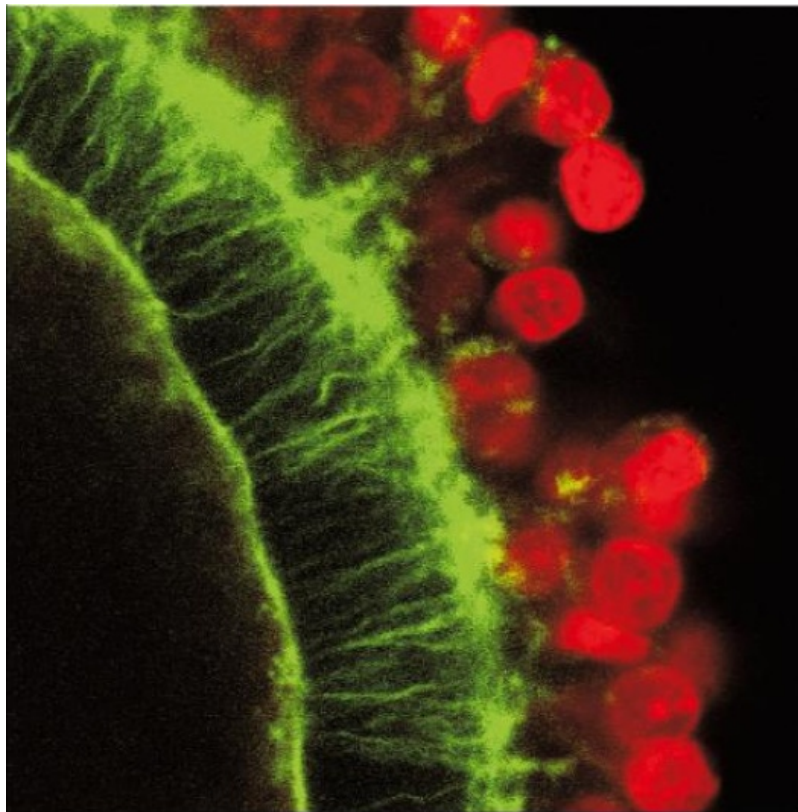
### b. Interactions ligands-récepteurs

Les interactions ligands-récepteurs sont présentes lors de l'évolution du follicule primordial en follicule primaire. Lors de cette transition, l'ovocyte commence à grossir et une première couche de cellules de granulosa se forme autour de lui. Les interactions ligands récepteurs interviennent lors de la croissance, la différenciation et le cycle cellulaire via de nombreux

facteurs : EGF (epidermal growth factor), KGF (keratinocyte growth factor), BMP 14 et 15 (bonemorphogenic proteins 14 and 15).

*c. Projections transzonales*

Les projections transzonales sont des extensions des cellules de la granulosa qui traversent la zone pellucide de l'ovocyte formant plusieurs types de jonction : zonulaires, communicantes et desmosomes (Mora et al., 2012). Les projections transzonales sont très abondantes et forment un véritable réseau. Elles permettent le passage de petites molécules comme l'AMP-cyclique (AMPc) et GMP-cyclique (GMPc) (Albertini et al., 2004) et pourraient aussi transférer de grandes molécules d'ARNm (Macaulay et al., 2015). Les PTZs jouent un rôle majeur dans l'ovogenèse et s'avèrent aussi impliquées dans la maturation *in vitro* dans le modèle bovin (Coticchio et al., 2015).



**Figure 10.** Observations par microscopie confocale de complexes ovocyte-cumulus canins après immunocoloration de la tubuline en vert (fluorochrome alexa fluor) et de l'ADN en rouge (fluorochrome ethidium homodimère-1). Les noyaux des cellules de granulosa sont marqués en rouge et leurs projections transzonales traversent la zone pellucide (vert) pour établir des contacts avec l'ovocyte. (John Libbey Eurotext 2003 Le dialogue ovocyte-granulosa au cours de la folliculogénèse).

### ***Récepteurs à la tyrosine kinase***

De nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase sont impliqués lors du développement folliculaire notamment via des facteurs de croissance comme EGF (Epidermal Growth Factor), l'insuline, le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et le FGF2 (Fibroblast Growth Factor). Leur action est dépendante du stade de développement du follicule. L'EGF modulerait la phosphorylation des résidus tyrosines des protéines des granules corticaux lors de la maturation ovocytaire, les récepteurs à insuline seraient présents dans l'ovocyte et les cellules du granulosa et leur expression serait accrue par la stimulation des gonadotrophines (Purcell, Chi, Lanzerdorf et Moley., 2012).

### **3. Ovogenèse : Croissance ovocytaire**

L'ovogenèse est le processus aboutissant à la formation d'un ovocyte apte à être fécondé. Il devra fournir la moitié du capital génétique, être capable de fusionner avec un spermatozoïde et réunir le matériel génétique mâle et femelle. Pour acquérir toutes ces compétences l'ovocyte passe par plusieurs étapes de croissance et de maturation durant lesquelles, comme nous venons de le voir, les interactions entre ovocyte et cellules folliculaires sont nombreuses et primordiales.

Dès la naissance, l'ovaire contient un réservoir de follicules primordiaux composé d'un ovocyte bloqué en prophase méiotique au stade diplotène et d'une seule couche de cellule folliculaire. Par un mécanisme qui n'a pas encore été totalement élucidé les follicules primordiaux sont activés et commencent une multiplication des cellules folliculaires et l'ovocyte commence sa croissance. Lorsque la cavité du follicule antral commence à apparaître l'ovocyte a atteint 80% de sa taille définitive, il a alors acquis sa compétence méiotique et est apte à reprendre le processus de méiose. Il obtiendra par la suite sa compétence développementale et de fusion avec le gamète mâle.

Durant sa croissance, l'ovocyte évolue morphologiquement, son diamètre croît et son volume augmente jusqu'à 300 fois. La zone pellucide et les granules corticaux se forment à l'aide de l'appareil de Golgi. Les granules corticaux sont des petites vésicules qui se forment au contact de la membrane plasmique et qui auront une fonction importante lors de la fécondation, notamment empêcher la polyspermie (pénétration de plusieurs spermatozoïdes dans l'ovocyte). La zone pellucide est une enveloppe glycoprotéique qui entoure l'ovocyte, elle jouera elle aussi



un rôle majeur dans la fécondation, notamment dans le blocage de la polyspermie. La zone pellucide est perméable et n'empêche pas l'ovocyte d'interagir avec ses cellules folliculaires elle permet le passage de grosses molécules sécrétées par les cellules du cumulus et des projections transzonales.

La croissance de l'ovocyte et le développement folliculaire sont des processus étroitement liés. Pendant l'ovogénèse, l'ovocyte sécrète des protéines spécifiques comme GDF9 (Growth and Differentiation Factor 9) sans lesquelles les follicules murins n'évoluent pas au-delà du stade primaire (Dong et al., 2015) et BMP15 (Bone Morphogenic Protein 15) dont l'absence induit des défauts de fertilité. Ces deux protéines favorisent le développement des follicules et la multiplication des cellules de la granulosa de façon FSH-indépendante (Elvin et al., 1999 ; Otsuka et al., 2000). Elles sont exprimées du stade primaire jusqu'à l'expansion des cellules folliculaires (mucification) suite au pic de gonadotropines.

La croissance ovocytaire est une période de transcription active où l'ovocyte produit une grande quantité d'ARN qui seront indispensables lors de l'achèvement de la méiose et le développement embryonnaire précoce (Brandhorst 1985 ; Curtis et al., 1995 ; Nothias et al., 1995). Après cela le noyau des ovocytes devient transcriptionnellement inactif (De La Fuente et al., 2004). L'absence de transcription nucléaire entre les reprises de maturations méiotiques et l'activation du génome embryonnaire souligne l'importance de la réserve d'ARN et de protéines préexistantes (Seydoux et Braun 2006).

Les ARN et les protéines synthétisés par l'ovocyte possèdent une meilleure conservation que les ARN et protéines nouvellement créés par l'embryon (King et al., 2005).

Durant son développement, les cellules du cumulus fournissent de l'AMPc à l'ovocyte via les jonctions communicantes (CX43-GAPJ), le niveau d'AMPc intra-ovocytaire joue un rôle important dans le blocage méiotique (Richard., 2007 ; Bilodeau-Goeseels., 2011).

*Au stade antral, l'ovocyte atteint 80% de sa taille finale et a emmagasiné assez d'ARNm pour acquérir sa compétence méiotique. Cela lui permet une réponse à la stimulation de LH.*

#### *a. Maturation ovocytaire*

Durant toute la croissance ovocytaire, l'ovocyte est bloqué au stade diplotène de prophase de méiose I. Cet état de dormance est dû chez de nombreuses espèces à l'AMPc intra ovocytaire. En effet l'AMPc fournit par les cellules folliculaires via les projections transzonales va stimuler

l'activité de la protéine kinase A (PKA) qui va inhiber l'action de MPF et MAPK, deux acteurs majeurs de reprise de la méiose.

La maturation ovocytaire recouvre l'ensemble des modifications nucléaires et cytoplasmiques dans l'ovocyte suite à un pic de gonadotrophine. On observe deux types d'événement :

- La reprise de la méiose du stade GV jusqu'au stade MII
- La maturation cytoplasmique avec les modifications morphologiques et moléculaires.

*b. Reprise de la méiose*

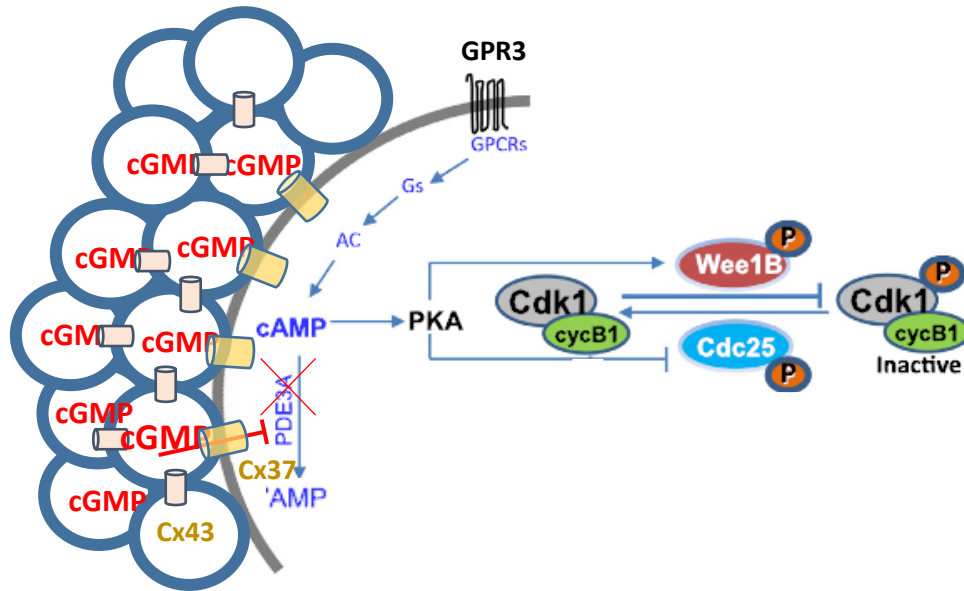
La reprise de la méiose permet le passage du stade GV au stade métaphase II de l'ovocyte, avec expulsion du premier globule polaire. L'activation du complexe MPF est essentielle pour cette transition. Le MPF est composé d'une unité catalytique appelé CDK1 et d'une sous unité régulatrice, la cyclineB1. CDK1 est une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille CDK très conservée chez les eucaryotes, et liée à l'histone H1.

La forme inactive du complexe CDK1/cyclinB1 est phosphorylé sur deux résidus : thréonines (Thr14) et tyrosines (Tyr15), et le complexe est activé par déphosphorylation due à l'action des phosphatases (CDC25b phosphatase). Ce mécanisme est régulé par la cascade d'activation de l'AMPC (figure 11).

Pour maintenir un niveau suffisant d'AMPC dans l'ovocyte et permettre un arrêt méiotique, deux voies de signalisation ont été identifiées :

- Les cellules du cumulus sécrètent de l'AMPC qui se retrouve dans l'ovocyte via les projections transzonales. Sa fixation sur les PKA permet l'activation des WEE/MYT kinases et l'inhibition des CDC2 phosphatases régulant l'activité de CDK1.
- Les cellules du cumulus sécrètent aussi du GMPc entrainant l'inhibition de PDE3 qui a pour fonction d'hydrolyser l'AMPC.

Granulosa cells



**Figure 11. Activation/ Inactivation du complexe CDK1/cyclinB1 régulé par la cascade d'activation d'AMPc**

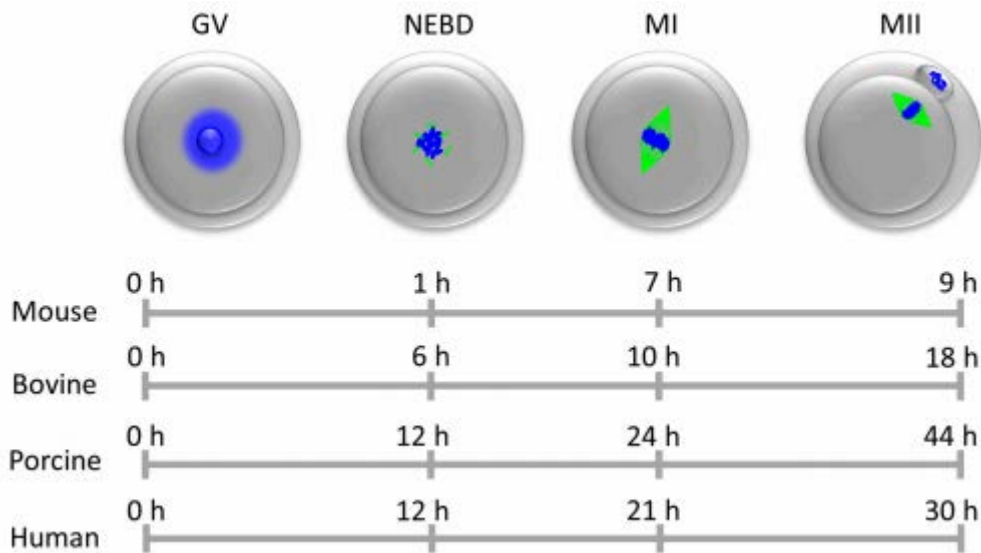
La reprise de la méiose a lieu suite au pic de LH, qui va stimuler la production d'EGF par les cellules de la granulosa. Le pic d'hormone gonadotrophine va stopper la production de GMPC produit par NPPC permettant la levée de l'inhibition de PDE3A qui va hydrolyser l'AMPc dans l'ovocyte. Une étude sur la souris a montré qu'une absence de NPPC entraîne une reprise de la méiose prématurée. De plus le pic de LH va entraîner la mucification des cellules du cumulus par l'action d'une hyaluronidase. Ceci va briser les connexions entre les cellules du cumulus et l'ovocyte et stopper la transition d'AMPc dans l'ovocyte. Ces phénomènes vont donc induire une augmentation de l'activité de CDK1 est permettre la reprise de la méiose.

### *c. Rupture de la vésicule germinale*

La rupture de la vésicule germinale (GVBD pour germinal vesicle break down) se produit quelques heures après le pic de LH. Cet évènement permet d'évaluer l'entrée de l'ovocyte en phase de maturation. Ce phénomène se déroule selon plusieurs étapes :

- Les chromosomes vont se condenser et l'enveloppe nucléaire va se plisser puis disparaître.

- L'action des microtubules MTOCs vont ensuite redistribuer les chromosomes sur la plaque métaphasique.
- Les chromosomes vont migrer vers les pôles du fuseau mitotique.



**Figure 12. Temps-séquence de la maturation méiotique.** Les ovocytes de la plupart des espèces animales sont arrêtés en prophase méiotique I au stade de la vésicule germinale (VG), c'est-à-dire avec une membrane nucléaire intacte. Lorsque les ovocytes commencent la maturation méiotique, l'enveloppe nucléaire se décompose (NEBD), la chromatine se condense et le premier fuseau méiotique se forme (métaphase I, MI). Par la suite, les ovocytes passent à travers la méiose I, lorsque le premier corps polaire est extrudé, et ils sont arrêtés dans la métaphase de la méiose II (MII) en attente de fécondation. La chromate/chromosomes sont représentés en bleu, la tubuline/fuseau en vert (Kalous et al., 2018).

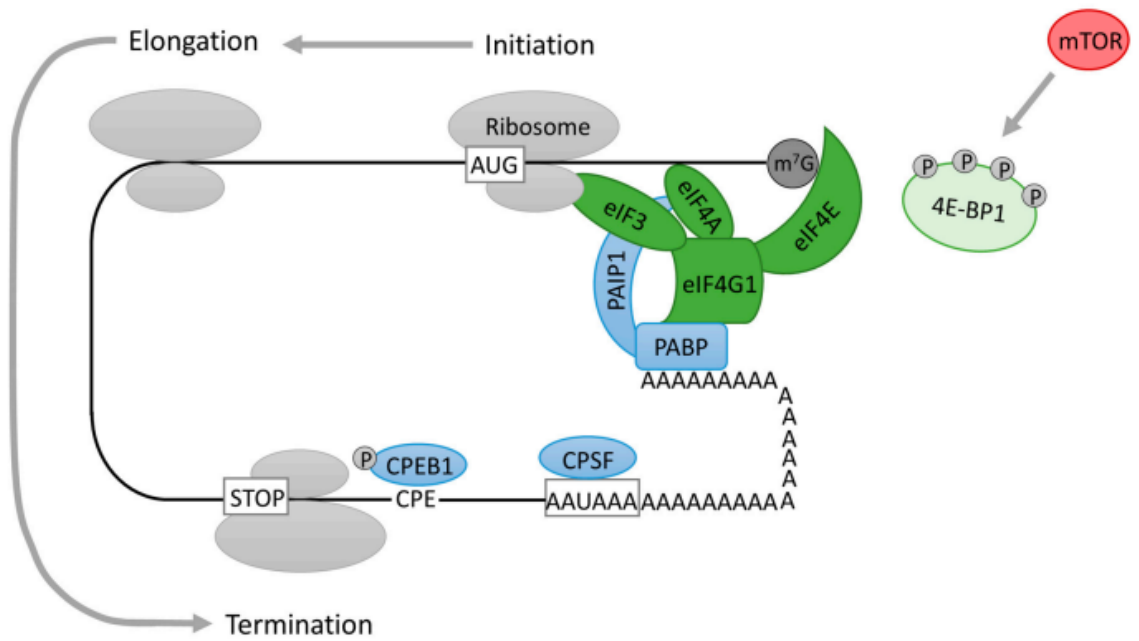
#### d. Mécanismes transcriptionnels de l'ovocyte

Les ovocytes sont aujourd'hui un modèle dans le domaine de la biologie cellulaire et du développement. Leurs maturations se font en deux divisions méiotiques sans intervention de réplication de l'ADN. Durant leur croissance, les ovocytes sont gardés en prophase de première division méiotique et accumulent des organelles, des ARN et des protéines. Quand l'ovocyte atteint sa taille maximale il subit de grands changements dans sa morphologie nucléaire dû à la condensation de sa chromatine. Le noyau devient alors transcriptionnellement inactif. En l'absence de cette transcription l'achèvement de la méiose et le développement embryonnaire

précoce repose sur les ARN maternel synthétisés préalablement. Chez le bovin, les ovocytes en GV possèdent une transcription active (Memili et al., 1998) qui décline lors de la rupture de la vésicule germinale (GVBD) (Tomek et al., 2002) et est inactive au stade de métaphase II (Memili et al., 1998). Les ARN transcrits ne sont pas impliqués dans la maturation (Tomek et al., 2002). Malgré une grande stabilité, 90% des ARN produits seront dégradés après la première division embryonnaire.

Lorsque l'ARNm est transcrit dans le noyau, il possède à l'extrémité 3' une courte chaîne de poly(A) et une structure 7-méthylguanylate (m7G) sur l'extrémité 5'. Lorsque l'ARNm est exporté dans le cytoplasme il subit une polyadénylation. Lors de ce phénomène le complexe CPE/CPEB1, présent sur l'ARN, subit une phosphorylation et s'active entraînant l'élongation de l'extrémité de poly(A) par la catalyse de PAP (poly(A) polymerase protein). Cette extrémité est alors reconnue par la protéine PABPs (poly(A) binding proteins). L'extrémité 3' (m7G) est reconnue par eIF4E (eukaryote translation initiation complex 4E). PABP et eIF4E vont alors interagir avec eIF4G1 créant un pont de protéines entre les deux extrémités (figure 12).

L'interaction physique entre les protéines liées à la queue poly(A) tel que PABP, PAIB CPEB et des protéines associées aux complexes d'initiation de traduction eIF4G eIF4A eIF3 permet la circularisation de l'ARN en associant les deux extrémités. Cette circularisation de l'ARN favorise la synthèse protéique mais aussi le recyclage des ribosomes. Ce modèle permet aussi un tri des ARNm, seul les ARN ayant les extrémités intactes seront traduits empêchant la production de protéines toxiques(figure).

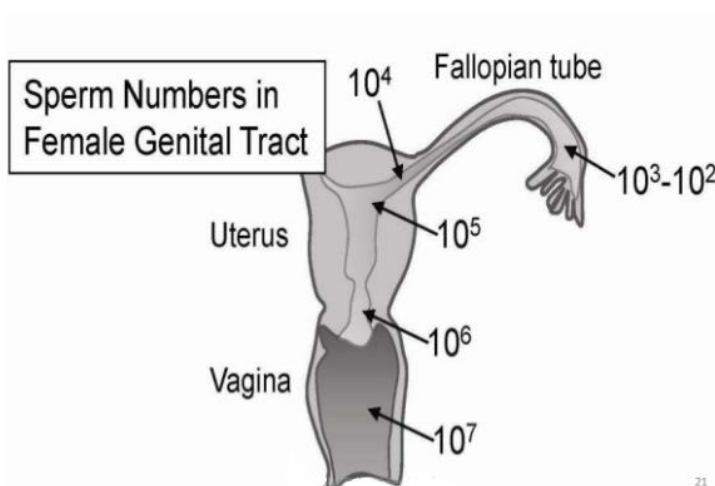


**Figure 12 - Schéma des mécanismes transcriptionnels de l'ovocyte (Kalous et al., 2018)**

A l'issue de cet ensemble de modifications physiologiques, l'ovocyte a acquis ses compétences à la fécondation puis au développement embryonnaire précoce. Nous allons à présent aborder succinctement les différentes étapes du processus de fécondation

### III. La fécondation

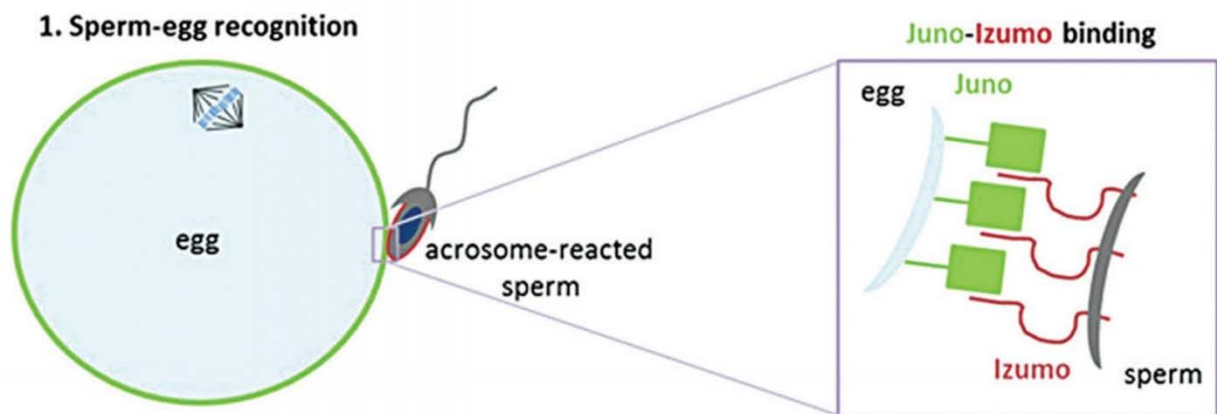
*In vivo*, seul un faible pourcentage de spermatozoïdes accède au site de fécondation. Il y a trois phases dans la migration du spermatozoïde vers les ovocytes : la traversée de la glaire cervicale où la mobilité spermatique est un élément fondamental et liée à sa mobilité dite progressive observée avant la capacitation, la remontée de l'utérus où les spermatozoïdes font un arrêt à la jonction utéro-tubaire et la remontée de l'oviducte. Les mécanismes précis par lesquels les spermatozoïdes migrent vers la région utéro-tubaire de l'utérus restent spéculatifs et feraient intervenir des contractions utérines. La remontée dans l'oviducte fait intervenir la motilité hyperactivée des spermatozoïdes, le chimiotactisme (progestérone) et les facteurs rhéotaxiques et thermotactismes (Eisenbach et Ralt, 1992 ; Kaupp et al., 2003 ; Wood et al., 2005 ; Kaupp 2012 ; Bahat et al., 2012 ; Kantsler et al., 2014 ; Alvarez et al., 2014). Le parcours des spermatozoïdes à travers les voies génitales féminines s'accompagne d'une perte importante de spermatozoïdes (Figure 13).



**Figure 13.** Nombre de spermatozoïdes présent dans les différentes parties du tractus génital après éjaculation chez l'homme. (Image provenant du site internet SlideShare)

Avant qu'un spermatozoïde puisse interagir directement avec l'ovocyte, il doit d'abord passer par le complexe cumulus et la zone pellucide riche en acide hyaluronique. Des décennies d'études ont permis de préciser les mécanismes et le (s) site (s) de l'exocytose acrosomiale, ainsi que les différences entre les espèces au cours de cette phase d'entrée. Aujourd'hui il a été montré que la RA a lieu à l'approche du cumulus et est induite par la progestérone (voir chapitre spermatozoïde)

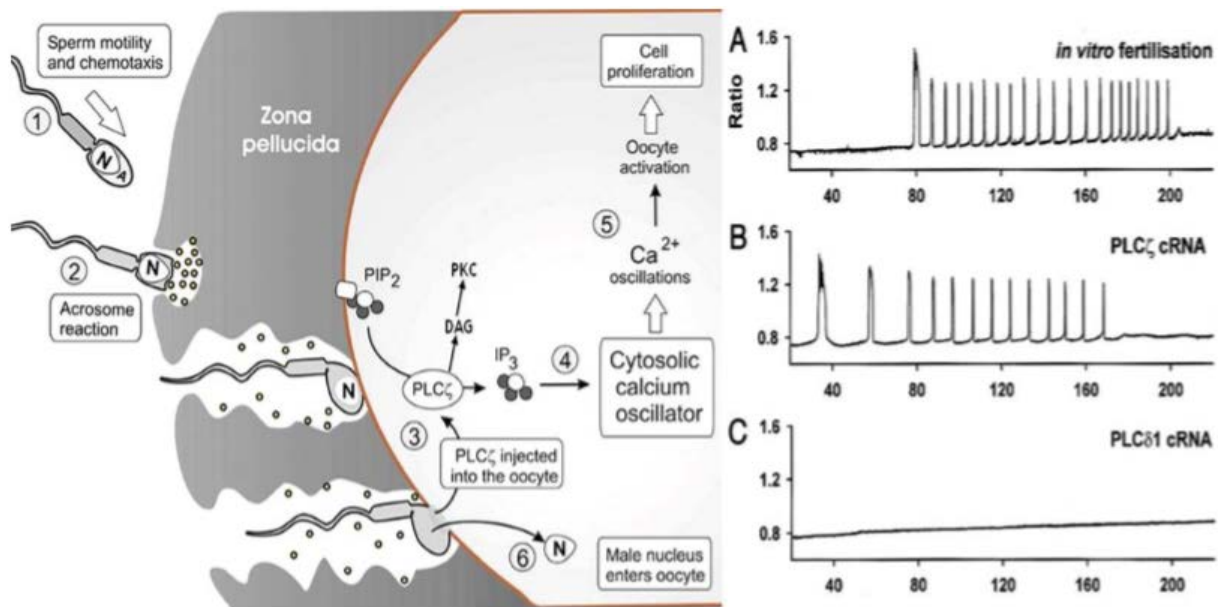
Une fois localisé dans l'espace périvitellin, le spermatozoïde se lie à la membrane plasmatique de l'ovule (oolemma) et fusionne avec celle-ci, ce qui entraîne l'internalisation du complément chromosomique haploïde du spermatozoïde par l'ovule. Les interactions moléculaires impliquées dans la fusion des spermatozoïdes avec l'oolemma ne sont pas non plus complètement comprises; cependant, des études récentes suggèrent que les protéines Izumo1 (spermatozoïdes) (Inoue et al., 2005) et CD1 et Juno (oocyte) (Bianchi et al., 2014) sont la clé de cette interaction.



**Figure 14.** *Izumo et Juno sont les deux principales molécules nécessaires à la fusion spermatozoïde-ovocyte (Bianchi et Wright, 2014 modifié).*

L'introduction des spermatozoïdes dans l'ooplasmе entraîne une augmentation initiale de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$ , suivie d'oscillations répétitives de  $Ca^{2+}$  qui stimulent l'activation de l'ovocyte. Le facteur responsable de cette activation est dérivé du cytosol du spermatozoïde, et une phospholipase C (PLC zeta) spécifique du spermatozoïde est responsable de ce phénomène et est appelé activation ovocytaire.





**Figure 15. Schémas représentatif de l'apport de la PLC zeta par le spermatozoïde à l'ovocyte.** La PLC zeta permet la libération de calcium lors de la fécondation (A). Ces vagues calciques peuvent être mimées par l'injection d'ARNc de PLC zeta (B). L'ajout d'une autre PLC ne peut reproduire ces vagues calciques (C) (Saunders 2002 modifié)

L'activation ovocytaire aboutit à la fin de la méiose de l'ovocyte qui s'accompagne de la production du 2<sup>ème</sup> globule polaire et le noyau de l'ovocyte devient le pronucléus femelle. Le noyau du spermatozoïde une fois dans l'ovocyte est rapidement décompacté et les protamines remplacées par des histones et formant le pronucléus mâle. Les deux pronucléi fusionnent pour donner le zygote.

## IV. Les biotechnologies de la reproduction chez le bovin

### 1. Le modèle bovin

#### 1.1 Physiologie de la reproduction

##### *a. Caractéristiques de l'activité sexuelle femelle*

L'âge de la puberté est compris entre 6 et 18 mois avec une saison sexuelle continue. Les cycles sont des polyœstrus avec des ovulations spontanées.

Les intervalles inter-œstrus sont de 20 jours pour les génisses et 21 jours pour les vaches. Les durées des différentes phases du cycle ovarien sont réparties comme suit : 24 à 36 heures d'œstrus, deux jours de metoestrus, 15 jours de dioestrus et deux à trois jours de proœstrus, l'ovulation intervenant 10 à 12 heures post-œstrus.

Les follicules recrutés font 2 à 3 mm, on observe 2 à 3 vagues de croissance folliculaire pour 1 ou 2 follicules De Graaf de diamètre compris entre 10 et 27 mm. On observe couramment une ovulation unique (rarement deux) avec une fenêtre de fécondabilité de l'ovocyte de 8 à 24 heures. Le corps jaune présente un diamètre d'environ 22 mm.

##### *b. Caractéristiques de l'activité sexuelle mâle*

La migration des gonades se réalise à la 24<sup>ème</sup> semaine de gestation et la puberté est atteinte après 9 à 12 mois pour un poids testiculaire compris entre 200 et 500 grammes l'unité. La durée du coït est d'environ 10 secondes et permet l'éjaculation dans le vagin de 3 à 8 ml de sperme contenant de 4 à 8 milliards de spermatozoïdes d'une durée de vie de 30 à 48 heures dans les voies génitales femelles.

### *c. Caractéristiques de la gestation*

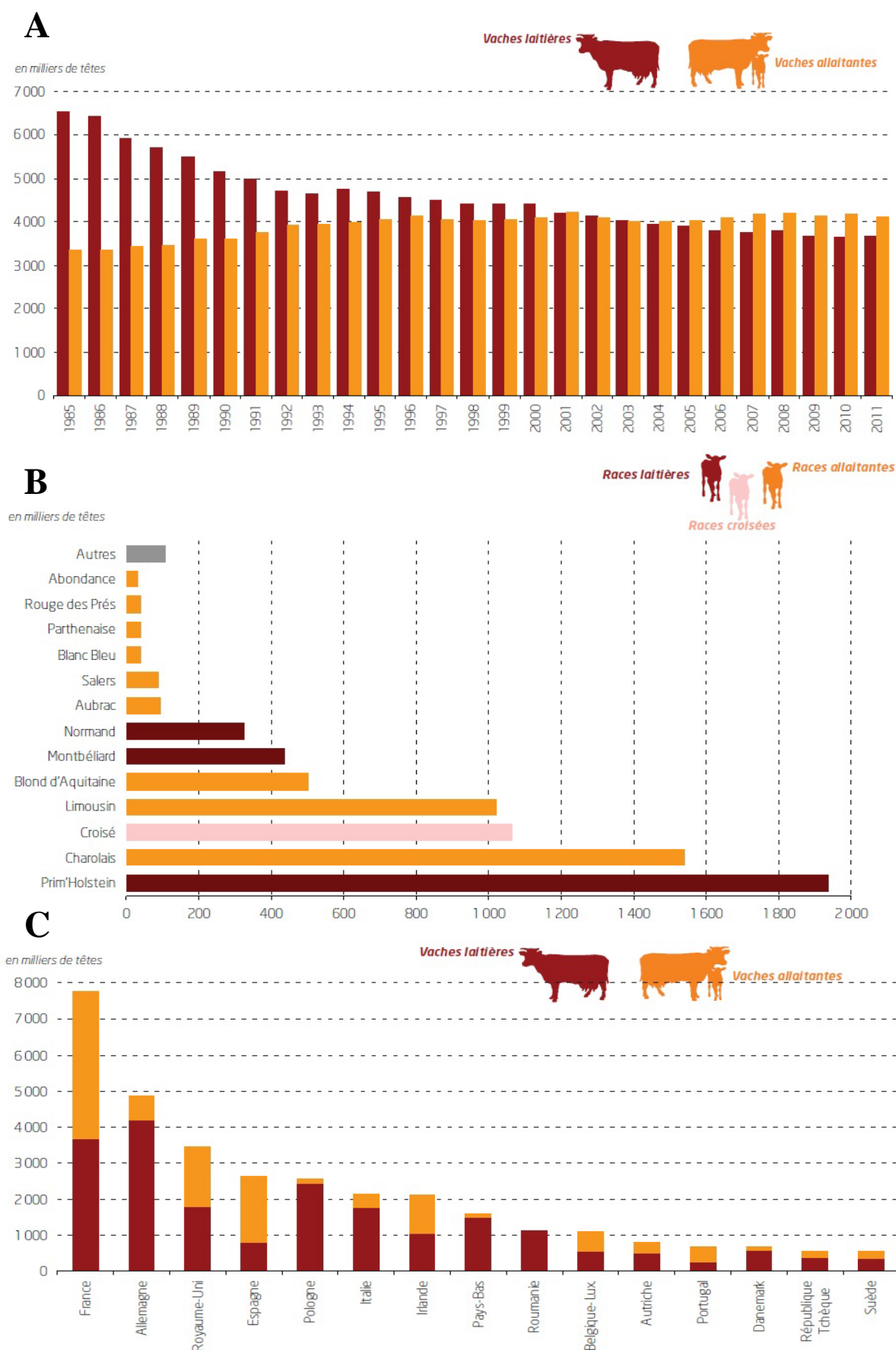
L'embryon entre dans l'utérus au stade 8-16 cellules trois ou quatre jours après l'ovulation mais l'implantation ne se réalisera que 30 à 40 jours après l'ovulation. Le placenta est syndesmochorial (morphologie cotylédonnaire). La gestation dure en moyenne 280 jours pour un seul petit (rarement deux) d'un poids compris entre 18 et 45 kilos (race-dépendant). La durée de lactation physiologique du petit est comprise entre 300 et 330 jours.

#### *1.2. Etat des lieux du cheptel bovin français*

Le cheptel français comporte environ 19 millions d'animaux répartis entre les espèces laitières et allaitantes. Composé majoritairement par des vaches laitières depuis des décennies, on observe depuis les années 2000 à une bascule du cheptel en faveur des vaches allaitantes (figure 16A). En 2011, 47 % des veaux nés en France sont de races allaitantes pour 39 % de races laitières.

La race Prim'Holstein est largement majoritaire au sein de cette production avec plus de 1,9 millions de bêtes, suivie de la race Charolaise avec 1,5 millions de bêtes et des races croisées et Limousine avec un million de bêtes. L'ensemble des autres races représentées en France présentent moins de 500.000 individus (figure 16B).

Cet ensemble classe la France au rang de premier pays producteur bovin d'Europe (figure 16C).



**Figure 16. Histogrammes de (A) l'évolution du cheptel bovin français de 1985 à 2011, (B) la répartition des races et (C) les productions bovines par pays (FranceAgriMer 2013).**

## 2. L'insémination artificielle

### 2.1. Présentation

La technique d'insémination artificielle (IA) consiste à déposer une quantité connue de spermatozoïdes à l'aide d'une gaine plastique fixée à un pistolet d'insémination, dans les cornes utérines au moment le plus approprié du sexe de la femelle. L'insémination animale est un secteur très dynamique, et la France est un pays leader dans ce secteur d'activité avec 5 millions de femelles inséminées chaque année, dans les espèces bovine, ovine et caprine et plus de 7 millions de doses de semence commercialisées, dont 2 seront exportées.

On estime que cette technique est utilisée au minimum depuis le XIV<sup>ème</sup> siècle, les éleveurs d'alors recherchant les deux principaux avantages toujours valables à l'époque moderne : améliorer la génétique des troupeaux par la diffusion de la semence des individus génétiquement intéressants et prévenir les maladies sexuellement transmissibles. La première insémination artificielle « moderne » est attribuée à Lauro Spallanzani qui, en 1779, obtient trois chiots après injection dans le vagin de sa chienne d'une préparation de sperme. Durant les 150 ans qui s'ensuivirent, la méthode se développa mais la technique demeura confinée aux centres d'expérimentation. C'est l'avènement d'une autre discipline, la cryobiologie, que l'IA pu prendre son essor. Entre 1930 et 1950, les cryobiologistes améliorèrent les taux de survie des cellules congelées grâce à l'utilisation d'agents chimiques et de protocoles de congélation rapides et novateurs. A partir de 1950, l'utilisation d'agents cryoprotecteurs (ACPs) et la compréhension de l'induction des dégâts lors du processus de congélation permit la transmission de l'IA sur le terrain et sa diffusion auprès des éleveurs. Depuis lors, l'utilisation de l'IA dans l'industrie bovine n'a cessé de croître puis de se généraliser à d'autres espèces (ovins, caprins, porcins, aviaires, équines, etc.).

### 2.2. Les bénéfices de l'IA

La sélection génétique associée au recours à l'IA est réelle et impacte directement le paysage bovin mondial (Foote, 1999). L'impact résulte du degré de supériorité génétique du taureau et du nombre de descendants obtenus par celui-ci qui sera intimement lié à la production totale de spermatozoïde de l'individu en question, avec jusqu'à 150.000 doses de semences obtenues par an pour les individus les plus fertiles. Les taureaux d'élites représentent environ 10% des animaux mais moins de 1% sont considérés comme des individus « stars » dont la semence est largement diffusée. Les objectifs premiers sont l'augmentation de la production des volumes de lait et de viande. Au-delà des taureaux à haute valeur génétique, la sélection permet la

conservation des races les plus utilisées dans le domaine de l'industrie tout en limitant la consanguinité (Locatelli et al., 2012), tout en sauvegardant les moins utilisées (Lauvie et Couix, 2012).


L'IA joue également un rôle au niveau sanitaire et participe à l'éradication de maladies. L'absence de coït élimine les maladies sexuellement transmissibles et l'hygiène imposée lors des manipulations lutte contre la propagation des maladies que la semence pourrait développer au contact de l'environnement extérieur à la cavité utérine. L'IA permet donc aux taureaux de bénéficier d'un contrôle sanitaire poussé et de diminuer l'incidence de maladies dont les principales sont le Bovine herpesvirus-12 (BHV-1), la brucellose, la leptospirose, la vibriose, la trichomoniose ou encore le virus de la maladie des muqueuses.

L'IA peut enfin être pratiquée en association avec d'autres techniques comme le sexage qui permettra aux éleveurs de donner un maximum de naissances du sexe désiré.

La France a réalisé plus de 7 millions d'IA en 2016, avec un coût moyen par technique de 54€ (Allice, Ministère de l'Agriculture Français). Même si cela est complexe à démontrer du fait des nombreux paramètres inhérents, il semble que les coûts liés associés à une période de saillie naturelle soient supérieurs à une période de temps équivalente d'IA suivie d'une période de reproduction naturelle (Vishawanath 2003). L'IA permet effectivement de supprimer les risques associés à la monte naturelle qui sont principalement une infertilité des taureaux (estimée supérieure à 15%), les maladies sexuellement transmissibles, l'absence de sélection génomique, les lésions et blessures associées au coït et les dégâts à l'environnement proche.

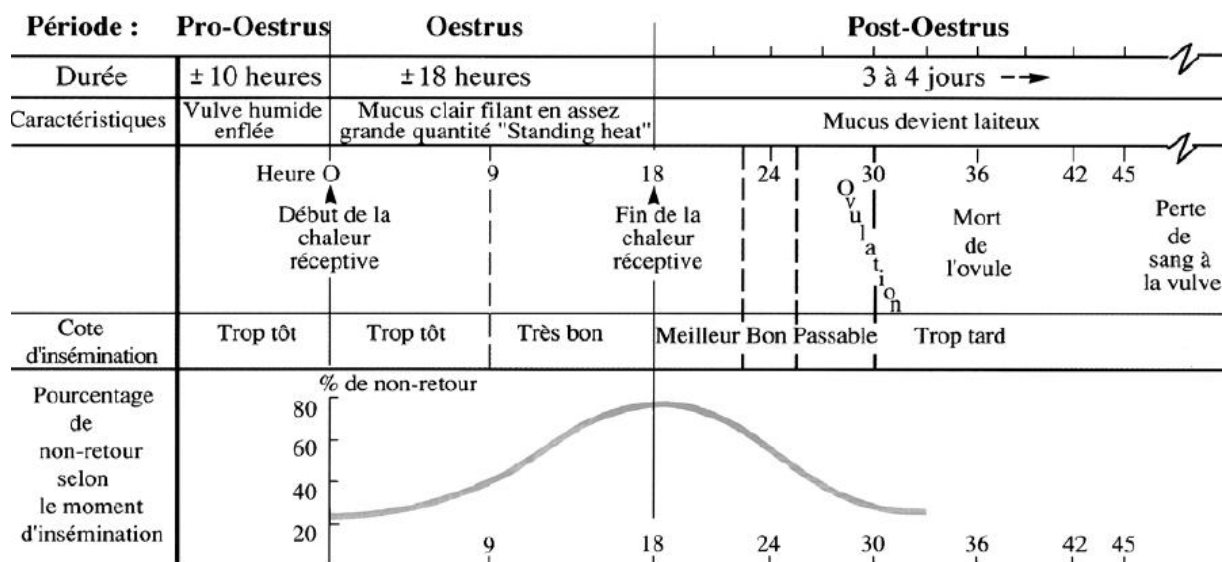
### 2.3. Les désavantages de l'IA

D'un point de vue technique, si l'IA a révolutionné la façon dont les éleveurs envisagent la reproduction, elle leur imposé une contrainte d'observation beaucoup plus présente qu'autrefois. En effet, l'observation du troupeau pour la détection des chaleurs est devenue un élément primordial dans la réussite des inséminations. Comme toute observation humaine, celle-ci est extrêmement chronophage pour l'éleveur et présente des parts d'incertitude et d'erreurs non négligeables.

Fréquence des observations (15 min./observation)	% de vaches détectées en chaleur
<b>3</b> : à l'aube, le midi & le soir	<b>86</b> 
<b>2</b> : à l'aube et le soir	81
<b>1</b> : à l'aube	50
<b>1</b> : le soir	42
<b>1</b> : le midi	24

**Figure 17. Influence de la fréquence des observations pour la détection des chaleurs.**

La fenêtre durant laquelle les résultats d'IA demeurent pertinents est d'une dizaine d'heure avec une fenêtre optimale très courte d'environ quatre heures. On comprend donc aisément l'importance de la qualité des observations quotidiennes. De nombreuses recherches s'attachent actuellement à élargir cette fenêtre optimale, soit via l'allongement de la durée de vie des spermatozoïdes, soit par une détection précoce des différentes phases du cycle.

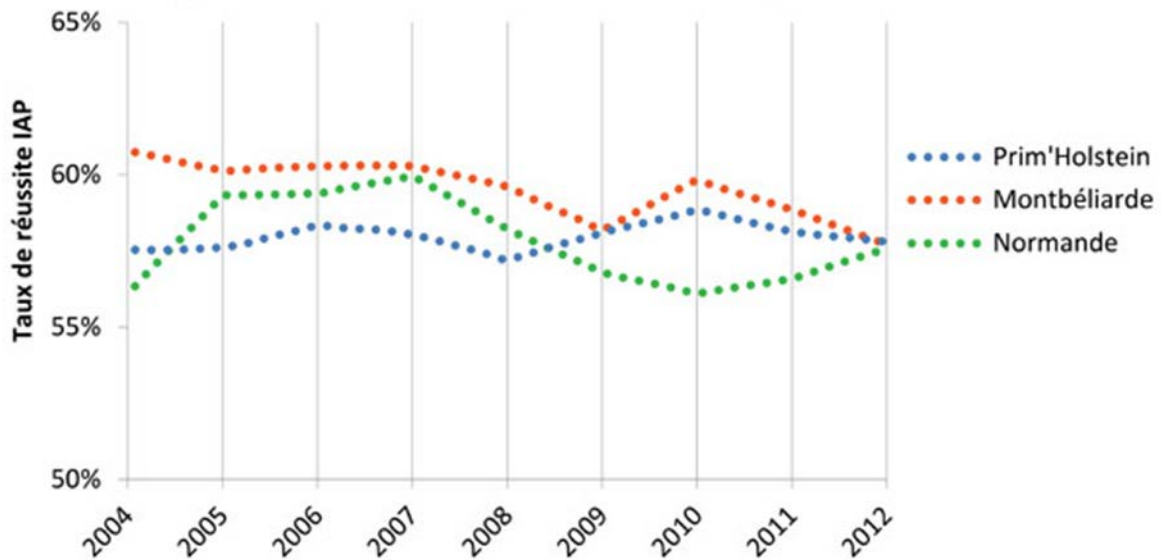


**Figure 18. Meilleure fenêtre pour l'insémination artificielle en fonction des différentes phases du cycle.**

Au-delà de l'aspect technique, la génétique peut également être un problème. Le suivi des animaux associé aux processus de sélection génétique doit être réalisé avec vigilance pour ne pas prendre le risque de diffuser des anomalies génétiques ou réduire le potentiel génétique de l'espèce. L'utilisation intensive de la semence des taureaux « stars » a mené à une augmentation significative des taux de consanguinité dans certaines espèces (Yue et al., 2015). Pour

minimiser ces phénomènes, le choix et le suivi des accouplements doit toujours être recensé et raisonné.

Même si aujourd'hui l'IA est bien maîtrisée, on assiste depuis une décennie à un plafonnement, voir une légère diminution du taux de non-retour en chaleur après insémination.



**Figure 19. Taux de réussite d'insémination artificiel de 2004 à 2012 chez trois espèces bovine (Prim'Holstein, Montbéliarde et Normande)**

Une amélioration de certains paramètres comme l'augmentation de la vitesse ou de la durée de vie du spermatozoïde intra-utéro pourrait apporter une innovation intéressante permettant d'améliorer les taux de succès. Une seconde phase est aujourd'hui engagée, avec un choix plus rationnel des femelles de haute valeur génétique. Cette sélection nécessite un recours aux biotechnologies de l'embryon.



### 3. Congélation de la semence

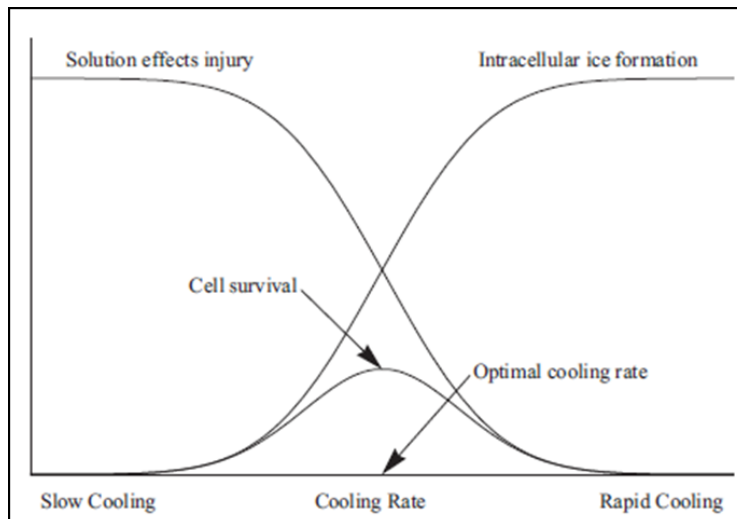
Dans l'élevage moderne, l'insémination artificielle (IA) est l'outil le plus largement utilisé pour faciliter l'utilisation et la distribution à grande échelle du sperme de taureaux génétiquement supérieurs. Le potentiel de l'IA ne saurait être pleinement exploré et atteint qu'avec un stockage et une distribution indéfinie de la semence, faisant de la cryoconservation un élément essentiel du processus. Bien que la cryoconservation des spermatozoïdes soit largement utilisée, les techniques de cryoconservation de la semence de taureau ont progressé lentement au cours des dernières décennies et sont actuellement assez normalisées. Les effets délétères de la cryoconservation sur la fonction et la fertilité des spermatozoïdes ont fait l'objet d'études approfondies chez de nombreuses espèces, en particulier chez le taureau.

#### 3.1. Les dégâts associés à la cryoconservation

##### *a. Effets négatifs de la cryoconservation*

La survie des spermatozoïdes lors de la cryoconservation dépend de plusieurs facteurs interdépendants : la qualité initiale du sperme, la composition du milieu, l'agent cryoprotectant (ACP) utilisé, le protocole de refroidissement, la qualité de l'emballage, la vitesse de décongélation et l'interaction de ces composants, sans oublier les potentielles variations interindividuelles des animaux (Cooter et al., 2005 ; Andrabi, 2007 ; Clulow et al., 2008). Malgré un degré de maîtrise certain, les processus de congélation et décongélation endommagent les spermatozoïdes en raison des changements de température, de l'induction de stress osmotique et de la formation de cristaux de glace (Samper et al., 1991 ; Cerolini et al., 2001). Malgré des courbes de températures optimales bien définies, on estime une perte de viabilité de la moitié des spermatozoïdes et une diminution de la capacité de fécondation de la moitié restante (Watson, 1995 ; Watson, 2000).

Les atteintes résultantes sont ultrastructuralles et métaboliques avec des altérations de la membrane plasmique, des acrosomes, de la fonction mitochondriale, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'intégrité de l'ADN. Cet ensemble induit entre autres, une réaction acrosomique et une capacitation (cryocapacitation) précoce, ainsi qu'une réduction de la mobilité et de la survie des spermatozoïdes (Chatterjee et al., 2001 ; Ho et al., 2002 ; Gillan et al., 2004 ; Dziekonska et al., 2009) ; Parks et Graham, 1992 ; Muller et al, 1999 ; Bailey et al, 2003).



**Figure 20.** Au fur et à mesure que la température diminue, des cristaux de glace extracellulaire commencent à se former à partir de l'eau super refroidie dans le milieu environnant. La formation de glace augmente la concentration des solutés dans l'extenseur, créant un gradient osmotique à travers la membrane et donc une déshydratation des spermatozoïdes (Watson, 2000 ; Andrabi, 2007). L'ampleur du flux d'eau provenant des spermatozoïdes dépend de la vitesse de refroidissement. Plus le taux est lent, plus le flux d'eau est important, et donc la déshydratation cellulaire. À des vitesses de congélation plus rapides, la probabilité de formation de glace intracellulaire augmente, causant des dommages physiques généralement mortels (Hammerstedt et al., 1990).

Les principaux contributeurs de la cryocapacitation sont le flux de cholestérol provenant du sperme et l'afflux d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  (Breitbart et al. 1984 ; Langlais et Roberts, 1985 ; Robertson et al. 1990 ; Bailey et Buhr, 1994 ; Bailey et al. 1994 ; Parrish et al. 1999). L'état mitochondrial du sperme est critique en raison de sa relation avec l'état énergétique et la motilité de la cellule et, par conséquent, a été lié à la fertilité (Mazur et al., 2000). La motilité des spermatozoïdes est importante pour le transport du site de l'éjaculation ou de l'insémination jusqu'au site de fécondation (Bilodeau et al., 2002). Les mitochondries, localisées dans le manchon mitochondrial de la pièce centrale, doivent produire de l'énergie (ATP) pour alimenter le mouvement flagellaire qui déplace les spermatozoïdes vers le site de fécondation (Benchaib et al., 2003 ; Agarwal et al. 2005). De plus, il a été suggéré que la glycolyse est critique pour les fonctions physiologiques du spermatozoïde (Turner et al., 2003). De même, des membranes plasmiques et des acrosomes intacts sont essentiels pour la capacitation des spermatozoïdes, la réaction acrosomique et, finalement, la fécondation de l'ovocyte. De plus, les dommages de l'ADN spermatique ont été corrélés à une variété de résultats cliniques défavorables (Mazur et

al., 2000 ; Aitken et al., 2004). Il existe également une corrélation négative entre le potentiel de la membrane mitochondriale et l'intégrité de l'ADN après la décongélation (Parks et al., 1992).

#### *b. Les espèces réactives de l'oxygène*

Les spermatozoïdes produisent spontanément une variété de ROS dont l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et l'oxyde nitrique (Aitken et al., 2009). De petites quantités de ROS sont fonctionnellement importantes pour conduire les cascades de phosphorylation de tyrosine associées à la capacitation des spermatozoïdes. Cependant, lorsque la production de ROS dépasse les défenses antioxydantes limitées du sperme, le stress oxydatif est induit, caractérisé par des dommages peroxydatifs à la membrane plasmique du sperme et la rupture des brins d'ADN dans le noyau du sperme. La congélation/décongélation conduit à la génération de ROS qui nuisent au potentiel de fécondation des spermatozoïdes en affectant leur mobilité, à l'intégrité de leurs membranes et leur potentiel de fécondation (Hu et al., 2010), mais aussi leur capacité à créer un embryon normal et sain (Aitken et al., 2009). Les espèces d'oxygène réactif (ROS) libérées par les spermatozoïdes morts ou mourants sont également préoccupantes en raison de leurs effets négatifs sur la sous-population de spermatozoïdes vivants dans la dose de sperme congelé (Kodama et al., 1996 ; de Lamirande et al. 1998 ; Upreti et al. 1998). La formation de ROS dans le sperme est aujourd'hui présentée comme une explication possible de la mauvaise qualité du sperme, aussi bien en frais qu'après traitement pour utilisation dans diverses techniques de reproduction (Guthrie et al., 2006).

### 3.2. Les cryoprotectants

La vitesse de congélation optimale est obtenue lorsque la descente en température est suffisante pour minimiser les effets des concentrations en éléments de la solution, mais également modérée pour minimiser la formation de cristaux de glace intracellulaires.

Pour contrer les dommages aux spermatozoïdes dus à la formation de cristaux de glace internes ou l'augmentation de la concentration en soluté dans le milieu, des agents cryoprotecteurs (ACP) sont ajoutés aux milieux de congélation (Aboagla et Trade, 2004 ; El-Harairy et al., 2011).

De nombreux ACPs sont référencés comme réduisant les effets néfastes de la cryoconservation : le glycérol, le jaune d'œuf, le citrate, le lait, la sérum-albumine bovine, l'alcool polyvinylique, les liposomes, des sucres dont le thréalose, le lactose et le saccharose ainsi que certains extenseurs de milieu d'origine végétale (Batellier et al., 2001 ; Meideros et

al., 2002). Ces ACPs protègent les spermatozoïdes du choc thermique, du stress osmotique, des altérations de la fluidité et de la perméabilité des membranes et fournissent des substrats énergétiques pour le métabolisme des spermatozoïdes (Medeiros et al., 2002 ; Barbas et Mascarenhas, 2009 ; Singh et al., 2012).

Le glycérol est l'ACP le plus utilisé pour le sperme de taureau car il est connu pour réduire efficacement les dommages mécaniques infligés aux spermatozoïdes pendant le processus de congélation (De Leeuw et al., 1995 ; Tasdemir et al., 2013).

Autrefois gold-standard, le jaune d'œuf est aujourd'hui de moins en moins utilisé car il présente un risque sanitaire de transmission d'agents pathogènes tels que : *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, des mycoplasmes ou encore la grippe aviaire (Thibier et Guerin, 2000). Les particules présentes dans le jaune d'œuf complexifient aussi l'évaluation et le contrôle de la qualité du sperme (Stradaioli et al., 2007).

La cystéine est un acide aminé non essentiel, piègeur de radicaux libres et molécule précurseur du glutathion qui pénètre facilement les membranes cellulaires (Sarıözkan et al., 2009a,b). Elle améliore la production intracellulaire de glutathion à la fois *in vivo* et *in vitro* (Malo et al., 2010 ; Tuncer et al., 2010) et prévient la perte de motilité des spermatozoïdes due au peroxyde d'hydrogène chez les taureaux (Bilodeau et al., 2001).

Enfin, des études s'attachent à remplacer les ACPs « traditionnels » par des ACP d'origine végétale, principalement sur des bases dérivées du soja (Muino et al, 2007 ; Arifiantini et Yusuf, 2010 ; Akhter et al., 2011, Pankaj, 2006 ; Kasimanickam et al., 2011 ; Singh et al., 2012).

## V. Les autres biotechnologies de la reproduction en élevage bovin

Dans ce chapitre nous allons parler des autres biotechnologies de la reproduction émergente dans l'élevage qui commence à remplacer ou améliorer les techniques conventionnelles. Il est important de noter que de nouvelles avancées technologiques sont nécessaires pour faire face aux défis croissants de productivités et de reproductions.

### 1. Encapsulation

Initialement, la technique d'encapsulation est née du souhait d'améliorer le temps de conservation possible des spermatozoïdes *in vivo* dans le modèle porcin mais est aujourd'hui appliquée à beaucoup d'autres modèles dont le bovin et l'humain (Herrler, 2006 ; Perteghella, 2017). Les objectifs de l'encapsulation sont de prolonger la durée de vie des spermatozoïdes à température corporelle et de permettre une libération progressive de spermatozoïdes viables sur une fenêtre temporelle la plus large possible (Perteghella, 2015).

Les spermatozoïdes bovins sont encapsulés sous forme de microbilles de 0,5 à 1,5 mm avec des concentrations comprises entre 40 et 200 millions de spermatozoïdes par millilitre. Divers polymères sont utilisés pour la création des capsules avec des résultats similaires même si les capsules à base de polydiallyl-diallyl-diméthyl-ammonium semblent être moins délétères pour la mobilité spermatique. Citons parmi les bases les plus utilisées les capsules en alginate de calcium, en chlorure de sulfate de cellulose, en sulfate de cellulose, en polylysine, en polyvinylamine ou encore en sulfate de protamine (Munkittrick, 1992 ; Nebel, 1994 ; Herrler, 2006 ; Spinaci, 2013 ; Vermeulen, 2017). Au-delà de son objectif de libération progressive, l'encapsulation préviendrait également une part du phénomène de cryocapacitation des spermatozoïdes lors de leur congélation et contribuerait ainsi à l'amélioration des taux de conception (Faustini, 2011).

Bien que prometteur, le principe de l'encapsulation chez le bovin n'a pas encore atteint le point où cette technique puisse être utilisée en routine, celui-ci se heurtant encore à des problèmes techniques (matériel non standardisé, techniques chronophages), économiques et physiologiques (allongement de la durée de vie du spermatozoïde, conservation d'une mobilité suffisante pour la fécondation). De plus l'efficacité de cette technique reste controversée, l'encapsulation augmenterait les dommages du spermatozoïde (Shahiduzzaman & Linde-Forsberg 2007) et n'augmenterait pas le taux de conception *in vitro* (Standerholen et al. 2015).

## 2. Microfluidique

La microfluidique est une discipline particulièrement dynamique du champ des nanotechnologies qui fonctionne sur des microsystèmes de manipulation de fluides simples ou complexes en utilisant des canaux de dimension de l'ordre de quelques dizaines de microns. Dans la reproduction des animaux d'élevage, elle est la source de nouvelles techniques ou de simplifications de techniques traditionnelles (McNeil, 2005 ; Selokar, 2014). A ce jour, la microfluidique autorise l'isolement et la manipulation des spermatozoïdes mobiles et des ovocytes (Beebe, 2002) en plus de son application directe pour le triage des spermatozoïdes et des embryons via la cytométrie en flux (Knowlton, 2015).

## 3. Sexage

La sélection du sexe de la descendance à l'aide de spermatozoïdes sexés est un avantage majeur pour les éleveurs (Johnson, 2000 ; Seidel, 2014) et a déjà été utilisée dans de nombreuses espèces domestiques (Campanile, 2011 ; Campanile, 2013 ; Gaviraghi, 2013 ; Warriach, 2015). Le tri des spermatozoïdes par sexe a pu être réalisé grâce à l'apport de la cytométrie en flux qui permet une séparation cytométrique des spermatozoïdes en fonction d'une analyse de marqueurs fluorescents. Deux marquages sont principalement utilisés pour distinguer les populations de spermatozoïdes porteurs de chromosomes X ou Y :

- un marquage avec le hoechst 33343 un marqueur de l'ADN avec une séparation sur l'intensité de fluorescence, la différence de taille entre les chromosomes X et Y étant suffisante pour discriminer ces deux populations ;

- un marquage avec une sonde couplée à un fluorochrome ciblant un locus sur le chromosome Y, la discrimination entre les populations s'effectuant alors sur la présence versus l'absence de fluorescence.

Les potentiels d'analyse et de tri de cet outil sont estimés respectivement à environ cent mille et soixante-dix mille spermatozoïdes à la seconde, soit un rendement de triage de quinze millions de spermatozoïdes par heure (Garner, 2006).

Le sexage de la semence présente de nombreux avantages. D'un point de vue génétique, cela permet d'améliorer les programmes de tests de la progéniture, de réduire les éventuelles maladies génétiques liées au sexe et de conserver les animaux supérieurs et rares. D'un point de vue économique-technique, cela permet d'augmenter la production de reproducteurs mâles dans les espèces allaitantes, et de femelles grandes productrices dans les espèces laitières, tout en permettant des taux de grossesse *in vivo* acceptables en insémination intra-utérine profonde (Blondin, 2009 ; Carvalho, 2010) bien que moindre qu'avec des paillettes de semence conventionnelle (DeJarnette, 2010).

Les limites associées au sexage sont principalement relatives à la technique dont la précision ne permet qu'environ 90% de prédiction de sexe juste chez les veaux (Garner, 2001), le fait que celle-ci soit chronophage en termes de paillettes produites par heure de fonctionnement et les dégâts que celle-ci inflige aux cellules. Les spermatozoïdes sexés sont caractérisés par une qualité moindre que leurs équivalents non sexés avec principalement des atteintes au niveau de la membrane qui influent sur leur état de capacitation, ce qui réduit leur durée de vie globale dans le tractus génital femelle (Gosalvez, 2011a ; Gosalvez, 2011b).

Plutôt que des gamètes, il est aussi possible de réaliser un sexage des embryons. Pour se faire, on réalise une aspiration cellulaire ou une biopsie d'une petite dizaine de cellules du trophectoderme de blastocystes à sept jours après la fécondation (Thibier, 1995). La détermination du sexe est alors réalisée par l'association d'une sonde ADN spécifique au chromosome Y avec, soit une amplification en réaction en chaîne par polymérase (PCR), soit une hybridation *in situ* fluorescente (FISH). Il est également possible de détecter l'antigène H-Y embryonnaire par la technique d'amplification isotherme à médiation en boucle et d'un test basé sur une PCR duplex. L'avantage de ces techniques sont leurs précisions supérieures à 95%, mais elles ne sont aujourd'hui utilisées que ponctuellement sur des problématiques précises car elles impliquent un coût, un temps et une expertise extrêmement élevés (Rao, 1993 ; Sood, 2001 ; Zoheir, 2010).

#### 4. Recherche de marqueurs

Les éleveurs sont constamment à la recherche de marqueurs qui pourraient leur permettre d'améliorer leurs rendements. Identifier des marqueurs de fertilité chez les mâles se traduirait

par des taux de gestation plus élevé et donc un nombre de veaux plus important (Peddinti, 2008). Un certain nombre de marqueurs de biomarqueurs ont déjà été identifiés, avec des corrélations plus ou moins importantes avec la fertilité de la descendance, dont la protéine PDC-109 du plasma séminal (Harshan, 2009 ; Srivastava, 2013), les protéines de liaison héparine-gélatine (Arangasamy, 2005), la spermadhesine Z13 (Kwon, 2015), la clusterine (Milardi, 2012) ou encore les phospholipases A2 du plasma séminal bovin (Waheed, 2015).

Le profilage des profils transcriptomiques en micro-array et les technologies de séquençage ont révélé des différences d'expression entre les profils de taureaux normaux, sub-fertiles et super-fertiles. Dans les populations les plus fertiles, des expressions élevées de transcrits ont été retrouvés pour la molécule CD36 de la protamine 1, de la caséine bêta 2 et du récepteur de la thrombospondine (Srivastava, 2008 ; Feugang, 2010) qui pourrait également servir de marqueur de fertilité si les coûts des techniques associées venaient à décroître (Bissonnette, 2009 ; Miller, 2014).

Au-delà des puces micro-array, les évolutions des techniques de transcription différentielle inversée de l'affichage - PCR, des bibliothèques d'ADNc soustractives, et de la PCR quantitative en temps réel, permet depuis peu à des équipes d'étudier les profils l'expression des gènes des embryons à différents stades de développement dans des conditions environnementales naturelles ou altérées (Graf, 2014). Le but de ces études est d'obtenir une vue d'ensemble des modèles d'expression de l'ARNm tout au long du développement embryonnaire précoce, et de déduire de potentiels marqueurs qualitatifs via l'analyse des événements associés à l'activation et le développement du génome embryonnaire, la différenciation précoce, l'implantation ou le développement foetal (Graf, 2014).

Bien que peu de marqueurs aient pu être validés sur le terrain à cause des énormes investissements que cela implique, un certain nombre a d'ores et déjà pu être identifié : le transporteur de glucose de type 1, la protéine de choc thermique HSPA-1A, MATER, ZG1, le facteur de croissance et différenciation GDF9, le facteur inhibiteur de la leucémie, et BMP15 (Niemann, 2000 ; Latham, 2001 ; Nath, 2013 ; Eswari, 2013).



## 5. Biocapteurs

Un biocapteur est un nanosystème qui utilise une ou des réactions biologiques pour détecter ou quantifier un composé biologique cible. Ce type de système se base sur la réaction du composé analysé avec un analyte puis sa reconnaissance spécifique par transducteur qui transforme cette bio-reconnaissance en un signal physique identifiable ou mesurable. En élevage bovin, des biocapteurs sont utilisés pour la détection des chaleurs avec l'insertion sous-cutanée de nanotubes qui réagiront aux fluctuations des taux d'œstradiol dans le sang. En utilisant des biocapteurs hormonaux spécifiques, la limite de détection des oestrogènes est de l'ordre du picogramme contre une détection de FSH et LH de l'ordre du nanogramme (Rishpon, 1997). Ces biocapteurs restent à l'heure actuelle réservés à un élevage d'élite à cause des exigences financières et temporelles associés à cette technologie.

## 6. Modifications génétiques

Dans le but de multiplier certains animaux d'élite avec une variation génétique minimale, certains éleveurs utilisent la technique du transfert nucléaire (Abdoon, 2012 ; Singla, 2015). Des blastomères d'embryons multicellulaires ou des cellules somatiques sont micro-injectés dans des ovocytes énucléés qui se développeront en un nouvel embryon suite à la reprogrammation du noyau de la cellule initiale (Tesfaye, 2004). Le transfert nucléaire est utilisé dans le modèle bovin pour la propagation de génotypes précieux, pour induire des modifications génétiques et pour produire des animaux transgéniques (Verma, 2012). La production de veaux sains créés via transfert nucléaire a été rapportée par plusieurs équipes dont un veau produit à partir de cellules somatiques adultes prises sur la queue d'un taureau de qualité génétique supérieure (Vajta, 2006 ; Campbell, 1996 ; Shah, 2008 ; Shah, 2009). A l'avenir, le transfert nucléaire pourrait transformer entièrement l'ensemble des procédures d'élevage conventionnelles en permettant la création de milliers de duplicatas d'animaux génétiquement modifiés. De très nombreuses applications pourraient découler de la propagation de ces techniques : conservation et propagation d'espèces menacées ; outil de production de cellules souches pour le clonage thérapeutique ; régénération tissulaire ; développement de cellules souches ciblées pour la thérapeutique ; modification des résistances à la chaleur ou aux maladies (Verma, 2012).

Le développement des techniques de transgénisme, permet aujourd'hui de créer des animaux transgéniques transportant de l'ADN recombinant injecté dans leur génome (George 2011). Le gène transféré se compose de deux parties: une partie fonctionnelle et une région promotrice

pour exécuter la fonction dans l'hôte de transfert. La transgénèse a été réalisée dans de nombreux modèles animaux dont le bovin [80]. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour le transfert de gènes, à savoir la micro-injection pro-nucléaire, les vecteurs à base de rétrovirus, la micro-injection cytoplasmique, le transfert d'ADN à des embryons ou à des cellules ES par l'intermédiaire de vecteurs rétroviraux, le transfert de gènes médié par les spermatozoïdes et l'interférence ARN. Les animaux transgéniques possèdent alors un caractère quantitatif ou qualitatif amélioré qui sera exploité en reproduction ou en tant que bioréacteur (Wall, 1996 ; Niemann, 2003). Parmi les réussites de l'utilisation du modèle bovin en tant que bioréacteur, citons entre autres la production de protéines recombinantes humaines dans les glandes mammaires (Robl, 2007 ; Verma, 2008), et la production de lait contenant de l'hormone de croissance humaine, une forte teneur en caséine, de l'hémoglobine humaine, de l'antithrombine III et de l'anti-trypsine dans le lait (Niemann, 2003). Les facteurs limitants du transgénisme comprennent la nécessité d'une instrumentation sophistiquée, un coût et une expertise énorme, et un taux de grossesse après transfert embryonnaire très faible en raison de la modification appropriée du génome (Wells, 2010 ; Ebert, 1991).

# Objectifs

## VI. Objectifs scientifiques de l'étude et contexte de recherche

L'innovation dans le monde agricole est non seulement un moteur qui permet d'améliorer la performance tout en diminuant les coûts, mais aussi une nécessité afin d'adapter l'agriculture aux défis environnementaux et aux changements climatiques à venir. L'élevage est aussi concerné par ces objectifs, et l'innovation est nécessaire dans cette filière. Dans le cadre d'une amélioration permanente des pratiques d'élevage, la société IMV-Technologies et l'équipe de recherche GETI de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences se sont associées pour créer un laboratoire commun centré sur l'amélioration de la procréation médicalement assistée chez le bovin. Ce laboratoire commun basé sur le développement d'une plateforme de « fécondation *in vitro* bovine » permet de développer de nouveaux savoir-faire et de nouvelles molécules immédiatement applicables au marché de l'élevage.

C'est dans ce cadre que j'ai réalisé mon stage de l'EPHE au sein de l'équipe GETI et dans le laboratoire commun IMV-Technologies – UGA.

L'insémination artificielle (IA) est la principale méthode de reproduction utilisée chez l'espèce bovine dans le monde entier. Cette technologie de reproduction médicalement assistée présente plusieurs avantages, dont la sélection génétique rapide des meilleurs éleveurs. Par conséquent, la production laitière par vache a énormément augmenté au cours des 40 dernières années. Néanmoins, une diminution simultanée de la performance reproductive a été observée dans de nombreux pays, avec une baisse du taux de grossesse de 65 % en 1951 à 40 % en 1996 (Butler, 1998). La tendance se poursuit et une étude récente a recensé 9 millions de cas d'IA chez les vaches Holstein aux États-Unis et a révélé un taux de gestation actuel d'environ 32 % (Norman et al, 2009). Toute amélioration de la technologie pourrait donc avoir un impact significatif. Un facteur essentiel pour la réussite de l'IA est le timing de la livraison des spermatozoïdes, qui doit être optimisé par rapport à l'ovulation. Les ovocytes non fécondés ont une durée de vie très limitée, engageant l'apoptose quelques heures seulement après l'ovulation, ils doivent donc être fécondés très rapidement après l'ovulation (Fissore et al, 2002). Cependant, les spermatozoïdes doivent compléter leur capacitation (étape de maturation obligatoire) à la jonction utéro-tubale avant d'atteindre le point de fécondation situé à l'intérieur de l'oviducte supérieur. Ce processus, nécessaire pour obtenir des spermatozoïdes compétents, signifie que l'insémination doit avoir

lieu avant l'ovulation. Cependant, la durée de vie des spermatozoïdes dans le tractus génital féminin est limitée, et il est donc admis que l'IA ne doit pas être exécutée plus de 6-24 heures avant l'ovulation (Dorsey et al, 2011). Pour ces raisons, la détection de l'ovulation est un paramètre clé pour le succès de l'IA. Bien qu'un certain nombre de technologies efficaces aient été mises au point pour détecter avec précision l'ovulation, de nombreux agriculteurs continuent d'utiliser des indicateurs de comportement tels que la montée, le renfilage et/ou le comportement agressif pour détecter l'ovulation (Reith & Hoy, 2017). Ces indicateurs sont simples et peu coûteux à détecter pour les agriculteurs, mais ils restent longs et imprécis, ce qui entraîne une synchronisation sous-optimale de l'IA et une diminution des taux de grossesse. Par conséquent, la durabilité économique des fermes laitières est affectée. Prolonger la durée de vie des spermatozoïdes dans le tractus génital féminin, c'est-à-dire dans le liquide utérin riche en protéines et à 38,5°C, conditions qui déclenchent la capacitation, pourrait être une approche intéressante pour prolonger la durée de la fenêtre d'action pour l'interaction ovocyte et spermatozoïdes.

Un autre paramètre important est à prendre en compte : la mobilité du spermatozoïde, paramètre clé de la fécondation. La fécondation des mammifères se produit profondément dans le tractus femelle, près du point de libération des ovocytes et les spermatozoïdes, qui sont libérés dans le vagin, doivent atteindre le point de rencontre en nageant à travers le tractus femelle. De plus, la mobilité est également indispensable pour que les spermatozoïdes traversent les couches protectrices entourant les ovocytes. Enfin, le battement du flagelle du sperme est également essentiel pour la fusion des gamètes (Ravaux et al., 2016). La mobilité est donc cruciale pour que les spermatozoïdes délivrent leur ADN dans l'ovocyte. Par conséquent, toute perturbation de la mobilité a un fort impact sur la fécondation et conduit à la sous-fertilité ou à l'infertilité. Il a été clairement démontré que le pourcentage de conception dépend du nombre de spermatozoïdes mobiles (Publicover et Barratt, 2011) et pour ces raisons, la mobilité des spermatozoïdes est systématiquement évaluée dans un contexte d'infertilité de couple. Les spermatozoïdes présentant une absence ou une faible mobilité, une condition connue sous le nom d'asthénozoospermie, est une cause importante d'infertilité de couple et représente environ 20% des défauts observés (Thonneau et al., 1991 ; Curi et al., 2003).

Malgré le développement de l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI), permettant de traiter même les patients présentant une immobilité complète du sperme (Wambergue et al., 2016), la mobilité du spermatozoïde reste un paramètre important dans les technologies de procréation assistée. La découverte d'un médicament capable d'augmenter

efficacement la mobilité spermatique serait d'abord essentielle dans le domaine de la cryoconservation. En effet, le traitement à très basse température diminue la mobilité des spermatozoïdes congelés-décongelés et entrave ainsi leur capacité à féconder avec succès les ovocytes dans l'insémination artificielle (IA) ainsi que dans la fécondation in vitro (FIV). Un tel médicament, capable d'améliorer la mobilité des spermatozoïdes congelés-décongelés, améliorerait également le succès de l'IA dans la procréation assistée bovine. Un tel médicament serait également intéressant pour le bétail, où l'IA utilise du sperme congelé, obligeant les centres d'IA à augmenter la concentration de sperme dans les paillettes pour contourner la diminution de la mobilité des spermatozoïdes, réduisant ainsi le succès global de la méthode.

Mes objectifs ont donc été de caractériser deux molécules différentes, la première augmentant la durée de fécondabilité des spermatozoïdes et l'autre la mobilité des spermatozoïdes

# Matériel & Méthodes

## VII. Matériel et Méthode

### 1. Analyse CASA

Pour analyser la mobilité spermatique nous avons utilisé le système CASA (Computer Assisted Semen Analysis) CEROS version 12. Celui-ci est composé d'un microscope à contraste de phase équipé d'une caméra reliée à un poste informatique muni d'un logiciel d'analyse dédié. Cet ensemble nous permet d'observer la course des spermatozoïdes et d'enregistrer de façon précise les trajectoires de plusieurs dizaines d'entre eux simultanément.

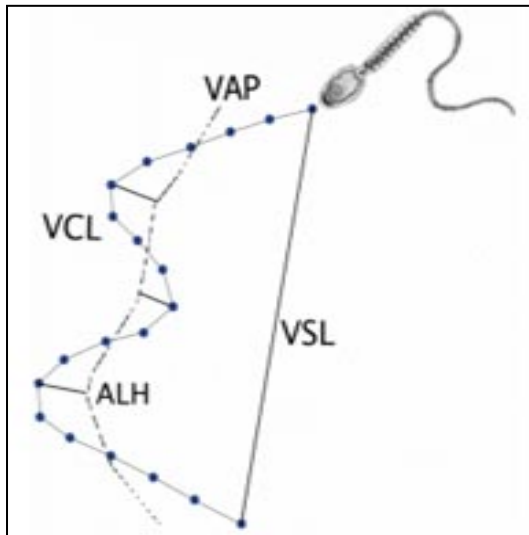


*Figure 21. Modèle d'automate CASA*

L'acquisition des champs est réalisée par la caméra, associée à un effet stroboscopique de fréquence calibrée. Le contraste de phase va permettre de faire ressortir la tête des spermatozoïdes à l'image, que le logiciel va repérer selon des données espèces-dépendantes de taille, d'intensité et de contraste, pré-intégrées au logiciel. Cela va nous permettre d'obtenir une analyse du déplacement des têtes des spermatozoïdes. Les trajectoires de la tête ainsi obtenues vont nous permettre de calculer un certain nombre de paramètres :

- La vitesse curvilinéaire ou VCL, trajectoire réelle.
- La vitesse moyenne ou VAP, trajet moyen.
- La vitesse en ligne droite ou VSL, distance entre les points de départ et d'arrivée.
- L'amplitude latérale de la tête ou ALH, distance entre la position réelle de la tête du spermatozoïde et la position moyenne.





*Figure 22. Représentation des différentes trajectoires de la tête obtenue par analyses de l'automate CASA*

Le logiciel permet également de discriminer, par un certain nombre de "cut-offs" dans les paramètres, différentes populations de spermatozoïdes présentes dans l'échantillon et de les quantifier (immobiles, mobiles, progressifs, hyperactivés).

Les échantillons sont divisés en deux échantillons de même volume. Un est traité et l'autre servira de contrôle. Pour l'échantillon traité nous ajoutons un certain volume de peptide (naturel ou synthétique) préalablement dissous dans de l'eau ultra-pure. Un volume équivalent d'eau ultra-pure sera ajouté pour l'échantillon contrôle. Les deux échantillons sont ensuite incubés pendant des temps variés (de 10 min pour les tests standards à 240 min pour le dernier effet observé) et les paramètres de mobilité sont ensuite enregistrés. Après incubation, les spermatozoïdes en suspension sont immédiatement placés dans une chambre d'une profondeur de 100  $\mu\text{m}$  pour l'espèce murine et de 20  $\mu\text{m}$  pour l'humain, le primate non humain et le bovin. La chambre est conservée à 37°C lors de l'expérimentation. Les paramètres de mobilité spermatique sont mesurés à 37°C en utilisant un logiciel d'analyse spermatique (Hamilton Thorne Research, Beverly). Les configurations employées pour cette analyse pour l'humain, le primate non-humain, le bovin et le murin sont respectivement :

Taux d'acquisition : 60; 60; 60; 60 Hz; Nombres d'images : 30; 20; 30; 45; contrast minimum: 80; 80; 80; 50; taille minimum des cellules: 3; 4; 5; 5; low static-size gate: 0.85; 0.79; 0.1; 0.3); high static-size gate: 4.24; 2.52; 3.4; 1.95; low static-intensity gate: 0.39; 0.62; 0.3; 0.5; high static-intensity gate: 1.4; 1.4; 1.7; 1.3; minimum elongation gate: 0; 2; 8; 0; fenêtre d'élongation maximum: 85; 50; 97; 87; facteur de magnitude: 1.89; 1.89; 1.89; 0.7. Les paramètres de

mobilité mesurés sont la vitesse curvilinéaire (curvilinear velocity, VCL) et l'amplitude latérale de la tête (amplitude of lateral head displacement, ALH). Un minimum de 100 spermatozoïdes mobiles est analysé lors de chaque essai. Les spermatozoïdes sont évalués mobiles par VAP>1; 1; 1; 1 et mobiles progressifs par VAP>25; 25; 50; 30 et STR>80; 80; 70; 70.

## 2. Récupération des spermatozoïdes

### a. Bovin

Chez le bovin, deux types de préparations sont utilisés : spermatozoïdes congelés en paillette et spermatozoïdes épидидymaires frais.

Les testicules sont récupérés dans un abattoir et les spermatozoïdes épидидymaires sont extraits moins de trois heures après la mort de l'animal. Les spermatozoïdes épидидymaires sont collectés dans du sp-TALP, un milieu de survie.

### b. Humain

Le sperme est obtenu des patients consultants au département d'infertilité de Grenoble. Les patients ont été informés des visées de l'étude et ont signé un consentement. Toute utilisation est conforme à la déclaration d'Helsinki 1975 sur l'expérimentation humaine. Le comité scientifique Germethèque approuve la méthode utilisée lors de cette étude. Le sperme éjaculé récupéré est liquéfié à 37°C pendant 30 min, le sperme est ensuite lavé deux fois dans du Sperm Preparation Medium (SPM, Origio, Malov, Danemark) à 500 G pendant 5 minutes. La concentration en spermatozoïde est ensuite ajustée pour l'analyse CASA. Le sperme est aussi congelé dans du Spermfreeze (Fertipo NV, Beernem, Belgium) pour des analyses futures. Tous les patients de cette étude ont consulté pour des problèmes d'infertilités de couple et nous avons utilisé les patients avec les paramètres morphologiques dans les normes selon la guideline WHO2010 (OMS 2010).

### c. Primate non-humain

Les testicules de primate récupérés proviennent d'individus de l'espèce *Maccaca mulatta* âgés de 4 à 6 ans. Ils sont euthanasiés dans le but d'une autre étude à MIRcem CEA/Inserm U986 Fontenay au Rose en France. Ces animaux n'ont reçu aucun traitement altérant la spermatogenèse. Les testicules (avec épидидyme) nous sont délivrés à 4°C dans les 24H après la mort de l'animal. Les spermatozoïdes épидидymaire sont collectés par dilacération dans du SPM et les spermatozoïdes testiculaires sont récupérés dans du DMEM High Glucose. Les spermatozoïdes épидидymaires sont lavés deux fois dans du SPM à 500 G pendant 5 minutes et séparés par une méthode de swim up (30 min à 37°C) la fraction supérieure est ensuite lavée

deux fois à 500 G pendant 5 minutes. Les spermatozoïdes epididymaires sont aussi congelé avec du Spermfreeze pour un usage futur.

#### d. Murin

Une souris OF1 est sacrifiée par dislocation cervicale puis une extraction des spermatozoïdes épидидymaires est réalisée en milieu M2 (milieu commercial murin non capacitant). Un swim up de dix minutes est réalisé à 37°C et comme précédemment, deux lavages par centrifugation de cinq minutes à 500 g en M2 sont effectués. La concentration est vérifiée puis ajustée si besoin pour correspondre à la densité souhaitée pour l'analyse CASA.

#### 3. Origine du venin

Le venin a été obtenu auprès des laboratoires Alphabiotoxine ou Venomtech. Dix mg du venin lyophilisé ont été dissous dans 500 µL de 100mM d'acétate d'ammonium Ph 6.8 et centrifugé à 10 000 G pendant 10 minutes. Deux cent cinquante µL sont gardés pour une prochaine purification.

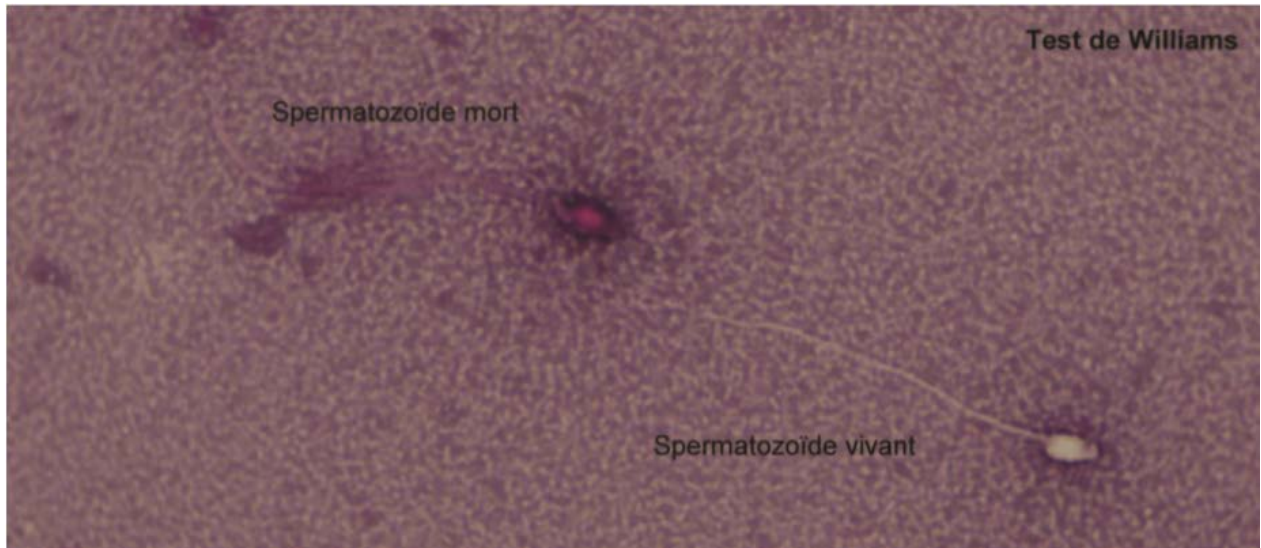
#### 4. Vitalité des spermatozoïdes

Le test de Williams permet de différencier les spermatozoïdes vivants des spermatozoïdes morts.

- Eosine 1% : Diluer 0,15 g d'éosine Y Sigma (Réf : E6003) dans 15 ml de solution de NaCl à 9 ‰. Conservation à température ambiante. Péréemption : 1 an.
- Nigrosine 10% : Diluer 1,5 g de Nigrosine Sigma (Réf : N4754) dans 15 ml de solution de NaCl à 9 ‰. Conservation à température ambiante. Péréemption : 1 an.

Dans un tube à hémolyse ou un tube eppendorf, mélanger 40 µl de la solution contenant les spermatozoïdes à 20 µl d'éosine à 1% et 20 µl de nigrosine à 10%. Si l'analyse concerne des spermatozoïdes murins et que l'homogénéisation est réalisée au cône, celui-ci doit être coupé pour ne pas déstructurer les spermatozoïdes. Prélever sans attendre 1 goutte de ce mélange, faire deux frottis sur des lames identifiées et sécher rapidement les lames à l'air. Les frottis doivent être « tirés » à la façon d'un frottis sanguin, sans qu'aucune pression ne soit exercée sur l'échantillon. Lire immédiatement à l'objectif x 100 à l'immersion.

Compter 100 spermatozoïdes en différenciant les spermatozoïdes vivants des spermatozoïdes morts. Les spermatozoïdes morts sont colorés en rose, les spermatozoïdes vivants ne fixant pas le colorant restent blancs (figure 23). Les spermatozoïdes ayant une bordure post acrosomale rose sont considérés comme morts même si le reste de la cellule est incolore. Le résultat est exprimé en pourcentage de spermatozoïdes vivants.



**Figure 23.** Test de Williams sur spermatozoïde humain La tête des spermatozoïdes morts apparaît en violet et la tête des spermatozoïdes vivants apparaît en blanc.

## 5. Fécondation *in vitro* chez le modèle bovin

### 5.1 Solutions stocks

Milieu PHE (IVF-TALP) Penicillamine – Hypotaurine – Epinephrine :

- Penicillamine (P-5000 à 4°C). MM: 185,7. Dissoudre 0.003791g dans 10ml de saline (2mM solution)

- Hypotaurine (H-1384). MM: 109,1. Dissoudre 0.00109g dans 10ml de saline (1mM solution)

- Epinéphrine (E-4250 à 4°C). Il faut dissoudre l'épinéphrine avec une solution de Na-Lactate-Na-Metabisulfite. Dissoudre 125µl de Na-Lactate (L-7900 à 4°C) et 0.05g de Na-Metabisulfite (S-1516 à 4°C) dans 50ml de DPBS (D-5652 à 4°C).

Dissoudre 0.00183g d'épinéphrine dans 40ml de la solution de lactate-métabisulfite (250µM solution). A conserver à l'obscurité.

Mélanger 10ml de P avec 10ml de H, 4ml de E et 16ml de DPBS (D-5652). Bien mélanger, filtrer (0,22 $\mu$ m) et faire des aliquots de 100 $\mu$ l à conserver ad vitam à -20 $^{\circ}$ c.

*Solution stock sodium pyruvate 20mM (OMM, sp-TALP+ et IVF-TALP) :*  
Dissoudre 0,055g de Na pyruvate (P-5280) dans 25ml d'eau ultrapure (solution 20mM). Filtrer 0,22 $\mu$ m. Conserver à 4 $^{\circ}$ c pendant un mois.

*Solution stock cysteamine 100mM (OMM) :*

Dissoudre 11,573mg de cysteamine (Sigma, 30070) dans 1,5ml d'eau stérile. Conserver à 4 $^{\circ}$ c pour deux semaines.

*Stock HEPES 1M (OCM) :*

Dissoudre 23,8g HEPES dans 100ml d'eau ultrapure pour solution 1M. Ajuster le pH à 7. Filtrer 0,22 $\mu$ m. Conserver à 4 $^{\circ}$ c pendant des années.

*Stock Glutamine 200mM (OCM+) :*

Dissoudre 5,55g (MW:146,14) dans 200ml d'eau ultrapure. Filtrer à 0,22 et aliquoter en 1ml conservable plusieurs mois à -20 $^{\circ}$ c.

*Solution stock Héparine 20mM (sp-TALP-H) :*

Dissoudre 2mg d'héparine (Sigma, H3393) dans 1ml d'eau stérile et aliquoter en tubes de 50 $\mu$ l. Conserver à -20 $^{\circ}$ c pour un an.

*Stock Héparine (IVF-TALP) :*

Dissoudre 10000U dans 10ml d'eau ultrapure. Filtrer à 0,22 et aliquoter en 100 $\mu$ l conservable plusieurs mois à -20 $^{\circ}$ c.

*Stock EGF 1mg/ml (OMM+) :*

Dissoudre 2mg d'EGF (E9644) dans 2ml d'eau stérile. Aliquoter en tube de 25 $\mu$ l et conserver à -20 $^{\circ}$ c des années.

*Stock PMSG-HCG 1UI/ $\mu$ l (OMM+) :*

Diluer la PMSG et l'HCG dans de l'eau ultrapure de façon à obtenir une dilution de 1UI/ $\mu$ l (pour les deux produits). Conserver à -20 $^{\circ}$ c pour un an.

*Solution saline :*

Préparez 1L de solution saline 0,9%NaCl (9g NaCl / 1L H<sub>2</sub>O) et séparez-le en trois : 200ml dans une bouteille de 500ml et deux fois 400ml dans deux bécher de 1L.

**Milieu de survie (non capacitant) des spermatozoïdes bovins**

<b>Milieu sp-TALP-</b>	<b>Référence</b>	<b>MM</b>	<b>[mM]</b>	<b>Vol ume pour 1L</b>
NaCl	Sigma, S-7653	58.45	114.0	6.66g
KCl	Normapur, 26764.298	74.55	3.2	0.23g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Normapur, 28015.294	138.0	0.3	0.041g
Na Lactate 60% (4°C)	Sigma, L-1375	112.06	10.0	849µl
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	Normapur, 25108.295	203.31	0.5	0.101g
HEPES	Sigma, 3375	238.30	10	2.383
		5		
NaHCO <sub>3</sub>	Normapur, 27778.293	84.0	25.0	2.1g
Na Pyruvate	Sigma, P-5280	88.062	1	0.088g
Gentamicine	Sigma, G-1397	-	50µg/ml	1ml
Ajuster à pH 7.4 (≈100µl HCl), filtrer 0,22µm et conserver à 4°C pour 3 mois.				

**Milieus de capacitation des spermatozoïdes avec/sans héparine :**

<b>Milieu sp-TALP+</b>	<b>Référence</b>	<b>MM</b>	<b>[mM]</b>	<b>Volume</b>
SP-TL	-	-	-	10ml
BSA	A-9647 (4°C)	-	6mg/ml	0,06g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	Normapur, 22317.297	147	2	0.0029g
Ajuster à pH 7.4, filtrer 0,22µm et conserver à 4°C pour 1 semaine.				

<b>Milieu sp-TALP-H</b>	<b>Référence</b>	<b>MM</b>	<b>[mM]</b>	<b>Volume</b>
SP-TALP+	-	-	-	10ml
Héparine stock 20mM	H-3393	-	2µg/ml	10µl
Filtrer 0,22µm et conserver à 4°C pour une semaine.				

### Milieux de collecte des ovocytes :

Milieu OCM	Référence	MM	[C]	Volume
Ultrapure water	-	-	-	1L
TCM-199	Sigma, M-0393 (w/ glutamine, Hank's salts and without sodium bicarbonate)	-	-	1 fiole
PVA	Sigma, P-8136	-	1% wt/v	1g
NaHCO <sub>3</sub>	VWR, Normapur, 27778.293	84.01	4.2mM	0.35g
Hepes	Sigma, 3375	238.30	10.0mM	10ml
Ajuster à pH 7.3, filtrer 0,22µm et conserver à 4°C pour 3 mois.				

OCM+	Référence	Concentration	Volume
OCM stock	-	-	100ml
Glutamine	Life Technologies, 25030-032	2mM	1ml
Pen/Strep	PAA, P11-010	50IU/ml ; 50µg/ml	500µl
Placer à 38,5°C tube fermé.			

### Milieu de maturation des ovocytes :

Milieu OMM	Référence	Concentration	Volume
Medium 199 (4°C)	Life Technologies, 31150-022	-	8,8ml
Glutamine 200mM	Life Technologies, 25030-032	2mM	100µl
Sodium pyruvate 20mM	Stock	0.2mM	100µl
Gentamycin 50mg/ml	Life Technologies, 15750-037	50µg/ml	10µl
Cysteamine 100mM	Stock	0.1mM	10µl
FBS		-	1ml
Ajuster pH 7.4, filtrer 0,22µm puis placer à 38,5°C et 5% CO <sub>2</sub>			

### Milieux de fécondation :

Milieu IVF-TL	Référence	MM	[mM]	Volume pour 100ml
H <sub>2</sub> O stérile	-	-	-	98ml
NaCl	Sigma, S-7653	58.45	114.0	0.666g
KCl	Normapur, 26764.298	74.55	3.2	0.023g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Normapur, 28015.294	138.0	0.3	0.0041g
Na Lactate	Sigma, L-1375	112.06	10.0	84.9µl
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	Normapur, 22317.297	147.0	2.0	0.029g

MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	Normapur, 25108.295	203.31	0.5	0.0101g
NaHCO <sub>3</sub>	Normapur, 27778.293	84.0	25.0	0.21g
MEM 50X	Life technologies, 11130-036	-	-	2ml
Ajuster à pH 7.3 (≈14μl NaOH5M), filtrer 0,22μm et conserver à 4°C pour un mois.				

Milieu IVF-TALP	Référence	[mM]	Volume
IVF-TL	Stock	-	10ml
BSA-FAF	A-6003	6mg/ml	0.06g
Na pyruvate stock 20mM	P-2256 (4°C)	0.2mM	100μl
Héparine stock 1U/μl	H-3393	23,475μg/ml	50μl
Gentamicine	G-1272	50μg/ml	50μl
Filtrer 0,22μm et conserver à 4°C pour une semaine.			

#### Milieus de développement embryonnaire :

MSE stock A (40X)	Référence	MM	[mM]	Pour 10ml
NaCl	Sigma, S-7653	58.45	3944	2.306g
KCl	Normapur, 26764.298	74.55	100	74.4mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma, P-0662	136.10	14	19.04mg
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Sigma, M-9397	246.50	8	19.72mg
Na Lactate 60% (4°C)	Sigma, L-1375	112.06	120	107.6μl
Conserver à 4°C pour un mois				

MSE stock B (40X)	Référence	MM	[mM]	Volume pour 10ml
CaCl <sub>2</sub>	VWR, Normapur, 22317.297	147	68.4	0.1g
Conserver à 4°C pour un mois				

MSE stock C (40X)	Référence	MM	[mM]	Volume pour 10ml
NaHCO <sub>3</sub>	VWR, Normapur, 27778.293	84.01	1000	0.84g
Conserver à 4°C pour un mois				



<b>MSE stock D (400X)</b>	<b>Référence</b>	<b>MM</b>	<b>[mM]</b>	<b>Volume pour 10ml</b>
Na pyruvate	Sigma, S-7653	88.06	12	105.7mg
Filtrer 0,22µm et conserver pour un mois à 4°C				

<b>MSE stock E (400X)</b>	<b>Référence</b>	<b>MM</b>	<b>[mM]</b>	<b>Volume pour 20ml</b>
EDTA	Sigma, 60-00-4	292.24	4	23.4mg
Ajuster pH 7.3, ajouter un peu de phénol red et filtrer 0,22µm. Conserver à 4°C pour trois mois				

<b>MSE stock F (40X)</b>	<b>Référence</b>	<b>MM</b>	<b>[mM]</b>	<b>Volume pour 10ml</b>
Glucose	Sigma, G8270	198.17	40	79.3mg
Conserver à 4°C pour 24H				

<b>MSE stock G (100X)</b>	<b>Référence</b>	<b>MM</b>	<b>[mM]</b>	<b>Volume pour 10ml</b>
Myo-inositol	Sigma, I-7508	180.16	7,02	12.6mg
Conserver à 4°C pour 24H				

<b>MSE stock H (20X)</b>	<b>Référence</b>	<b>MM</b>	<b>[mM]</b>	<b>Volume pour 10ml</b>
Na citrate	Normapur, 27833.294	294.1	10	29,41mg
Conserver à 4°C pour 24H				

<b>MSE</b>	<b>Référence</b>	<b>MM</b>	<b>[mM]</b>	<b>Volume pour 50ml</b>
H2O cell culture steril	PAA, S15-012	-	-	28,466ml
MSE stock A	-	-	-	1ml
MSE stock B	-	-	-	1 ml
MSE stock C	-	-	-	1 ml
MSE stock D	-	-	-	100µl
MSE stock E	-	-	-	100µl
MSE stock F	-	-	-	1ml
MSE stock G	-	-	-	500µl
MSE stock H	-	-	-	2,5ml
PVP	Sigma, P0930	-	1mg/ml	50mg
N-acetylglucosamine	Sigma, A3286	221.21	1	11.1mg

HEPES	Sigma, 3375	238.3	10	119.1mg
ITS	Life technologies, 41400-045	-	-	500µl
L-glutamine 200mM	Life technologies, 25030-032	-	-	136µl
MEM 50X	Life technologies, 11130-036	-	-	800µl
MEM NEAA 100X	Life technologies, 11140-035	-	-	400µl
RPMI1640 Medium	Life technologies, 11879-020	-	-	5ml
DMEM	Sigma, D6046, low glucose	-	-	5ml
Gentamycin 50mg/ml	Life technologies, 15710-049	-	-	50µl
Ajouter dans l'ordre, ajuster pH 7.3, filtrer 0,22µm puis conserver à 4°C le temps de la DIV				

## 5.2 Manipulation

### *Jour 0 : Collectes et mise en maturations des ovocytes*

- Faire milieu OMM
- Faire milieu OCM+ puis mettre à l'étuve
- Préparer la boîte de MIV :  
Déposer 470µl d'OMM-H dans X puits (X=n conditions) et 3ml dans X boîtes de pétri 35mm. Placer à l'étuve 38,5°C & 5%CO<sub>2</sub>.
- Préparer les boîtes de lavage (par condition) :  
Déposer 3ml d'OCM+ dans 3 boîtes de pétri 35mm et 8ml dans une 9cm. □ Allumer le bain marie humide sur 37°C.
- Ajouter 2ml de Kanamycin 1% au litre de solution saline :  
Ajouter 200µl dans la bouteille et 400µl par bécher.
- Placer la bouteille de saline dans le bac de transport et aller à l'abattoir.

### *Partie abattoir :*

- Récupérer les ovaires :  
Dans la masse organique, suivre l'intestin jusqu'au rectum puis trouver la matrice.

Remonter le vagin puis l'utérus pour trouver les cornes. Découper les ovaires à l'aide d'un couteau et placer les dans la saline.

- Revenir au laboratoire en prenant soin de conserver la température des ovaires au-dessus de 20°C.

*Partie post-abattoir :*

- Transférer les ovaires :
  - Vider la solution saline et transférer les ovaires dans le premier béccher.
  - Remuer et presser délicatement les ovaires pour finir de dégorger le sang.
  - Placer les ovaires dans le second béccher et celui-ci dans le bain marie.
- Ponctionner les ovaires :
  - Placer dans le bain marie deux falcon 15ml avec 2ml d'OCM+ chacun.
  - Préparer trois seringues de 5ml équipées d'une aiguille 18G.
  - Repérer les OBS (ovocytes black spot) en prenant soin de les différencier d'éventuels caillots de sang.
  - Piquer en amont de l'ovocyte et créer une aspiration continue en avançant sur le spot et au-delà. En retirant l'aiguille, celle-ci doit émettre un bruit de succion caractéristique.
  - Une fois l'ovocyte ponctionné, on retire l'aiguille et on éjecte le produit de la ponction dans les tubes de collection.
  - Les ponctions sanglantes doivent être éliminées et la seringue changée.
  - Une fois la ponction terminée, laisser décanter les tubes 30 minutes dans l'incubateur 38,5°C.
- Supplémenter les puits en hormones :
  - Ajouter 10µl de PMSG stock et 10µl de HCG stock pour chaque 500µl d'OMM-H par puits, soit 20µl de chaque pour 1ml.
- Récupérer les ovocytes :
  - Allumer la loupe et la platine chauffante à 37°C.
  - Placer sur la platine chauffante la boîte de pétri 9cm et les 3 boîtes 35mm avec l'OCM+.
  - A l'aide d'une pipette pasteur, récupérer deux ml de culot du premier tube et les placer dans la 9cm. Rincer et refaire deux fois.

- Screener la boîte et déplacez tous les COCs trouvés dans la première pétri 35mm.
- Faire la même chose pour le tube 2.
- Laver en passant tous les COC de la boîte 1 à la 2 puis à la 3.
- Les COCs sont ensuite lavés via un passage par les pétri contenant l'OMM puis répartis dans les différents plots de maturation avec injection des ovocytes dans 30µl dans chaque puits (470+30=500).
- Les ovocytes sont maturés à 38,5°C avec 5% CO<sub>2</sub> avec 21% O<sub>2</sub> pour 24H.

### ***Jour 1 : Fécondation***

- Préparer la boîte de FIV :  
Déposer 470µl d'IVF-TALP dans le puit d'une boîte de FIV pour chaque condition. Placer à l'étuve 38,5°C avec 5% CO<sub>2</sub> la boîte de FIV et le tube d'IVF-TALP ouvert pour au moins deux heures.
- Préparer les boîtes de pétri :  
Pour chaque condition préparer une boîte de pétri 35mm contenant 3ml d'IVF-TALP.
- Mettre à l'étuve le sp-TALP-H
- Supplémenter les puits :  
30' avant de mettre les COCs dans les plots de fertilisation, ajoutez 25µl de PHE pour chaque 500µl de milieu IVF-TALP
- Ovocytes :
  - Transférez les ovocytes matures des plots de MIV dans les boîtes de pétri 35mm contenant l'IVF-TALP.
  - Transférer ensuite les ovocytes de chaque boîte dans un puit de la boîte de FIV. Attention, utiliser un volume exact de 25µl.
- Paillettes :
  - Sortir 2 paillettes du LN<sup>2</sup> et les plonger dans une eau à 37°C pour 40sec. Vider au fond d'un eppendorf 2ml contenant 1ml de sp-TALP-H.
  - Swim-up d'une heure à 37°C. Récupérer la fraction supérieure (300µl) dans un eppendorf 1,5ml. Ajoutez 1ml de sp-TALP-H et centrifuger 5' à 500G. Enlever le surnageant au plus près du culot et répétez l'opération de centrifugation. Reprendre dans 20µl d'IVF-TALP.
  - Calculer la concentration et ajuster celle-ci de façon à avoir 2M/ml spz dans le plot

en concentration finale.

- Injecter les spz dans le plot et compléter en IVF-TALP si besoin qsp 500µl.
- Incubez 22 heures à l'étuve 38,5°C avec 5% CO<sub>2</sub>.

➤ Préparer la boîte de DIV :

Déposer 470µl d'EM dans les 4 puits d'une boîte de DIV puis 250µl d'huile minérale par-dessus les puits 3 et 4. Placer à 38,5°C avec 5% CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> pour au moins deux heures.

➤ Décongeler un falcon d'OCM et placer au frigo

***Jour 2 : Mise en culture des embryons***

➤ Faire milieu OCM+

➤ Préparer les boîtes de lavage :

Pour chaque condition, préparer deux boîtes 35mm contenant 3ml d'OCM+, une boîte contenant 3ml d'ECM et une vide.

➤ Passage en DIV :

Pour chaque condition :

- Placer les 3 boîtes de pétri 35mm sur la platine chauffante réglée sur 38°C : une vide, deux contenant 3ml d'OCM+.
- Mettre 2ml d'OCM+ dans un Falcon 15ml.
- Placer les zygotes présumés dans le tube et vortexer fortement deux minutes (vitesse 9/10 & changer de main après une minute).
- Vider le tube dans la boîte de pétri 35mm vide.
- Laver chaque tube deux fois avec 1ml supplémentaire.
- Laver les zygotes présumés en les passant de la première boîte à la seconde (contenant 3ml OCM+) puis la troisième (idem).
- Sortir la boîte 35mm contenant l'ECM et y passer les zygotes présumés.
- Enfin, placer les zygotes présumés dans le plot de la boîte de DIV.

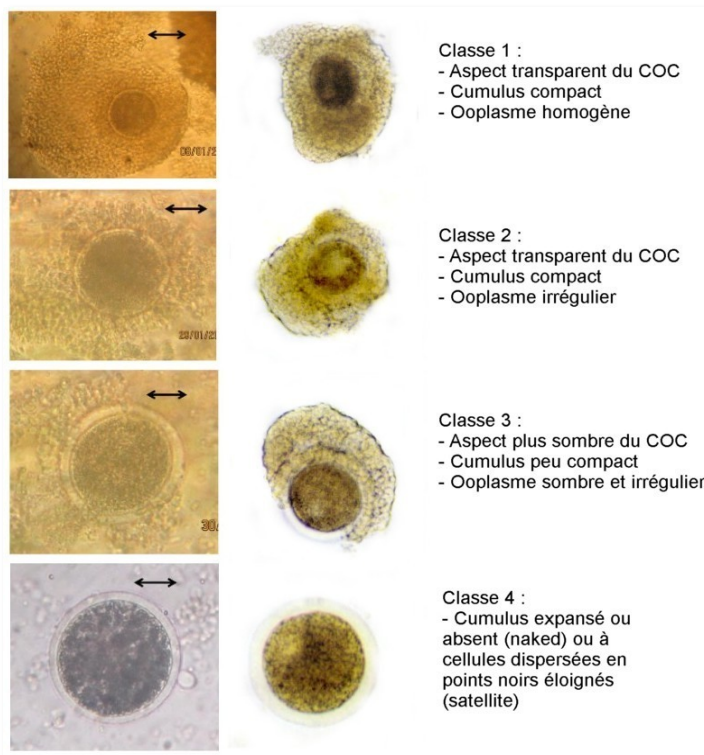
***Observation***

Le taux de clivage est observé 48H après la fécondation. Le taux de blastocystes et d'éclosion sont observés de 7 à 9 jours après fécondation selon l'expérience.

### 5.3 Discussion

#### a. Tri des ovocytes

La détermination de la qualité des ovocytes se fait principalement par le manipulateur. La table d'évaluation utilisé au sein du laboratoire est la classification proposée par l'International Embryo Transfer Society (IETS) dans "A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures" (Stringfellow et Givens, 2010). Cette classification regroupe quatre classes distinctes de COC's. Les classes sélectionnées durant mon étude sont 1 et 2.



**Figure 24. Organisation des COC's en quatre classes selon leur qualité. Echelle = 30 µm**

#### b. Taux de clivage

Chez l'espèce bovine le taux de clivages représente le nombre d'ovocytes fécondés par rapport au nombre d'ovocytes initiaux ou par rapport au nombre d'ovocytes matures selon les besoins de l'expérience. Le comptage est effectué par le manipulateur 48H après fécondation sous loupe

binoculaire. Les ovocytes sont considérés comme fécondés lorsqu'ils ont entamé le processus de division cellulaire (qui se traduit par la présence de clivage).

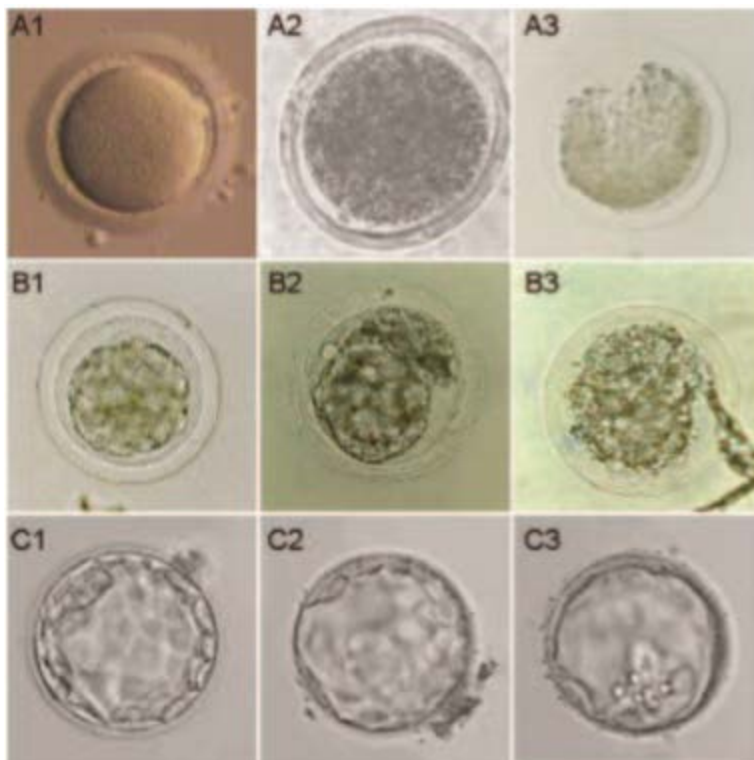


*Figure 25. Photo d'ovocytes de souris sous loupe binoculaire ayant entamés la division cellulaire*

*c. Comptage et évaluation des blastocystes bovins*

Le comptage des blastocystes est effectué sous loupe binoculaire 7 à 9 jours après fécondation selon les besoins de l'expérience. Ils sont classés par le manipulateur selon 3 catégories :

- Les blastocystes non-expansés possèdent une cavité antrale mais une taille ne dépassant pas celle d'un ovocyte.
- Les blastocystes expansés possèdent une cavité antrale et une taille supérieure aux ovocytes.
- Les blastocystes éclos ont brisé la zone pellucide par leurs expansions.



*Figure 26. Qualité des ovocytes et embryons à différents stades. Photographies d'ovocytes (A), de morulas en compaction (B) et de blastocystes (C) de qualité bonne (1), moyenne (2) ou médiocre (3).*

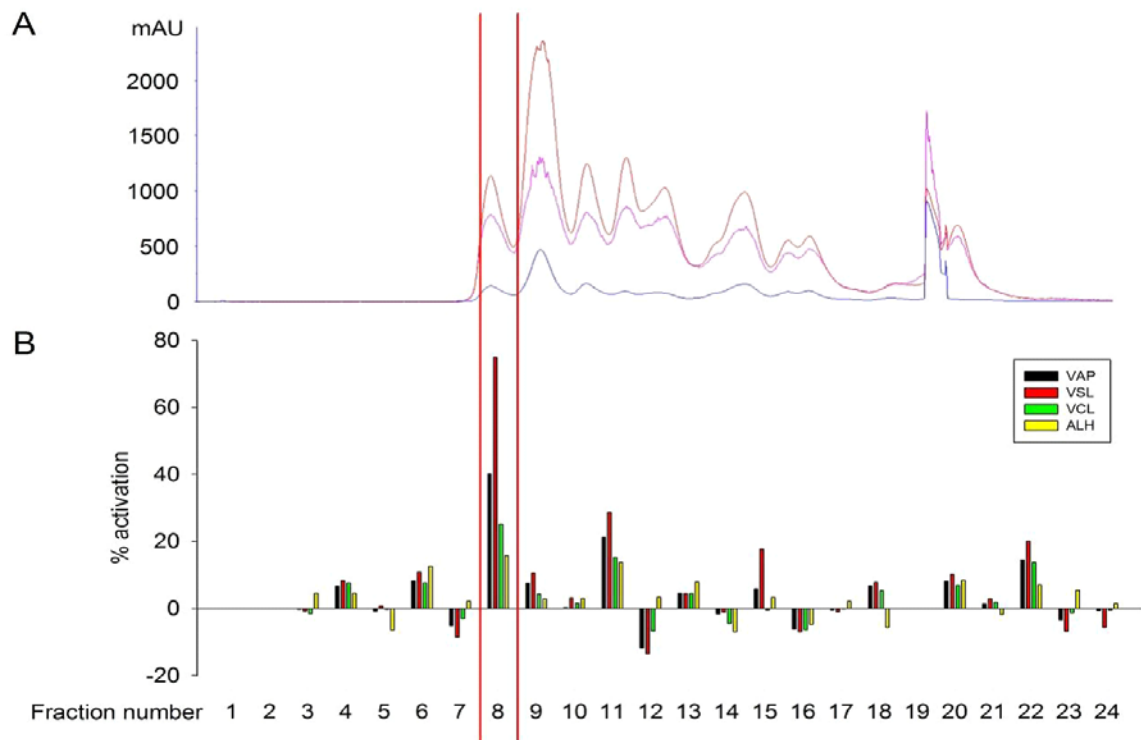
# Résultats



## VIII. Résultats

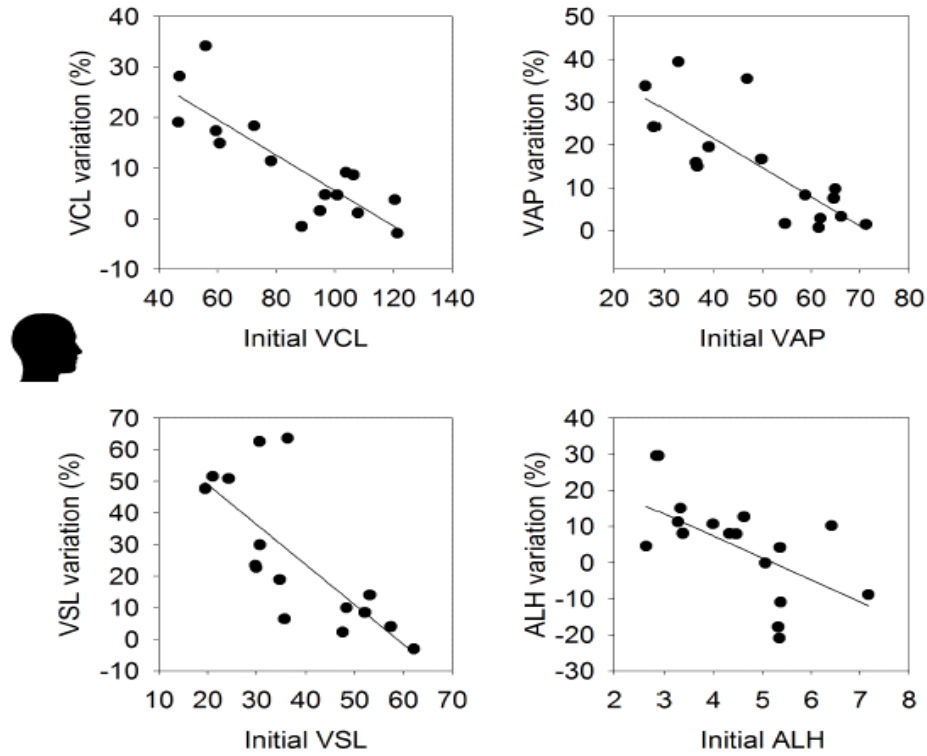
Mon travail a consisté à caractériser des nouvelles molécules améliorant la physiologie spermatique. Je vais décrire en détail la caractérisation de la spermaurine, molécule améliorant la mobilité spermatique et je mettrai en annexe les travaux sur le clofilium, molécule améliorant la durée de vie du spermatozoïde, auquel j'ai participé en réalisant des expériences de FIV bovine.

Le but de ce travail est de découvrir un nouveau composé naturel bioactif capable d'améliorer la mobilité spermatique. Les peptides sont des cibles de choix du fait de leurs hautes spécificités d'action. Les venins sont justement une source remarquable de peptides à profils pharmacologiques inconnus, et représentent un réservoir sous-exploité de composés bioactifs. Se basant sur ces observations, le laboratoire a réalisé dans le passé les premiers essais biologiques d'exposition de spermatozoïdes à des extraits de venins, et a caractérisé plusieurs composés capables de moduler la mobilité spermatique (Escoffier et al.2010). Dans cette étude nous nous sommes focalisés sur le venin du scorpion *Maurus palmatus*. Le venin brut a été fractionné par chromatographie d'exclusion par poids moléculaire par un prestataire de service spécialisé dans l'analyse des toxines. Nous avons obtenu 24 fractions et nous avons utilisé le système CASA pour tester l'effet de chacune de ces fractions sur des spermatozoïdes de souris (figure 27). Nous avons principalement analysé les paramètres les plus importants de la mobilité spermatique (VAP, VCL, VSL, ALH). Une de ces fractions (F8) stimule ces différents paramètres de la mobilité spermatique. Ce premier screening nous a permis de sélectionner une première fraction à tester dans les espèces cibles que sont l'humain et le bovin.



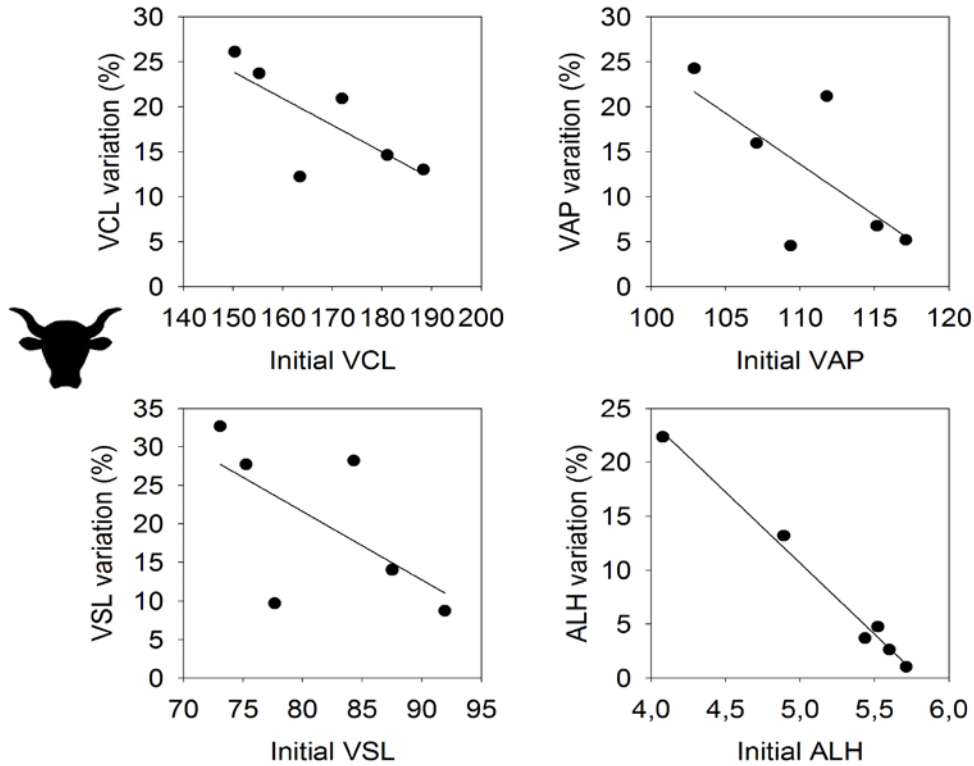
**Figure 27.** Une fraction du venin *Maurus Palmatus* améliore la mobilité spermatique chez la souris. (A) Chromatogramme du venin présentant les différentes longueurs d'onde de la séparation du venin lors de la chromatographie d'exclusion par taille. (B) Les fractions ont été lyophilisées et dissoutes dans de l'eau ultra-pure. L'activité de la fraction correspondante sur la mobilité spermatique de la souris (VAP, VCL, VSL et ALH) est exprimée en pourcentage d'amélioration (valeurs positives) ou de diminution (valeurs négatives) des paramètres de mobilité du sperme sans traitement. La fraction 8 induit une forte amélioration de la mobilité spermatique.

Nous présentons figure 28, le pourcentage d'activation induit par la fraction 8 par rapport aux valeurs initiales de mobilité des spermatozoïdes car la mobilité spermatique est un paramètre très hétérogène dans l'espèce humaine. On observe sur la deuxième figure que le pourcentage d'activation dépend de la mobilité initiale et que plus la mobilité du patient est basse initialement plus le pourcentage d'activation sera élevé.



**Figure 28.** La mobilité des spermatozoïdes humains est améliorée par la fraction 8 du venin de *Maurus palmatus*. Des aliquots de spermatozoïdes humains éjaculés lavés ( $n=16$ ) sont traités avec la fraction F8 (dilution 1/20) pendant 10 minutes et les paramètres de mobilité sont évalués (VCL, VSL, VAP et ALH). Les données sont représentées en pourcentage d'amélioration (valeurs positives) et de diminution (valeurs négatives) en fonction des paramètres de mobilité mesurés pour les aliquots contrôles. Pour chaque patient, plus de 100 spermatozoïdes sont analysés par condition. Les courbes représentent les régressions linéaires.

Contrairement à l'humain l'espèce bovine est plus homogène et la plupart d'entre eux possède un haut taux de spermatozoïdes mobiles (70-76%). Comme observé chez l'humain, les taureaux présentant une mobilité initiale importante présente une activation moindre en présence de la fraction 8 (figure 29).

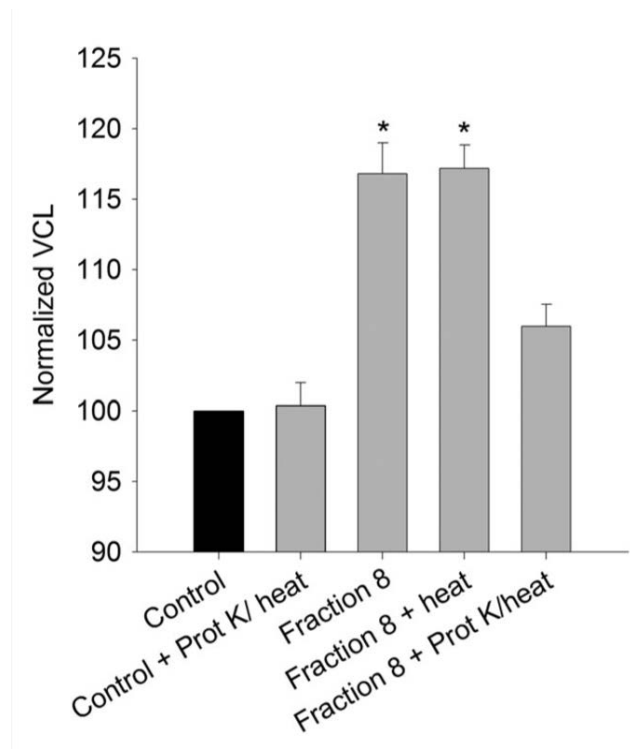


**Figure 29.** La mobilité des spermatozoïdes bovins est améliorée par la fraction 8. Des aliquots de spermatozoïdes épидидymaires bovins ( $n=6$ ) ont été traités avec F8 (dilution 1/20) pendant 10 minutes et les paramètres de mobilité spermatique ont été mesurés (VAP, VCL, VSL et ALH). Les données sont représentées en pourcentage d'amélioration (valeurs positives) et de diminution (valeurs négatives) en fonction des paramètres de mobilité mesurés pour les aliquots contrôles. Pour chaque animal, plus de 100 spermatozoïdes sont analysés par condition. Les courbes représentent les régressions linéaires.

Ces expériences nous montrent que la fraction 8 contient un ou plusieurs éléments capables d'améliorer la mobilité spermatique chez différentes espèces de mammifères incluant la souris, le bovin et l'homme. La prochaine étape est de découvrir la nature chimique du ou des composés actifs présents dans la fraction 8.

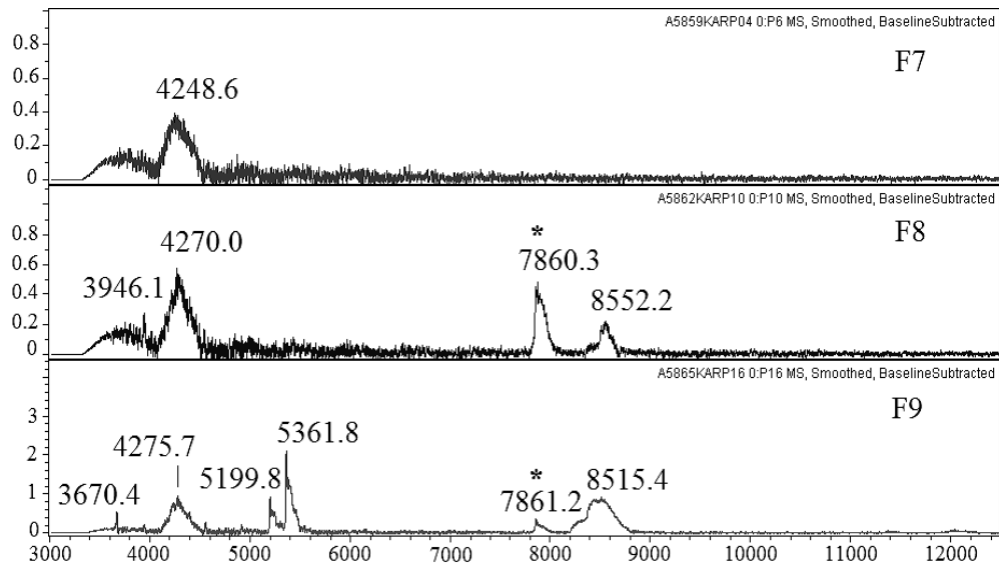
Pour savoir si la fraction possède un composé de nature protéique nous avons décidé de l'exposer à la protéinase K (figure 30). Le but de cette technique étant de confirmer ou non la nature protéique de notre composé. L'augmentation de la mobilité spermatique en présence de F8 est bloquée lorsque la fraction est prétraitée par la protéinase K. L'effet de la protéinase K n'était pas dû à la chaleur car le traitement thermique seul est sans effet, ce résultat suggérant

fortement que l'action de la protéinase K est due à sa propriété protéase. Ce résultat indique que le composé actif de la fraction F8 est probablement un peptide.



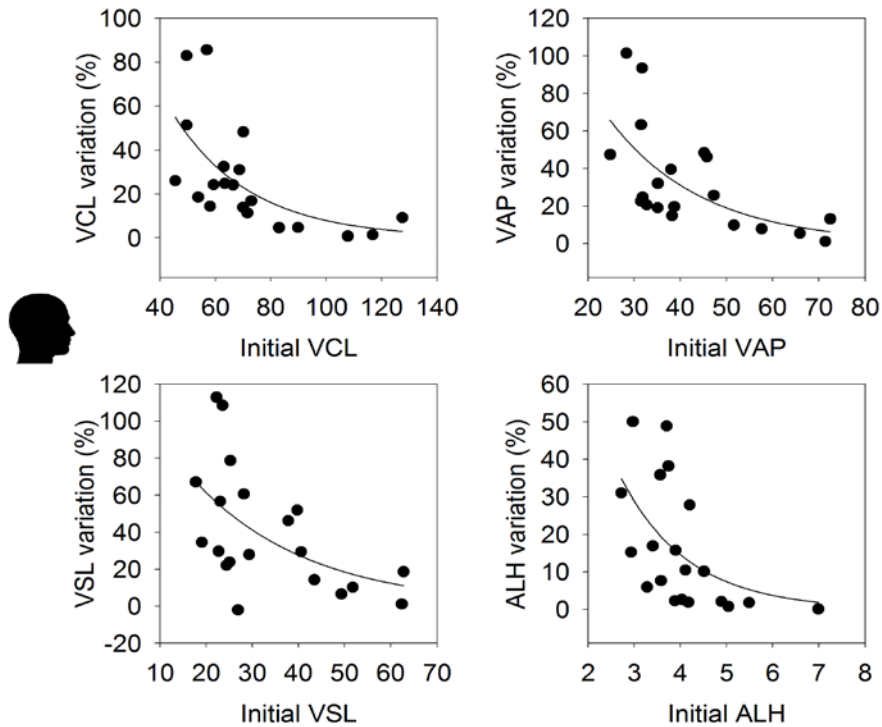
**Figure 30.** Le traitement de la fraction 8 (F8) par la protéinase K inhibe son activité biologique sur la motilité des spermatozoïdes. Le sperme humain éjaculé lavé ( $n = 3$  réplicats) a été incubé soit avec F8 (dilution 1/20, comme indiqué ci-dessus), soit avec F8 prétraité avec la protéinase K (Prot K) à 56°C pendant 60 min. La protéinase K chauffée ajoutée à la même concentration n'a eu aucun effet sur la motilité des spermatozoïdes. Pour chaque échantillon, entre 100 et 150 spermatozoïdes ont été évalués par condition. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD. Les différences statistiques ont été évaluées à l'aide du test t-test. \* $P < 0,05$  par rapport au témoin.

Notre molécule a été envoyée à un prestataire de service qui a utilisé une technique de désorption-ionisation laser assistée par matrice où nous pouvons observer les différentes molécules sur la fraction 8, et les fractions 7 et 9 adjacentes.



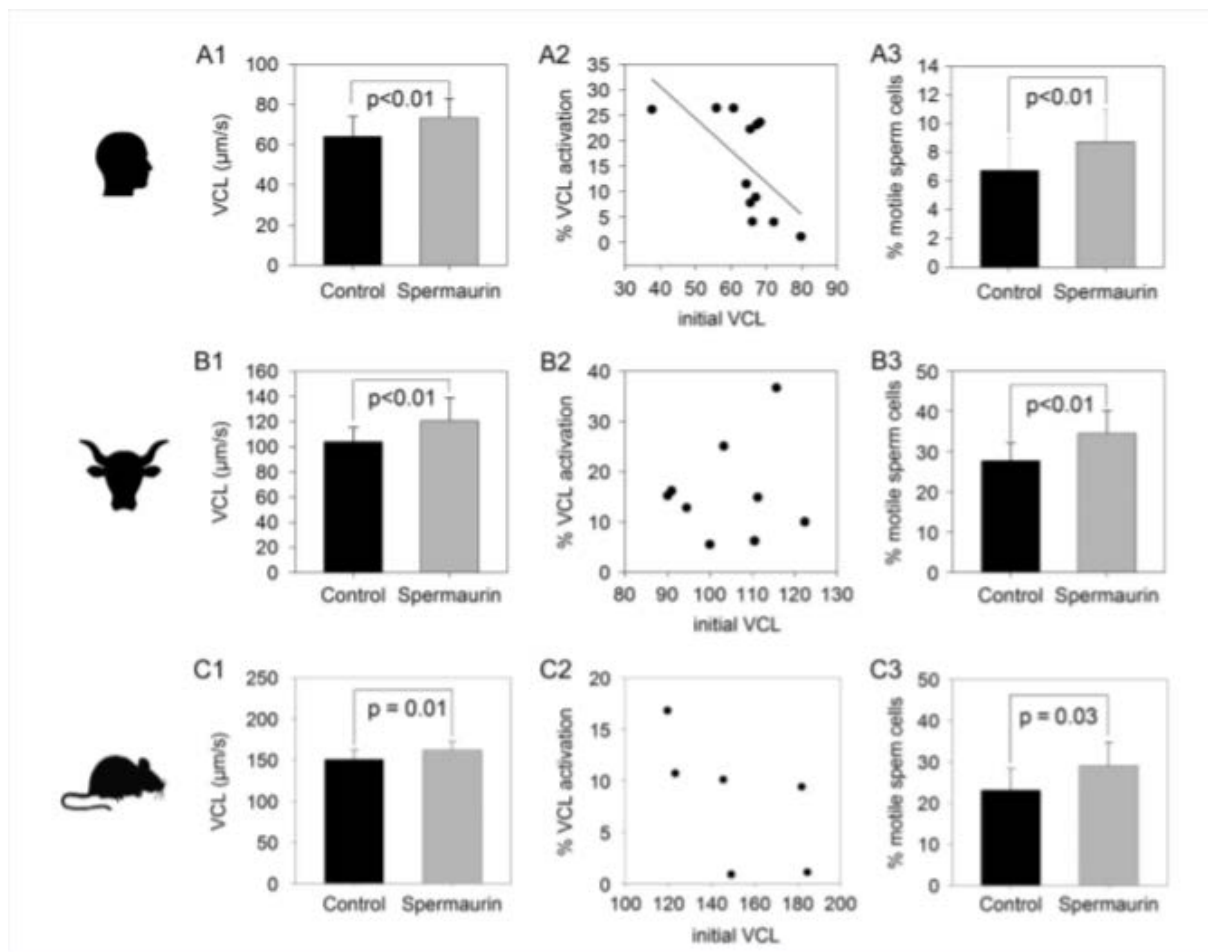
**Figure 31.** Analyse par spectromètre de masse (MALDI) des fractions du venin brut de *Maurus Palmatus* purifiées par chromatographie d'exclusion par taille. Les trois fractions (F7, F8 et F9) sont analysées par le spectromètre de masse (MALDI). Les ions moléculaires sont exprimés en  $m/z$ . Le peptide 7,8kDa est noté avec une asterix.

Dans la fraction 8 nous observons différentes molécules, toutes candidates potentielles à l'effet biologique observé. L'observation des profils des fractions 7 et 9, qui présentent respectivement aucune action et une faible action sur la mobilité spermatique et leur comparaison avec celui obtenu sur la F7, F8 et F9 nous a permis identifier un peptide unique présent dans la F8 et la F9 à la  $m/z$  de 7.860 et 7.861 (figure 31). Pour confirmer que la molécule 7,8kDa est responsable de ces effets biologiques nous l'avons purifié avec une nouvelle technique de chromatographie (affinité) puis testé ce peptide.



**Figure 32.** Le peptide 7,8KDa purifié a une activité similaire à la fraction 8 sur la mobilité spermatique de spermatozoïdes éjaculés humains. Chaque échantillon est traité avec la fraction 7.8KDa purifié (dilution 1/40<sup>ème</sup>) pendant 10 minutes et les paramètres de la mobilité spermatique sont évalués (VCL, VSL, VAP et ALH). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport à la mobilité initiale sans traitement.

Le potentiel d'activation de cette fraction est inversement proportionnel au paramètre initial de la mobilité spermatique sans traitement (figure 32). Le peptide purifié a les mêmes propriétés que celle de la fraction 8 (totale, sans purification du peptide) mais aussi des propriétés spécifiques. Premièrement le pourcentage d'activation n'est plus linéaire mais exponentiel. Deuxièmement cette fraction a plus d'effet. On peut observer que l'échantillon possédant les plus faibles paramètres est augmenté de 35% sur ça VCL avec la fraction 8 et de 90% avec la fraction purifiée. Ces résultats nous montrent que le peptide 7,8kDa est responsable de l'augmentation de la mobilité spermatique. La différence entre la fraction F8 et le peptide purifié est peut être due à l'inhibition ou la toxicité des autres composants présent dans la F8 non purifiée.



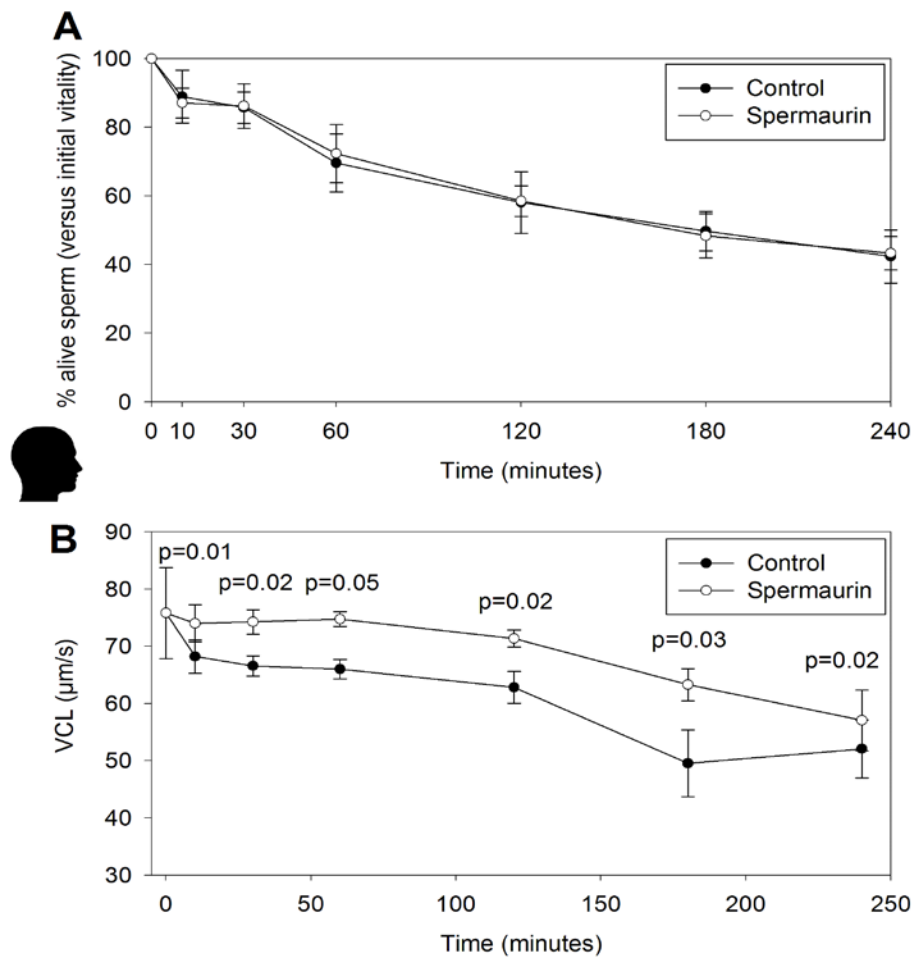
**Figure 33.** Le peptide synthétique améliore les paramètres de la mobilité spermatique. (A1-3) L'effet du peptide synthétique (dilution 1/200 correspondant à 170nM) sur des spermatozoïdes congelés humains. A1, VCL moyenne des échantillons, A2, VCL est exprimée en pourcentage d'augmentation par rapport à la VCL initiale. A3, pourcentage de spermatozoïde mobile ( $VAP > 1 \mu\text{m/s}$ ). (B1-3) Expérience similaire réalisé sur des spermatozoïdes bovins congelés. (C1-3) Expérience similaire sur du sperme epididymaires murin. Plus de 100 spermatozoïdes ont été analysés pour chaque condition.

Fait intéressant, le transcriptome de la glande à venin de *Maurus palmatus* a été récemment publié (Abdel-Rahman et al., 2013), et il n'y a qu'un seul peptide ayant une masse moléculaire de 7,8 kDa, dénommé Smp73. Ce peptide, qui appartient à la famille du peptide La1-like, compte 73 acides aminés, dont huit cystéines vraisemblablement impliqués dans quatre ponts disulfures internes et une extrémité C-terminale putative, dont la séquence déduite en acides aminés est connue.

Ces résultats suggèrent fortement que le peptide purifié 7,8 kDa dans nos expériences correspond au peptide Smp73 identifié par analyse transcriptomique dans la publication de



Abdel-Rahman *et al.* Du fait que le peptide a été extrait du scorpion *Maurus palmatus* et à cause de son activité sur les spermatozoïdes, nous avons baptisé ce peptide "spermaurin".

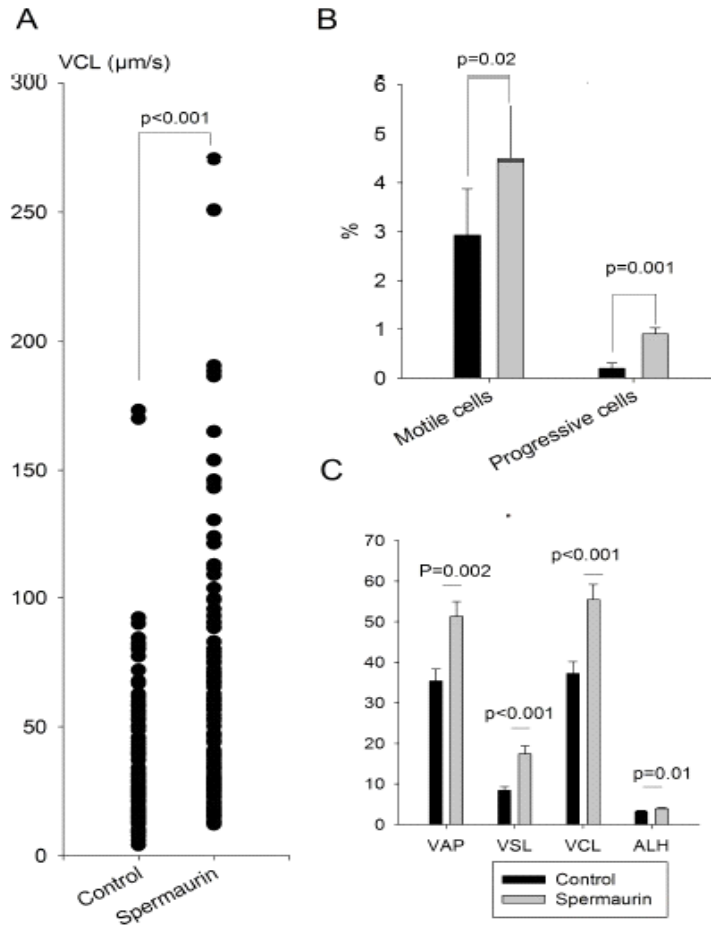


**Figure 34.** L'effet de la spermaurin est constant dans le temps sans altérations de la vitalité. (A) Vitalité de spermatozoïdes éjaculés humains continuellement exposés à la spermaurin pendant 240 min et du contrôle mesuré à différents temps (n=4). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de vitalité par rapport à t=0. (B) La VCL des spermatozoïdes éjaculés humains continuellement exposés à la spermaurin purifiée pendant 240 min et de leur contrôle sont mesurés à différents temps. n représente le nombre d'échantillons, plus de 100 spermatozoïdes ont été analysés par condition.

Bien que tous les peptides La1-Like testés jusqu'à aujourd'hui n'aient aucune toxicité sur les cellules vivantes (Quintero-Hernandez et al., 2015), nous avons confirmé l'absence de toxicité de la spermaurin lorsqu'elle est incubée en présence de spermatozoïdes (figure 34). *In vitro*, la mobilité spermatique diminue rapidement et nous voulions savoir si la stimulation de la mobilité spermatique par la spermaurin pourrait affecter la diminution de la mobilité des

spermatozoïdes au cours du temps. Pour répondre à cette question, la VCL des spermatozoïdes humains éjaculés a été suivie pendant 240 min en présence ou en absence de spermaurin. En comparant ces deux conditions, les observations suivantes ont été faites: i) la VCL des spermatozoïdes traités est toujours plus élevée que le contrôle VCL pendant toute la durée de l'expérience, ii) l'efficacité de la spermaurin pour augmenter la VCL est maximale au cours des 20 premières minutes et iii) l'augmentation de la motilité des spermatozoïdes traités ne modifie pas la décroissance de la VCL pour les 220 minutes suivantes (figure 33).

Nous avons montré que la spermaurin améliore les paramètres clés de la mobilité spermatique sur les spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés. La prochaine étape est de savoir si la spermaurin peut aussi améliorer le spermatozoïde testiculaire. Chez l'humain, les spermatozoïdes testiculaires sont collectés chez des patients atteints d'azoospermie (absence de spermatozoïde dans l'éjaculat). Toutefois les spermatozoïdes testiculaires possèdent une très faible mobilité et sont rares et peu matures. Pour contourner ce problème, des composants capables d'augmenter leur mobilité sont utilisés pour aider à la collecte et à la sélection des spermatozoïdes les plus matures (ceux répondant aux molécules pro-mobilité). A cette étape l'utilisation de la spermaurin sur des spermatozoïdes testiculaires humains n'est pas possible. Nous avons donc testé la spermaurin sur des spermatozoïdes testiculaires de primate non-humain.

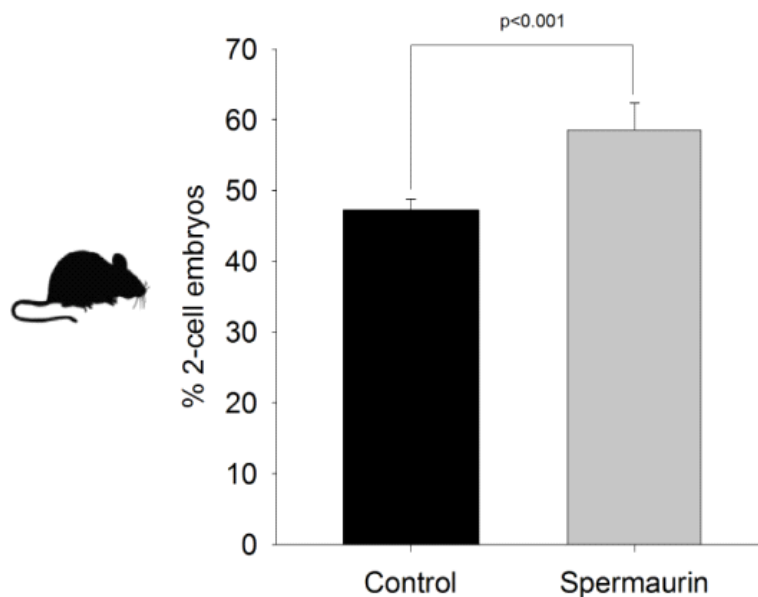


**Figure 35.** La spermaurin purifiée stimule les spermatozoïdes testiculaires chez le primate non-humain. (A) Les points verticaux correspondent aux valeurs de la VCL pour le contrôle et la spermaurin. (B) représente le pourcentage de spermatozoïdes mobiles pour le contrôle et l'échantillon traité avec la spermaurin. (C) Correspond aux valeurs des 4 paramètres principaux de la mobilité spermatique. Plus de 50 spermatozoïdes ont été analysés pour chacune de ces conditions.

Les spermatozoïdes testiculaires de Macaque sont collectés sur des singes euthanasiés pour d'autres recherches. Ils sont incubés pendant 10 minutes avec ou sans le peptide synthétique. Les paramètres de mobilités sont mesurés avec le système CASA avant et après traitement. La comparaison des deux échantillons nous révèle que la spermaurin améliore la mobilité spermatique et augmente le nombre de spermatozoïdes mobiles (figure 35).

Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles influence directement la fécondation *in vitro* (Publicover and Barratt, 2011) et comme la spermaurin est capable d'améliorer la mobilité spermatique et d'augmenter le nombre de spermatozoïdes mobiles, nous avons testé cette

molécule lors de fécondation *in vitro* chez le modèle murin. Ce travail a été réalisé avant que l'on obtienne le peptide synthétique, nous avons donc utilisé le peptide purifié à une dilution de 1/40 (une dilution déjà connue pour améliorer la mobilité spermatique). La spermaurin a été introduit en même temps que les spermatozoïdes dans des puits de fécondation contenant des ovocytes matures. La fécondation est évaluée 24 heures plus tard et le pourcentage est calculé selon le nombre d'embryons ayant commencé la division cellulaire. Le traitement des gamètes par la spermaurin améliore le rendement de la fécondation *in vitro* de  $42.2 \pm 1.5\%$  à  $58.6 \pm 3.8\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.001$ ), représentant une augmentation de 19% (figure 36).



**Figure 36.** La spermaurin purifié améliore la fécondation *in vitro* chez le modèle murin. Les spermatozoïdes et les ovocytes sont mélangés dans du milieu M16 en présence ou non de spermaurin. Ce graphique correspond au pourcentage d'embryon au stade 2 cellules après 24 heures d'incubation.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dont je suis co-auteur (voir annexe 2).

# Discussion

## IX. Discussion

Nous avons montré qu'un peptide riche en ponts disulfures (DRP) issu du venin de scorpion *Maurus Palmatus* et que nous avons nommé « spermaurin » est un composé capable d'améliorer significativement les différents paramètres de la mobilité spermatique et cela chez différentes espèces de mammifères et d'améliorer la fécondation *in vitro* sur le modèle murin. La spermaurin fonctionne sur les spermatozoïdes testiculaires, epididymaires et éjaculés. Elle améliore également grandement la mobilité des spermatozoïdes éjaculés congelés. Ce composé représente un outil prometteur dans les biotechnologies de la procréation médicalement assistée (PMA). La spermaurin pourrait être considérée comme un nouveau composé ouvrant la voie au développement de nouveaux peptides et de médicaments mimant les effets de certains peptides tout en ayant une structure plus simple et une activité plus puissante. Ce travail confirme le grand intérêt des venins dans le développement de « composés biologiques ». En effet, les venins ont été utilisés avec succès pour le développement d'analgésiques et de médicaments pour les maladies cardio-vasculaires. Par exemple, le Prialt® (25 aa, 6 Cys), isolé à partir du venin du cône *Conus magus*, cible sélectivement les canaux calciques voltage-dépendants des blocs de type N et est le seul traitement non-opioïde approuvé pour le traitement des douleurs chroniques sévères. Un peptide de venin de vipère, Integrilin® est utilisé dans le traitement et la prévention du syndrome coronarien aigu. Plus de 20 autres peptides dérivés issus de venin sont en cours de développement par les sociétés pharmaceutiques. Ceci nous montre l'intérêt majeur des venins pour la découverte de médicaments, il s'agit d'un domaine scientifique en plein essor. La spermaurin étend l'utilisation des peptides bioactifs dans le domaine de la procréation médicalement assistée.

Bien que la reproduction assistée bénéficie déjà de composants biologiques comme les gonadotrophines pour la stimulation ovarienne, la spermaurin est le premier composant biologique proposé pour l'amélioration du sperme. L'utilisation de la spermaurin ou de ses dérivés dans les biotechnologies de la reproduction devrait être facilitée pour les raisons suivantes: d'une part, la spermaurin serait ajoutée directement dans le milieu d'incubation des spermatozoïdes, ce qui évite toute difficulté de biodistribution; d'autre part, la présence de liaisons disulfures améliore grandement la stabilité et le peptide peut être mélangé dans un milieu exempt de protéase, ce qui évite une perte d'activité au fil du temps; troisièmement la spermaurin appartient à la famille des peptides Ia1-like, une famille connue pour son absence de toxicité (Quintero-Hernandez et al., 2015).

La spermaurin est un grand peptide de 73 acides aminés, et il est peu probable qu'il soit capable de traverser librement la membrane plasmique, il est plus probable qu'il active une voie originale pour augmenter la motilité des spermatozoïdes. Son site d'action est très probablement un récepteur membranaire ou un canal ionique, contrairement aux autres composés améliorant la mobilité spermatique déjà connus. Il sera important de caractériser le récepteur de la spermaurin afin d'identifier la voie moléculaire activée par le peptide qui pourrait constituer une nouvelle cible pour le développement d'autres traitements destinés à améliorer la mobilité spermatique.

Les venins de scorpion contiennent différentes familles bien caractérisées de peptides. La plupart d'entre eux sont des peptides neurotoxiques ciblant les canaux ioniques et permettant de paralyser leur proie. Néanmoins, il existe aussi des familles de peptides avec des fonctions encore inconnues. Parmi celles-ci, il y a une famille de peptides riche en ponts disulfures, nommée La1-like qui a été d'abord isolée à partir du venin du scorpion *Liocheles australasiae* et initialement appelée La1 peptide (Miyashita et al., 2007). La1 a été présenté comme le composant le plus abondant du venin de *L. australiasae* ce qui suggère que ce peptide peut avoir une fonction biologique importante. De plus, ces peptides sont présents dans de nombreuses familles plus ou moins vénéneux de scorpions. Les peptides La1-like ont été trouvés dans différentes espèces appartenant à la famille *Scorpionidae* comme *Opisthacanthus cayaporum* (Silva et al., 2009), *Pandinus cavimanus* (Diego-Garcia et al., 2012) et le Scorpion *Maurus palmatus* (Abdel-Rahman et al., 2013), la famille *euscorpiidae* comme *Scorpiops margerisonae* (Ma et al., 2012), la famille *Urodacidae* comme *urodacus yashenkoi* (Luna-Ramirez et al., 2013), la famille *Buthidae* comme *Lychas mucronatus* et *isometrus maculatus* (Ma et al., 2012) et la famille *vaejovidae* comme *vaejovis spp.* (Quintero-Hernandez et al., 2015). Ces peptides sont donc trouvés dans 6 à 17 familles de scorpions jusqu'à présent. Des peptides homologues à La1 ont également été trouvés dans les tiques et les insectes (Ribeiro et al, 2011; Sheldon et al, 2007), confirmant qu'ils pourraient avoir une fonction biologique importante. Cependant, la fonction de cette famille de peptides reste inconnue jusqu'à présent. Ici, nous avons montré pour la première fois que la toxine La1 analogue de *S. Maurus palmatus* est capable de modifier la mobilité spermatique, suggérant la présence d'un récepteur spécifique pour ce peptide sur la membrane plasmique du spermatozoïde. La caractérisation de ce récepteur permettra probablement de fournir des indices pour identifier les cibles moléculaires de cette famille de peptides et permettre la caractérisation de la fonction biologique de cette classe de peptides.

## X. Conclusion

Ce peptide, maintenant appelé spermaurine, contient 73 acides aminés et quatre ponts disulfure. Ce peptide riche en disulfure (DRP) est particulièrement intéressant pour les raisons suivantes :

1/ Originalité du composé. La spermaurine est le premier peptide à être caractérisé comme activateur de la mobilité et de la fécondité des spermatozoïdes et n'a aucun lien avec les molécules antérieures connues pour améliorer la mobilité des spermatozoïdes (principalement par inhibition de la phosphodiesterase), qui ne peuvent être utilisées en toute sécurité en raison de leur manque de sélectivité. Il convient de noter l'originalité de l'approche : l'utilisation de la bibliothèque de venin pour découvrir de nouveaux peptides et de nouveaux acteurs de la physiologie du spermatozoïde, une stratégie qui a donné lieu à plusieurs brevets et publications dans des revues (Escoffier et al, 2010a, Escoffier et al, 2010b).

2/ Raison de sécurité. La spermaurine fait partie des peptides de type La1-like, que l'on trouve en abondance dans les venins de scorpion. Cependant, les peptides La-1 ne présentent aucune toxicité même lorsqu'ils sont injectés à haute concentration : la fonction de cette famille de peptides n'est probablement pas liée à l'immobilisation/la mort de proies et la raison de sa présence dans le venin de scorpions mériterait d'être déterminée (Miyashita et al, 2007). Notons que les propriétés d'amélioration de la mobilité des spermatozoïdes en présence de la spermaurine est la première activité biologique identifiée pour la famille La1-like.

3/ Raisons technologiques. La synthèse de la spermaurine est maintenant bien maîtrisée, évitant les difficultés liées à sa purification à partir d'une matrice biologique complexe comme les venins (Martinez et al., 2017).

4/ Intérêt de la découverte dans le domaine de l'infertilité. L'utilisation de la spermaurine comme stimulateur de la motilité des spermatozoïdes a été brevetée en collaboration avec IMV-Technologies, qui est le leader mondial de la reproduction assistée animale. Après la publication montrant les propriétés du peptide, une autre compagnie pharmaceutique, l'un des leaders mondiaux de l'infertilité humaine, nous a contacté pour nous informer qu'ils étaient intéressés par le peptide spermaurine.

Ce peptide pourrait donc après développement servir de molécule « lead » pour l'amélioration de la fertilité.



## XI. Perspectives

Nous avons très récemment élucidé la structure tridimensionnelle (3D) de la spermaurine, qui ne présente aucune similitude structurelle avec d'autres peptides ou protéines. Jusqu'à présent, les seules données structurelles disponibles sur la famille de type La1 étaient le modèle de liaison disulfure de La1 (de *Liocheles australasiae*) qui s'est révélé similaire à celui d'un domaine de facteur von Willebrand de type C (VWC). Les peptides La1-like étaient alors supposés adopter une structure 3D similaire (Sheldon et al, 2007), mais nos résultats démontrent clairement que cette hypothèse est fautive, et que la spermaurine adopte un pli non apparenté sans précédent. Comme la plupart des DRPs des scorpions venimeux, la spermaurine doit avoir une cible spécifique (VenomZone (<https://venomzone.expasy.org/1217>)). La structure 3D originale de la spermaurine suggère donc fortement la présence d'un récepteur spécifique pour ce peptide sur le spermatozoïde et la caractérisation du récepteur de la spermaurine fournira des indices pour identifier la fonction de cette famille de peptides.

Une étude plus poussée du mode d'action de la spermaurine permettra probablement d'identifier une nouvelle voie d'activation de la mobilité des spermatozoïdes. Il est important de noter que la spermaurine est active sur différents types de mammifères, ce qui suggère qu'elle cible une voie majeure et conservée qui contrôle la mobilité des spermatozoïdes. De plus, la spermaurine est beaucoup plus puissante sur le spermatozoïde bovin que tous les composés précédemment identifiés, ce qui la rend particulièrement intéressante pour la reproduction animale.

# Références bibliographiques

## XII. Références bibliographiques

Abdel-Rahman, M.A., Quintero-Hernandez, V., and Possani, L.D. (2013). Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae). *Toxicon* 74, 193–207.

Abdoon, A.S., Ghanem, N., Kandil, O.M., Gad, A., Schellander, K. an. T., and D. (2012). cDNA microarray analysis of gene expression in parthenotes and in vitro produced buffalo embryos. *Theriogenology* 77, 1240–1251.

Aboagla, E.M.E., and Trade, T. (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1160–1172.

Acott, T.S., and Carr, D.W. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol. Reprod.* 30, 926–935.

Agarwal, A., Gupta, S., and Sharma, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005.

Aitken, R.J., and Baker, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev* 16, 581–8.

Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., and Mclachlan, R.I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32, 46–56.

Akhter, S., Ansari, M.S., Rakha, B.A., Ullah, N., Andrabi, S.M.H., and Khalid, M. (2011). In vitro evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5°C diluted in soya lecithin based extender (Bioxcell®), tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 45–49.

Albertini, D.F., and Barrett, S.L. (2004). The developmental origins of mammalian oocyte polarity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 599–606.

Alvarez, L., Friedrich, B.M., Gompfer, G., and Kaupp, U.B. (2014). The computational sperm cell. *Trends Cell Biol.* 24, 198–207.

Andolfi, L., Trevisan, E., Troian, B., Prato, S., Boscolo, R., Giolo, E., Luppi, S., Martinelli, M., Ricci, G., and Zweyer, M. (2015). The application of scanning near field optical imaging to the study of human sperm morphology. *J Nanobiotechnology* 13, 2.

Andrabi, S.M.H. (2007). Fundamental principles of cryopreservation of *Bostaurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa: mini review. *Int. J. Agric.Biol* 9, 367–369.

Arangasamy, A., Singh, L.P., Ahmad, N., Ansari, M.R. an. R., and G.C. (2005). Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Anim.Reprod. Sci* 90, 243–254.

Arcelay, E., Salicioni, A.M., Wertheimer, E., and Visconti, P.E. (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 463–472.

Arifiantini, R.I.I.S., and Yusuf, T.L. (2010). Developing of tris soy milk diluent for frisian

holstein bull frozen semen. *Hayati J. Biol* 17, 91–94.

Arnoult, C., Kazam, I.G., Visconti, P.E., Kopf, G.S., Villaz, M., and Florman, H.M. (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6757–6762.

Austin, C.R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326.

Austin, C.R., and Bishop, M.W. (1958). Capacitation of mammalian spermatozoa. *Nature* 181, 851.

Babcock, D.F., Rufo, G.A., and Lardy, H.A. (1983). Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1327–1331.

Baccanari, D., Phillips, A., Smith, S., Sinski, D., and Burchall, J. (1975). Purification and properties of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 14, 5267–5273.

Bahat, A., Caplan, S.R., and Eisenbach, M. (2012). Thermotaxis of human sperm cells in extraordinarily shallow temperature gradients over a wide range. *PLoS ONE* 7, e41915.

Bailey, J.L., and Buhr, M.M. (1994a). Cryopreservation alters the Ca<sup>2+</sup> flux of bovine spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science* 74, 45–51.

Bailey, J.L., and Buhr, M.M. (1994b). Cryopreservation alters the Ca<sup>2+</sup> flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci* 74, 45–51.

Bailey, J., Morrier, A., and Cormier, N. (2003a). Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science* 83, 393–401.

Bailey, J.L., Buhr, M.M., and Robertson, L. (1994a). Relationships among in vivo fertility, computer-analysed motility and in vitro Ca<sup>2+</sup> flux in bovine spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science* 74, 53–58.

Bailey, J.L., Robertson, L., and Buhr, M.M. (1994b). Relationships among in vivo fertility, computer-analysed motility and in vitro Ca<sup>2+</sup> flux in bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci* 74, 53–58.

Bailey, J.L., Morrie, A., and Cormier, N. (2003b). Semen cryopreservation: success and persistent in farm species. *Canadian J. Anim. Sci* 83–393.

Barbas, J.P., and Mascarenhas, R.D. (2009a). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10, 49–62.

Barbas, J.P., and Mascarenhas, R.D. (2009b). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10, 49–62.

Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J.M., and Magistrini, M. (2001a). Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 181–190.

Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J.M., and

- Magistrini, M. (2001b). Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci* 68, 181–190.
- Beebe, D., Wheeler, M., Zerigue, H., Walters, E. an. R., and S. (2002). Microfluidic technology for assisted reproduction. *Theriogenology* 57, 125–135.
- Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., and Lejeune, H. (2003). DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique (Hum Reprod).
- Bianchi, E., and Wright, G.J. (2014). Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization. *Cell Cycle* 13, 2019–2020.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., and Wright, G.J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508, 483–487.
- Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Gagnon, C., and Sirard, M.A. (2001). Thiols prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*.
- Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N., and Sirard, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase.
- Bilodeau-Goeseels, S. (2012). Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence? *Reprod. Domest. Anim.* 47, 687–693.
- Bissonnette, N., Lévesque-Sergerie, J.P., Thibault, C. an. B., and G. (2009). Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: A potential tool to evaluate semen quality. *Reproduction* 138, 65–80.
- Blackmore, P.F., Neulen, J., Lattanzio, F., and Beebe, S.J. (1991). Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J. Biol. Chem.* 266, 18655–18659.
- Bleil, J.D., and Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95, 317–324.
- Blondin, P., Beaulieu, M., Fournier, V., Morin, N., Crawford, L., Madan, P. an. K., and W.A. (2009). Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71, 30–38.
- Bo, G., and Mapletoft, R. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos.
- Borggreffe, T., and Liefke, R. (2012). Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. *Cell Cycle* 11, 264–276.
- Boryshpolets, S., Pérez-Cerezales, S., and Eisenbach, M. (2015). Behavioral mechanism of human sperm in thermotaxis: a role for hyperactivation. *Hum. Reprod.* 30, 884–892.
- Bose, K.S., and Sarma, R.H. (1975). Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1173–1179.

- Brandhorst, B.P. (1985). Informational content of the echinoderm egg. *Dev. Biol. (NY)* 1, 525–576.
- Braun, R.E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat. Genet.* 28, 10–12.
- Breitbart, H., and Finkelstein, M. (2015). Regulation of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction by PIP 2 and Actin Modulation. *Asian J. Androl.* 17, 597–600.
- Breitbart, H., and Naor, Z. (1999a). Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev. Reprod.* 4, 151–159.
- Breitbart, H., and Naor, Z. (1999b). Protein kinases in mammalian spermcapacitation and the acrosome reaction. *Rev. Reprod* 4, 151–159.
- Brooks, D.E., Tate, M.E., Mann, T., and Martin, A.W. (1981). Phosphoglycopeptide, a major constituent of the spermatophoric plasma of the octopus (*Octopus dofleini martini*). *J. Reprod. Fertil.* 63, 515–521.
- Burgos, C., Maldonado, C., Gerez de Burgos, N.M., Aoki, A., and Blanco, A. (1995). Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C4 in mice. *Biol. Reprod.* 53, 84–92.
- Butler, D. (1998). Pressure grows for relaxation of French embryo research laws. *Nature* 395, 532–533.
- Campanile, G., Gasparrini, B., Vecchio, D., Neglia, G., Senatore, E.M., Bella, A., Presicce, G. an. Z., and L. (2011). Pregnancy rates following AI with sexed semen in Mediterranean Italian buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 76, 500–506.
- Campanile, G., Vecchio, D., Neglia, G., Bella, A., Prandi, A., Senatore, E.M., Gasparrini, B. an. P., and G.A. (2013). Effect of season, late embryonic mortality and progesterone production on pregnancy rates in pluriparous buffaloes (*Bubalus bubalis*) after artificial insemination with sexed semen. *Theriogenology* 79, 653–659.
- Campbell, K.H., McWhir, J., and Ritchie, W.A. an. W. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64–66.
- Carr, D.W., and Acott, T.S. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor. *Biol. Reprod.* 30, 913–925.
- Carvalho, J.O., Sartori, R., Machado, G.M., Mourao, G.B. an. D., and M.A. (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology* 9.
- Cerolini, S., Maldjian, A., and Pizzi, F. Gliozzi TM. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen.
- Chatterjee, S., De Lamirande, E., and Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione (*Mol Reprod Dev*).
- Cheng, F.P., Gadella, B.M., Voorhout, W.F., Fazeli, A., Bevers, M.M., and Colenbrander, B. (1998). Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a

plasma membrane progesterone receptor. *Biol. Reprod.* 59, 733–742.

Chiriva-Internati, M., Gagliano, N., Donetti, E., Costa, F., Grizzi, F., Franceschini, B., Albani, E., Levi-Setti, P.E., Gioia, M., Jenkins, M., et al. (2009). Sperm protein 17 is expressed in the sperm fibrous sheath. *J Transl Med* 7, 61.

Clulow, J.R., Mansfield, L.J., Morris, L.H.A., Evans, G., and Maxwell, W.M.C. (2008). A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 108, 298–308.

Cobellis, G., Ricci, G., Cacciola, G., Orlando, P., Petrosino, S., Cascio, M.G., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Chioccarelli, T., Altucci, L., et al. (2010). A gradient of 2-arachidonoylglycerol regulates mouse epididymal sperm cell start-up. *Biol. Reprod.* 82, 451–458.

Cooter, P.Z., Goolsby, H.A., and Prien, S.D. (2005). Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim* 40, 98–99.

Cormier, N., and Bailey, J.L. (2003). A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 69, 177–185.

Coticchio, G., Dal Canto, M., Fadini, R., Mignini Renzini, M., Guglielmo, M.C., Miglietta, S., Palmerini, M.G., Macchiarelli, G., and Nottola, S.A. (2016). Ultrastructure of human oocytes after in vitro maturation. *Mol. Hum. Reprod.* 22, 110–118.

Cotter, P.Z., Goolsby, H.A., and Prien, S.D. (2005). Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 98–99.

Curi, S.M., Ariagno, J.I., Chenlo, P.H., Mendeluk, G.R., Pugliese, M.N., Sardi Segovia, L.M., Repetto, H.E.H., and Blanco, A.M. (2003). Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch. Androl.* 49, 343–349.

D1, M., G, G., F, V., I, M., A, P., L, D.M., M, C., and R, M. (2012). Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril.*

Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., and Treviño, C.L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol. Rev.* 91, 1305–1355.

De La Fuente, R., Viveiros, M.M., Burns, K.H., Adashi, E.Y., Matzuk, M.M., and Eppig, J.J. (2004). Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev. Biol.* 275, 447–458.

De La Vega-Beltran, J.L., Sánchez-Cárdenas, C., Krapf, D., Hernandez-González, E.O., Wertheimer, E., Treviño, C.L., Visconti, P.E., and Darszon, A. (2012). Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* 287, 44384–44393.

De Leeuw, F.E., De Leeuw, A.M., Den Daas, J.H.G., Colenbrander, B., and Verkleij, A.J. (1995). Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30, 32–44.

- Dobretsov, G.E., Kharitononkov, I.G., Mishiev, V.E., and Vladimirov, I.A. (1975). [Relation between fluorescence and circular dichroism of the complex of the fluorescence probe 4-dimethylaminochalcone with serum albumin]. *Biofizika* 20, 581–585.
- Dong, Y., Zeng, M., Zhang, B., Han, L., Liu, E., Lian, Z., Liu, J., Liang, C., and Zhang, S. (2017). Significance of imaging and clinical features in the differentiation between primary and secondary pulmonary lymphoma. *Oncol Lett* 14, 6224–6230.
- Dorsey, B.R., Kasimanickam, R., Whittier, W.D., Nebel, R.L., Wahlberg, M.L., and Hall, J.B. (2011). Effect of time from estrus to AI on pregnancy rates in estrous synchronized beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 1–6.
- Dziekonska, A., Fraser, L., and Strezezek, J. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *J Anim Feed Sci* 18, 638–49.
- Ebert, K.M., Selgrath, J.P., DiTullio, P., Denmen, J., Smith, T.E., Memon, M.A., Schindler, J.E., Monastersky, G.M., Vitale, J.A. an. G., and K. (1991). Transgenic production of variant human tissue type plasminogen activator in goat milk. Genneration of transgenic goat and analysis of expression. *Biotechnology* 9, 835–838.
- Eddy, E.M., Toshimori, K., and O’Brien, D.A. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc. Res. Tech.* 61, 103–115.
- Eisenbach, M., and Ralt, D. (1992). Precontact mammalian sperm-egg communication and role in fertilization. *Am. J. Physiol.* 262, C1095-1101.
- El-Harairy, M.A., Eid, L.N., Zeidan, A.E.B., Abd El-Salaam, A.M., and El-Kishk, M.A.M. (2011). Quality and fertility of the frozen–thawed bull semen as affected by the different cryoprotectants and glutathione levels. *J.Am. Sci* 7, 791–801.
- Elvin, J.A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., and Matzuk, M.M. (1999). Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol. Endocrinol.* 13, 1018–1034.
- Escoffier, J., Jemel, I., Tanemoto, A., Taketomi, Y., Payre, C., Coatrieux, C., Sato, H., Yamamoto, K., Masuda, S., Pernet-Gallay, K., et al. (2010a). Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 1415–1428.
- Escoffier, J., Couvet, M., de Pomyers, H., Ray, P.F., Sève, M., Lambeau, G., De Waard, M., and Arnoult, C. (2010b). Snake venoms as a source of compounds modulating sperm physiology: Secreted phospholipases A2 from *Oxyuranus scutellatus scutellatus* impact sperm motility, acrosome reaction and in vitro fertilization in mice. *Biochimie* 92, 826–836.
- Eswari, S., Sai Kumar, G. an. S., and G.T. (2013). Expression of mRNA encoding leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor (LIFR $\beta$ ) in buffalo preimplantation embryos produced in vitro: Markers of successful embryo implantation. *Zygote* 21, 203–213.
- Faustini, M. (2011). New aspects of boar sperm encapsulation. *Reprod. Domest. Anim* 46, 52–4.



- Ferrer, M., Rodriguez, H., Zara, L., Yu, Y., Xu, W., and Oko, R. (2012). MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization. *Cell Tissue Res.* 349, 881–895.
- Feugang, J.M., Rodriguez-Osorio, N., Kaya, A., Wang, H., Page, G., Ostermeier, G.C., Topper, E.K. an. M., and E. (2010). Transcriptome analysis of bull spermatozoa: Implications for male fertility. *Reprod. Biomed* 21, 312–324.
- Fiedler, S.E., Dudiki, T., Vijayaraghavan, S., and Carr, D.W. (2013). Loss of R2D2 proteins ROPN1 and ROPN1L causes defects in murine sperm motility, phosphorylation, and fibrous sheath integrity. *Biol. Reprod.* 88, 41.
- Fissore, R.A., Kurokawa, M., Knott, J., Zhang, M., and Smyth, J. (2002). Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction* 124, 745–754.
- Foot, R.H. (1999). Development of reproductive biotechnologies in domestic animals from artificial insemination to cloning: a perspective. *Cloning* 1, 133–142.
- Gad, A., Hoelker, M., Besenfelder, U., Havlicek, V., Cinar, U., Rings, F., Held, E., Dufort, I., Sirard, M.A., Schellander, K. an. T., et al. (2012). Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. *Biol. Reprod* 87, 1–13.
- Gadella, B.M., Tsai, P.-S., Boerke, A., and Brewis, I.A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 473–480.
- Garner, D.L. (2001). Sex-sorting mammalian sperm: Concept to application in animals. *J. Androl* 22, 519–526.
- Garner, D.L. (2006). Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65, 943–957.
- Gaviraghi, A., Puglisi, R., Balduzzi, D., Severgnini, A., Bornaghi, V., Bongioni, G., Frana, A., Gandini, L.M., Lukaj, A., Bonacina, C. an. G., et al. (2013). Minimum number of spermatozoa per dose in Mediterranean Italian buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed frozen semen and conventional artificial insemination. *Theriogenology*,79(8).
- George, A., Sharma, R., Singh, K.P., Panda, S.K., Singla, S.K., Palta, P., Manik, R. an. C., and M.S. (2011). Production of cloned and transgenic embryos using buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cell-like cells isolated from in vitro fertilized and cloned blastocysts. *Cell* 13, 263–272.
- Gibbons, I.R. (1981). Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell Biol.* 91, 107s-124s.
- Gillan, L., Maxwell, W.M., and Evans, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod Fertil Dev* 16, 447–54.
- Gosálvez, J., Núñez, R., Fernández, J.L., López-Fernández, C. an. C., and P. (2011a). Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. *Andrologia* 43, 373–377.
- Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gouraud, A. an. H., and W.V. (2011b).

Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol. Reprod. Dev* 78, 951–961.

Graf, A., Krebs, S., Zakhartchenko, V., Schwalb, B., Blum, H. an. W., and E. (2014a). Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 4139–4144.

Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H. an. W., and E. (2014b). Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Anim. Reprod. Sci* 149.

Guthrie, H.D., and Welch, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci* 84, 2089–100.

Hamamah, S., and Gatti, J.L. (1998). Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Hum. Reprod. 13 Suppl 4*, 20–30.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., and Nolan, J.P. (1990a). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11, 73–88.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., and Nolan, J.P. (1990b). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl* 11–73.

Harshan, H.M., Sankar, S., Singh, L.P., Singh, M.K., Sudharani, S., Ansari, M.R., Singh, S.K., Majumdar, A.C. an. J., and P. (2009). Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. *Anim. Reprod* 115, 306–311.

Herrler, A., Eisner, S., Bach, V., Weissenborn, U., and Beier, H.M. (2006). Cryopreservation of spermatozoa in alginate acid capsules. *Fertil Steril.*

Ho, H.C., Granish, K.A., and Suarez, S.S. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by  $Ca^{2+}$  and not cAMP (*Dev Biol*).

Hodgson, E.K., and Fridovich, I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 14, 5294–5299.

Hoganson, D.A., and Stahly, D.P. (1975). Regulation of dihydrodipicolinate synthase during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 124, 1344–1350.

Hu, J.H., Zan, L.S., Zhao, X.L., Li, Q.W., Jiang, Z.L., Li, Y.K., and Li, X. (2010). of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen–thawed bovine semen. *J. Anim. Sci* 88–1657.

Hyttel, P., Callesen, H., and Greve, T. (1989). A comparative ultrastructural study of in vivo versus in vitro fertilization of bovine oocytes. *Anat. Embryol.* 179, 435–442.

Ickowicz, D., Finkelstein, M., and Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J. Androl.* 14, 816–821.

Inaba, K. (2007). Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1101, 506–526.

- Inaba, K., and Mizuno, K. (2016). Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reprod. Med. Biol.* *15*, 77–94.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., and Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* *434*, 234–238.
- Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M., and Yanagimachi, R. (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 20008–20011.
- Inoue, N., Hamada, D., Kamikubo, H., Hirata, K., Kataoka, M., Yamamoto, M., Ikawa, M., Okabe, M., and Hagihara, Y. (2013). Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* *140*, 3221–3229.
- Ishijima, S. (2015). Ca<sup>2+</sup> and cAMP regulations of microtubule sliding in hyperactivated motility of bull spermatozoa. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* *91*, 99–108.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K., and Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 4892–4896.
- JM1, D., CR, M., MA, L., JF, M., RL, N., and CE, M. Effects of 2.1 and 3.5x10(6) sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *J Dairy Sci.*
- Johnson, L.A. (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: The state-of-the-art. *Anim. Reprod. Sci* *60*, 93–107.
- Kalous, J., Tetkova, A., Kubelka, M., and Susor, A. (2018). Importance of ERK1/2 in Regulation of Protein Translation during Oocyte Meiosis. *Int J Mol Sci* *19*.
- Kantsler, V., Dunkel, J., Blayney, M., and Goldstein, R.E. (2014). Correction: Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *Elife* *3*, e03521.
- Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Tibary, A., and Pelzer, K. (2011). Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Rumin. Res* *99*, 208–213.
- Kaupp, U.B. (2012). 100 years of sperm chemotaxis. *J. Gen. Physiol.* *140*, 583–586.
- Kaupp, U.B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J.E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni, F., and Weyand, I. (2003). The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nat. Cell Biol.* *5*, 109–117.
- Knowlton, M., Sadasivam, M. an. T., and S. (2015). Microfluidics for sperm research. *Trends Biotech* *4*.
- Kodama, H., Kuribayashi, Y., and Gagnon, C. (1996). Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J. Androl* *17*, 151–157.
- de Lamirande, E., Harakat, A., and Gagnon, C. (1998a). Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the

production of superoxide anion. *J. Androl.* *19*, 215–225.

de Lamirande, E., Harakat, A., and Gagnon, C. (1998b). Human spermi-capacitation induced by biological fluids and progesterone but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J. Androl* *19*, 215–225.

Langlais, J., and Roberts, K.D. (1985). A molecular model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete* *12*, 183–224.

Latham, K.E. and S., and R.M. (2001). Embryonic genome activation. *Front. Biosci* *6*, 748–759.

Layek, S.S., Mohanty, T.K., Kumaresan, A., and Parks, J.E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science* *172*, 1–9.

Lin, Y., and Kan, F.W. (1996). Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol. Reprod.* *55*, 1133–1146.

Lindemann, C.B. (1996). Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motil. Cytoskeleton* *34*, 258–270.

Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Fedorenko, A., and Kirichok, Y. (2010). Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* *140*, 327–337.

Luzzo, K.M., Wang, Q., Purcell, S.H., Chi, M., Jimenez, P.T., Grindler, N., Schedl, T., and Moley, K.H. (2012). High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects. *PLoS ONE* *7*, e49217.

M1, V. (Jan). Poels J1,2, de Michele F1,2, des Rieux A3,4, Wyns C5,6. Restoring Fertility with Cryopreserved Prepubertal Testicular Tissue: Perspectives with Hydrogel Encapsulation, Nanotechnology, and Bioengineered Scaffolds. *Ann Biomed Eng.* 2017 Jul;45(7):1770-1781. p.

M1, S., D, B., T, C., C, V., S, P., R, C., D, V., C, T., G, G., M, F., et al. (2013). Boar sperm changes after sorting and encapsulation in barium alginate membranes. *Theriogenology*. p.

Macaulay, A.D., Gilbert, I., Scantland, S., Fournier, E., Ashkar, F., Bastien, A., Saadi, H.A.S., Gagné, D., Sirard, M.-A., Khandjian, É.W., et al. (2016). Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation. *Biol. Reprod.* *94*, 16.

Malo, A.F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A.J., and Roldan, E.R.S. (2006). Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* *2*, 246–249.

Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Martinez, F., Cano, R., de Blas, I., and Espinosa, E. (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation. Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*).

Marniemi, J., and Parkki, M.G. (1975). Radiochemical assay of glutathione S-epoxide transferase and its enhancement by phenobarbital in rat liver in vivo. *Biochem. Pharmacol.* *24*, 1569–1572.

- Mazur, P., and Katkova, N. Critser JK. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation (oxyrase) to lower the oxygen concentration.
- McNeil, E.S. (2005). Nanotechnology for the biologist. *J. Leukoc. Biol* 78, 1–10.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveria, A.T.D., and Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*.
- Memili, E., Dominko, T., and First, N.L. (1998). Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 36–41.
- Miki, K., Willis, W.D., Brown, P.R., Goulding, E.H., Fulcher, K.D., and Eddy, E.M. (2002). Targeted disruption of the *Akap4* gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev. Biol.* 248, 331–342.
- Miller, D. (2014). Sperm RNA as a mediator of genomic plasticity. Article ID 179701, 13.
- Miyashita, M., Otsuki, J., Hanai, Y., Nakagawa, Y., and Miyagawa, H. (2007). Characterization of peptide components in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* (Hemiscorpiidae). *Toxicon* 50, 428–437.
- Mora, J.M., Fenwick, M.A., Castle, L., Baithun, M., Ryder, T.A., Mobberley, M., Carzaniga, R., Franks, S., and Hardy, K. (2012). Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 86, 153, 1–14.
- Muino, R., Fernandez, M., and Pena, A.I. (2007). Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod. Domest. Anim* 42, 305–311.
- Muller, K., Pomorski, T., Muller, P., and Herrmann, A. (1999). Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J. Cell Sci* 112, 11–20.
- Myers, M., Britt, K.L., Wreford, N.G.M., Ebling, F.J.P., and Kerr, J.B. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction* 127, 569–580.
- Narisawa, S., Hecht, N.B., Goldberg, E., Boatright, K.M., Reed, J.C., and Millán, J.L. (2002). Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5554–5562.
- Nath, A., Sharma, V., Dubey, P.K., Pratheesh, M.D., Gade, N.E., Saikumar, G. an. S., and G.T. (2013). Impact of gonadotropin supplementation on the expression of germ cell marker genes. *Biol. Anim* 49, 34–41.
- Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J.-J., and Clapham, D.E. (2008). Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 607–613.
- Newell, A.E.H., Fiedler, S.E., Ruan, J.M., Pan, J., Wang, P.J., Deininger, J., Corless, C.L., and Carr, D.W. (2008). Protein kinase A RII-like (R2D2) proteins exhibit differential localization and AKAP interaction. *Cell Motil. Cytoskeleton* 65, 539–552.
- Niemann, H. an. K., and W.A. (2003). Application of transgenesis in livestock for agriculture

and biomedicine. *Anim.Reprod. Sci* 79, 291–317.

Niemann, H. an. W., and C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology* 53, 21–34.

Nieto, M., Muñoz, E., Carreira, J., and Andreu, J.M. (1975). Conformational and molecular responses to pH variation of the purified membrane adenosine triphosphatase of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochim. Biophys. Acta* 413, 394–414.

Norman, H.D., Hutchison, J.L., and Miller, R.H. (2010). Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *J. Dairy Sci.* 93, 3880–3890.

Nothias, J.Y., Majumder, S., Kaneko, K.J., and DePamphilis, M.L. (1995). Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J. Biol. Chem.* 270, 22077–22080.

Oko, R. (1988). Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 39, 169–182.

Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T., Yamamoto, S., Erickson, G.F., and Shimasaki, S. (2000). Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J. Biol. Chem.* 275, 39523–39528.

Otsuka, F., McTavish, K.J., and Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 9–21.

Pankaj, P.K. (2006). Study of Critical Control Points Associated with Cryopreservation of Bovine Semen. M.V.Sc. Thesis (NDRI, Karnal).

Parks, J.E., and Graham, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogen* 38, 209–222.

Parks, J.E., and Lynch, D.V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes (Cryobiology).

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A., and First, N.L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171–1180.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., and Graham, J.K. (1999). In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology* 51 461–472.

Parry, W.H., Martorano, F., and Cotton, E.K. (1976). Management of life-threatening asthma with intravenous isoproterenol infusions. *Am. J. Dis. Child.* 130, 39–42.

Peddinti, D., Nanduri, B., Kaya, A., Feugang, J.M., Shane, C.B. an. M., and E. (2008). Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst. Biol* 2, 19.

Pereira, R., Sá, R., Barros, A., and Sousa, M. (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl* 19, 5–14.

- Perreault, S.D., and Rogers, B.J. (1982). Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 38, 258–260.
- Perteghella, S., Gaviraghi, A., Cenadelli, S., Bornaghi, V., Galli, A., Crivelli, B., Vigani, B., D3, V., Chlapanidas, T., Faustini, M., et al. Alginate encapsulation preserves the quality and fertilizing ability of Mediterranean Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Holstein Friesian (*Bos taurus*) spermatozoa after cryopreservation. *J Vet Sci.* 2017 Mar 30;18(1):81-88.
- Perteghella, S., Vigani, B., Crivelli, B., Spinaci, M., Galeati, G., Bucci, D., Vigo, D., Torre, M.L., and Chlapanidas, T. Sperm Encapsulation from 1985 to Date. In *Technology Evolution and New Challenges in Swine Reproduction*. *Reprod Domest Anim.* 2015 Jul;50 Suppl, pp. 98–102.
- Peterson, D.L., Gleisner, J.M., and Blakley, R.L. (1975). Bovine liver dihydrofolate reductase: purification and properties of the enzyme. *Biochemistry* 14, 5261–5267.
- Phillips, D.M. (1977). Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J. Ultrastruct. Res.* 144–154.
- Pietrobon, E.O., Monclus, M. de los A., Alberdi, A.J., and Fornés, M.W. (2003). Progesterone receptor availability in mouse spermatozoa during epididymal transit and capacitation: ligand blot detection of progesterone-binding protein. *J. Androl.* 24, 612–620.
- Ponce, R.H., Urch, U.A., and Yanagimachi, R. (1994). Inhibition of sperm-egg fusion in the hamster and mouse by carbohydrates. *Zygote* 2, 253–262.
- Publicover, S.J., and Barratt, C.L.R. (2011). Sperm motility: things are moving in the lab! *Mol. Hum. Reprod.* 17, 453–456.
- Purcell, S.H., Chi, M.M., Lanzendorf, S., and Moley, K.H. (2012). Insulin-stimulated glucose uptake occurs in specialized cells within the cumulus oocyte complex. *Endocrinology* 153, 2444–2454.
- Quintero-Hernández, V., Ramírez-Carreto, S., Romero-Gutiérrez, M.T., Valdez-Velázquez, L.L., Becerril, B., Possani, L.D., and Ortiz, E. (2015). Transcriptome analysis of scorpion species belonging to the *Vaejovis* genus. *PLoS ONE* 10, e0117188.
- Rajhans, R., Kumar, G.S., Dubey, P.K. an. S., and G.T. (2010). Effect of timing of development on total cell number and expression profile of HSP-70.1 and GLUT-1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes and preimplantation embryos produced in vitro. *Cell Biol. Int* 34, 463–468.
- Rao, K.B., Pawshe, C.H. an. T., and S.M. (1993). Sex determination of in vitro developed buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos by DNA amplification. *Mol. Reprod. Dev* 36, 291–296.
- Ravaux, B., Garroum, N., Perez, E., Willaime, H., and Gourier, C. (2016). A specific flagellum beating mode for inducing fusion in mammalian fertilization and kinetics of sperm internalization. *Sci Rep* 6, 31886.
- Reith, S., and Hoy, S. (2018). Review: Behavioral signs of estrus and the potential of fully automated systems for detection of estrus in dairy cattle. *Animal* 12, 398–407.
- Renaud, B., Buda, M., Lewis, B.D., and Pujol, J.F. (1975). Effects of 5,6-dihydroxytryptamine

on tyrosine-hydroxylase activity in central catecholaminergic neurons of the rat. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1739–1742.

Reynaud, K. (2003). Le dialogue ovocyte-granulosa au cours de la folliculogénèse. *Médecine Thérapeutique / Endocrinologie* 5, 85–93.

Richard, F.J. (2007). Regulation of meiotic maturation. *J. Anim. Sci.* 85, E4-6.

Rishpon, J. an. I., and D. (1997). An amperometric enzyme channeling immunosensor. *Biosens* 12, 195–204.

RL1, N., and RG, S. Technology and applications for encapsulated spermatozoa. *Biotechnol Adv* 1.

Robertson, L., Bailey, J.L., and Buhr, M.M. (1990). Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev* 26, 143–149.

Robl, J.M., Wang, Z., Kasinthan, P. an. K., and Y. (2007). Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology* 67, 127–133.

Roldan, E.R., Murase, T., and Shi, Q.X. (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266, 1578–1581.

Rossato, M., La Sala, G.B., Balasini, M., Taricco, F., Galeazzi, C., Ferlin, A., and Foresta, C. (1999). Sperm treatment with extracellular ATP increases fertilization rates in in-vitro fertilization for male factor infertility. *Hum. Reprod.* 14, 694–697.

Salicioni, A.M., Platt, M.D., Wertheimer, E.V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., and Visconti, P.E. (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 245–259.

Samper, J.C., Hellander, J.C., and Crabo, B.G. (1991). Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J Reprod Fertil Suppl.*

Sarıözkan, S., Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Ulutas, P.A., and Bilgen, A. (2009). influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 58, 134–138.

Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K., and Lai, F.A. (2002). PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129, 3533–3544.

Seidel, G.E., Jr (2014). Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 8, 160–164.

Selokar, N.L., Saini, M., Palta, P., Chauhan, M.S., Manik, R.S. an. S., and S.K. (2014). Hope for restoration of dead valuable bulls through cloning using donor somatic cells isolated from cryopreserved semen. *PLoS One* 9.

Seydoux, G., and Braun, R.E. (2006). Pathway to totipotency: lessons from germ cells. *Cell* 127, 891–904.



Shah, R.A., George, A., Singh, M.K., Kumar, D., Chauhan, M.S., Manik, R., Palta, P. an. S., and S.K. (2008). Hand-made cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos: Comparison of different media and culture systems. *Cloning Stem Cells* 10, 435–442.

Shah, R.A., George, A., Singh, M.K., Kumar, D., Anand, T., Chauhan, M.S., Manik, R.S., Palta, P. an. S., and S.K. (2009). Pregnancies established from handmade cloned blastocysts reconstructed using skin fibroblasts in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 71, 1215–1219.

Shahiduzzaman, A.K.M., and Linde-Forsberg, C. (2007). Induced immotility during long-term storage at +5 degrees C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 68, 920–933.

Shao, X., Tarnasky, H.A., Schalles, U., Oko, R., and van der Hoorn, F.A. (1997). Interactional cloning of the 84-kDa major outer dense fiber protein Odf84. Leucine zippers mediate associations of Odf84 and Odf27. *J. Biol. Chem.* 272, 6105–6113.

Sharma, G.T., Nath, A., Prasad, S., Singhal, S., Singh, N., Gade, N.E., Dubey, P.K. an. S., and G. (2012). Expression and characterization of constitutive heat shock protein 70.1 (HSPA-1A) gene in in vitro produced and in vivo-derived buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod. Dom. Anim* 47, 975–983.

Sheldon, T.J., Miguel-Aliaga, I., Gould, A.P., Taylor, W.R., and Conklin, D. (2007). A novel family of single VWC-domain proteins in invertebrates. *FEBS Lett.* 581, 5268–5274.

Singh, A.K., Singh, V.K., Narwade, B.M., Mohanty, T.K., and Atreja, S.K. (2012). quality assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk- and soya milk—based extenders. *Reprod.Domest. Anim* 47, 596–600.

Singla, S.K., Selokar, N.L., Saini, M., Palta, P., Chauhan, M.S. an. M., and R.S. (2015). Buffalo cloning: What we have achieved so far. *Curr. Sci* 109, 670–671.

Smitz, J.E.J., and Cortvrindt, R.G. (2002). The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 123, 185–202.

Sood, S.K., Chauhan, M.S. an. T., and O.S. (2001). A direct duplex PCR assay for sex determination of Murrah buffalo embryos. *Buffalo J* 17, 113–124.

Srivastava, J., Premi, S., Kumar, S. an. A., and S. (2008). Organization and differential expression of the GACA/GATA tagged somatic and spermatozoal transcriptomes in buffalo *Bubalus bubalis*. *BMC Genomics* 9, 132.

Srivastava, N., Jerome, A., Srivastava, S.K., Ghosh, S.K. an. K., and A. (2013). Bovine seminal PDC-109 protein: An overview of biochemical and functional properties. *Anim. Reprod. Sci* 138, 1–13.

St Johnston, D. (1995). The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81, 161–170.

Standerholen, F.B., Waterhouse, K.E., Larsgard, A.G., Garmo, R.T., Myromslien, F.D., Sunde, J., Ropstad, E., Klinkenberg, G., and Kommisrud, E. (2015). Use of immobilized cryopreserved bovine semen in a blind artificial insemination trial. *Theriogenology* 84, 413–420.

Stradaoli, G., Noro, T., Sylla, L., and Monaci, M. (2007). Decrease in glutathione(GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology* 15, 1249–1255.

Tasdemir, U., Buyukleblebici, S., Tuncer, P.B., Coskun, E., Ozgurtas, T., Aydın, F.N., Buyukleblebici, O., and Gurcan, I.S. (2013). Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology* 66, 38–42.

Teketel23 (02:41:11 UTC). Molecular basis of fertilization.

Tesfaye, D., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Gilles, M. an. S., and K. (2004). A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo. *Reprod. Domest. Anim* 39, 396–404.

Thibier, M. an. N., and M. (1995). The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43, 71–80.

Thibier, M., and Guerin, B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci* 62, 1–3.

Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A., Ferial, M.L., Ducot, B., Lansac, J., Lopes, P., Tabaste, J.M., and Spira, A. (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum. Reprod.* 6, 811–816.

Tomek, W., Torner, H., and Kanitz, W. (2002). Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod. Domest. Anim.* 37, 86–91.

Tuncer, P.B., Bucak, M.N., Büyükleblebici, S., Sarıözkan, S., Yeni, D., Eken, A., Akalın, P.P., Kinet, H., Avdatek, F., Fidan, A.F., et al. (2010). The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen.

Tung, K.K., and Wood, W.A. (1975). Purification, new assay, and properties of coenzyme A transferase from *Peptostreptococcus elsdenii*. *J. Bacteriol.* 124, 1462–1474.

Turner, R.M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J Androl* 24, 790–803.

Turner, T.T., and Giles, R.D. (1982). Sperm motility-inhibiting factor in rat epididymis. *Am. J. Physiol.* 242, R199-203.

TW1, M., RL, N., and RG, S. (1992). Accessory sperm numbers for cattle inseminated with protamine sulfate microcapsules. *J Dairy.*

Upreti, G.C., Jensen, K., Munday, R., Duganzich, D.M., Vishwanath, R., and Smith, J.F. (1998). Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim. Reprod.Sci* 51, 275–287.

Usselman, M.C., and Cone, R.A. (1983). Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by “immobilin,” a high molecular weight glycoprotein. *Biol. Reprod.* 29, 1241–1253.

- Vajta, G. an. G., and M. (2006). Science and technology of farm animal cloning: State of the art. *Anim. Reprod. Sci* 92, 211–230.
- Verma, O.P., Kumar, R., Kumar, A. an. C., and S. (2012). Assisted reproductive techniques in farm animal – From artificial insemination to nanobiotechnology. *Vet. World* 5, 301–310.
- Verma, V., Gautam, S.K., Palta, P., Manik, R.S., Singla, S.K. an. C., and M.S. (2008). Development of a pronuclear DNA microinjection technique for production of green fluorescent protein-expressing bubaline (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology* 69, 655–665.
- Visconti, P.E., Ning, X., Fornés, M.W., Alvarez, J.G., Stein, P., Connors, S.A., and Kopf, G.S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* 214, 429–443.
- Visconti, P.E., Krapf, D., de la Vega-Beltrán, J.L., Acevedo, J.J., and Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* 13, 395–405.
- Vishwanath, R. (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 59, 571–584.
- Wall, R.J. (1996). Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45, 57–68.
- Wambergue, C., Zouari, R., Fourati Ben Mustapha, S., Martinez, G., Devillard, F., Hennebicq, S., Satre, V., Brouillet, S., Halouani, L., Marrakchi, O., et al. (2016). Patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella due to DNAH1 mutations have a good prognosis following intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 31, 1164–1172.
- Warriach, H.M., McGill, D.M., Bush, R.D., Wynn, P.C. an. C., and K.R. (2015). A review of recent developments in buffalo reproduction - A review. *Asian Aust. J. Anim. Sci* 28, 451–455.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev* 7, 871–891.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci* 60, 481–492.
- Wells, D.J. (2010). Genetically modified animals and pharmacological research. *Handb. Exp* 199, 213–216.
- Witte, T.S., and Schäfer-Somi, S. (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 181–193.
- Yue, X.-P., Dechow, C., and Liu, W.-S. (2015). A limited number of Y chromosome lineages is present in North American Holsteins. *J. Dairy Sci.* 98, 2738–2745.
- Zanetti, N., and Mayorga, L.S. (2009). Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 81, 396–405.

Zoheir, K.M.A. an. A., and A.A. (2010). A rapid method for sexing the bovine embryo Anim. Reprod. Sci 119.

(2009). Influence of various antioxidants on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen. Acta Vet.

(2010).

(2015a). AK3. Seminal plasma and serum fertility biomarkers in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). Theriogenology.

(2015b). male fertility using fertility-related biomarkers. Sci Rep.

A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. Anim. Reprod. Sci 108-298.

bovins\_20103.pdf.

in vitro evaluation of liquid-stored Buffalo semen at 5°C diluted in soya lecithin based extender (Bioxcell®) tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. Reprod. Domest. Anim 46, 45-49.

# Annexes

# ANNEXE 1

ARTICLE SOUMIS SUR LA  
MOLECULE CLOFILIUM



## Slo3 K<sup>+</sup> channel inhibitors extend sperm survival and fertilizing competence

Journal:	<i>Reproduction</i>
Manuscript ID	Draft
mstype:	Research paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Abi Nahed, Roland; Institute for advanced Biosciences, GETI Martinez, Guillaume; Institute for advanced Biosciences, GETI Hograindleur, Jean-Pascal; Institute for advanced Biosciences, GETI Le Blévec, Emilie; Institute for advanced Biosciences, GETI Escoffier, Jessica; Institute for advanced Biosciences, GETI Camugli, Sabine; IMV technologies, R&D Le Boucher, Richard; IMV technologies, R&D Ray, Pierre; Institute for advanced Biosciences, GETI Schmitt, Eric; IMV-Technologies, R&D ARNOULT, christophe; Institute for advanced Biosciences, GETI
Keywords:	Sperm, Sperm maturation, sperm lifespan, capacitation

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Only

# Slo3 K<sup>+</sup> channel inhibitors extend sperm survival and fertilizing competence in mouse and bovine species

Short title "K<sup>+</sup> channel inhibitors extend sperm lifespan"

Roland Abi Nahed<sup>1,2,#</sup>, Guillaume Martinez<sup>1,2,#</sup>, Jean Pascal Hograindleur<sup>1,2</sup>, Emilie Le Blévec<sup>1,2</sup>, Jessica Escoffier<sup>1,2</sup>, Sabine Camugli<sup>3</sup>, Richard Le Boucher<sup>3</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2,4</sup>, Eric Schmitt<sup>3</sup> and Christophe Arnoult<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Université Grenoble Alpes, Grenoble, F-38000, France

<sup>2</sup> Institute for Advanced Biosciences INSERM U1209, CNRS UMR5309, Grenoble, F-38000, France

<sup>3</sup> IMV technologies, ZI N° 1 Est, F-61300 L'Aigle

<sup>4</sup> CHU Grenoble Alpes, UF de Biochimie Génétique et Moléculaire, Grenoble, F-38000, France

# these authors contributed equally to this work

\*, To whom correspondence should be addressed: Christophe Arnoult, Team "Genetics, Epigenetics and Therapies of Infertility", Institute for Advanced Biosciences (IAB), INSERM 1209, CNRS UMR 5309



University Grenoble Alpes, Grenoble, FRANCE. Contact: christophe.arnoult@univ-grenoble-alpes.fr

tel: 33 (0)4 76 63 74 08

key words: sperm lifespan, capacitation, Slo3 potassium channel, clofilium, quinidine, fertilization, sperm motility, sperm aging

For Review Only

## Abstract

For artificial insemination (AI) to be successful, it is essential that sperm delivery be perfectly timed relative to ovulation, as sperm lifespan is limited due to oxidative metabolism induced by capacitation. Extending the window of sperm capacitation could therefore increase sperm lifespan, prolong sperm fertilizing competence and increase AI efficiency. Hyperpolarization of sperm is a crucial step in capacitation and is induced by activation of the potassium calcium-activated channel subfamily U member 1 (KCNU1, also named Slo3 or KSper). Given the essential role played by KCNU1 in capacitation, this study assessed the impact of its pharmacological inhibition on sperm lifespan. We showed that treatment of murine sperm with sub-micromolar concentrations of clofilium, a specific inhibitor of KCNU1, slowed down capacitation, decreased the rate of acrosome reaction and extended the fertilizing competence of capacitated sperm for 12 h. Clofilium also extended bovine sperm survival, and increased the rate of mobility and fertilization with sperm capacitated for 24 h by 200%, and the rate of blastocyst formation by 250%. Finally, toxicity experiments showed clofilium to have no impact on sperm DNA and no embryotoxicity at the concentration used to extend sperm lifespan. Our results demonstrate that clofilium prolongs sperm survival and improves fertilizing competence of aging capacitated sperm *in vitro* in both rodent and bovine species. Clofilium may also prolong sperm lifespan *in vivo*. To our knowledge, this is the first time sperm survival has been linked to control of sperm membrane potential.

## Introduction

Artificial insemination (AI) is the main method of reproduction used in dairy cattle worldwide. This assisted reproductive technology has several advantages, including rapid genetic selection of the best breeders. As a result, milk production per cow has increased tremendously in the last 40 years. Nevertheless, a simultaneous decrease in reproductive performance was observed in many countries, with a drop in pregnancy rate from 65% in 1951 to 40% in 1996 (Butler 1998). The trend continues, and a recent assessment of records from 9 million AI on Holstein cows performed in the US revealed a current pregnancy rate of around 32% (Norman *et al.* 2009). Any improvement to the technology could therefore have a significant impact. An essential factor for successful AI is the timing of sperm delivery, which must be optimized relative to ovulation. Unfertilized oocytes have a very limited lifespan, engaging apoptosis just a few hours after ovulation, they must therefore be fertilized very rapidly after ovulation (Fissore *et al.* 2002). However, sperm have to complete their capacitation (a mandatory maturation step) at the utero-tubal junction before reaching the fertilization point located within the upper oviduct. This process, necessary to obtain competent sperm, means that insemination must take place before ovulation. However, the lifespan of sperm within the female reproductive tract is limited, and it is therefore considered that AI should be performed not more than 6-24 hours prior to ovulation (Dorsey *et al.* 2011). For these reasons, the detection of ovulation is a key parameter for the success of AI. Although a number of efficient technologies have been developed to accurately detect ovulation, many farmers continue to use behavioral indicators such as mounting, sniffing, or/and aggressive behavior to detect ovulation (Reith & Hoy 2017). These indicators are

simple and cheap to detect for farmers but remain time-consuming and imprecise, therefore resulting in suboptimal timing of AI and decreased pregnancy rates. Consequently, the economic sustainability of the milk farms is impacted. Extending sperm lifespan within the female reproductive tract, i.e., in the uterine fluid rich in proteins and at 38.5°C, conditions that trigger capacitation, could be an interesting approach to extend the duration of the optimal window for oocyte and sperm interaction.

Capacitation, which occurs *in vivo* in the female reproductive tract, is a necessary maturation step involving remodeling of lipids and proteins (Austin 1952). One of the first events in capacitation corresponds to the loss of cholesterol from the plasma membrane, leading to an increase in plasma membrane fluidity (Travis & Kopf 2002). The altered membrane fluidity in turn activates calcium and bicarbonate influx through, as yet, poorly characterized channels/transporters (Salicioni *et al.* 2007). Numerous actors such as kinases and phosphatases are activated downstream, and their respective molecular pathways are the subjects of intense investigation. Capacitation is also associated with an increase in oxidative levels within the cell, which is necessary for sperm capacitation and to stimulate cholesterol removal, cAMP production and kinase A activation, all of which are required to complete this maturation stage. Reactive oxygen species (ROS) can originate either from fluids produced by the accessory sexual glands or can be generated in the spermatozoon itself. External ROS cause lipid peroxidation, which stimulates further ROS production by sperm mitochondria. ROS produced by mitochondria induce lipid peroxidation, thus maintaining a strong oxidative stress cycle within the sperm (Aitken & Curry 2011, Aitken 2017). This continuous oxidative stress is ultimately deleterious for sperm lipids and DNA, leading to severe cell damage, loss of sperm motility and commitment of sperm towards apoptosis, thus negatively impacting their lifespan (Storey 1997). Capacitation and its associated metabolism are therefore

considered as key factors limiting sperm lifespan. However, in bovine reproduction, sperm physiology is not the only factor reducing the lifespan of sperm. Indeed, sperm is also altered during handling and cryopreservation, which is extensively used for this species (Leahy & Gadella 2011). Despite the use of optimized freezing media containing components known to protect sperm from damage during freeze-thawing, many sperm cells die during this process, and the surviving cells present altered physiology and accelerated capacitation. Because capacitation represents a major cause of limited sperm lifespan, this study aimed to evaluate how its inhibition affects sperm lifespan.

Sperm are maintained inactive in the epididymis for relatively long periods of time (1 to 2 weeks, depending on the species). When sperm are released into the female reproductive tract, the change in ionic environment is a physiological trigger, and sperm start their capacitation process. Ion channels are particularly sensitive to changes in ionic environment which play a crucial role in triggering sperm changes. They thus represent potential targets to slow down capacitation and increase sperm lifespan. Sperm present an amazing array of ion channels which are involved in several physiological steps such as regulation of membrane potential, capacitation and the acrosome reaction (AR). All of these critical steps in sperm physiology are required for fertilization (Shukla *et al.* 2012, Santi *et al.* 2013). For example, the pH-dependent potassium ion ( $K^+$ ) current channel (Kcnu1, also known as Slo3) (Santi *et al.* 2010, Brenker *et al.* 2014), the voltage-gated sodium channel (Nav1.1–1.9) and many other ion channels (CatSper1, Hv1 etc...) play indispensable roles in sperm physiology and represent potential targets. Voltage-gated potassium ion channels play a vital role in the control of membrane potential, which is a good marker of capacitation. Indeed, the resting membrane potential of non-capacitated murine spermatozoa is approximately -40 mV and drops to less than -80 mV after capacitation (Arnoult *et al.* 1999). Hyperpolarization of the

plasma membrane is due to activation of the sperm-specific delayed rectifier K<sup>+</sup> channel, KCNU1 (Navarro *et al.* 2007). KCNU1, is essential to sperm physiology, and KCNU1 knock-out males are completely infertile (Santi *et al.* 2010, Zeng *et al.* 2011). Given the significant role played by this channel in capacitation, we evaluated the impact of its pharmacological inhibition on sperm lifespan.

For Review Only

## Methods

### Animals and Biological samples

All animal procedures were performed in line with the French guidelines on the use of live animals in scientific investigations and according to procedures approved by the local Ethics Committee. OF1 male mice were purchased from Charles River (Les Oncins, France), and were 2-6 months old when experiments were performed. Sperm from caudae epididymides were allowed to swim for 10 min at 37 °C in 1 ml of M2 medium (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). Sperm were centrifuged at 500 g before washing twice with M16 medium (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France), and adjusting their concentration for further use.

For bovine samples, ovaries were collected at the slaughterhouse. Bovine sperm was obtained by ejaculation at the OrigenPlus technical center (L'Aigle, France). Ejaculate was diluted 1:1 in Optixcell (IMV technologies, L'Aigle, France). After 10 minutes' incubation at 34 °C, semen was diluted to a final concentration of 57 million spermatozoa/mL in Optixcell. Optixcell is a TRIS citrate buffer containing liposomes extruded from egg yolk lecithins, glycerol and antibiotics. Diluted semen was slowly cooled to 4 °C (3 to 4 h equilibration in a tempered water-bath), 0.25 mL straws were filled and then frozen in a controlled-rate freezer at a cooling rate of 5 °C/min from 4 °C to -10 °C, 40 °C/min from -10 °C to -110 °C, 15 °C/min from -110 °C to -140 °C/min. Straws were then stored in liquid nitrogen until required for in vitro fertilization.

Straws containing clofilium were obtained as described above. Bovine ejaculate was split into two fractions, and diluted 1:1 either in Optixcell (Fraction 1) or in Optixcell containing clofilium 0.2 µM (Fraction 2). After 10 minutes' incubation at 34 °C, semen was diluted to a final concentration of 57 million spermatozoa/ml in Optixcell (Fraction 1) or Optixcell

containing clofilium 0.2  $\mu$ M (Faction 2). Diluted semen was frozen as described above and stored in liquid nitrogen until required for in vitro fertilization.

#### Western blots and capacitation assessment

After treatment, sperm were collected by centrifugation, washed, resuspended in Laemmli sample buffer without  $\beta$ -mercaptoethanol, and boiled for 5 minutes. After centrifugation, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol was added to the supernatants, and the mixture was again boiled for 5 minutes. Protein extracts equivalent to 1–2  $\times 10^6$  sperm were loaded per lane and subjected to SDS-PAGE prior to electro-transfer onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore) at 250 mA for 60 minutes on ice. Membranes were treated with 20% fish skin gelatin (Sigma) in PBS-T, then incubated for one hour at room temperature with anti-Phosphotyrosine Antibody (clone 4G10, Millipore, Molsheim, France) (1: 10,000); followed by incubation for 1 h with a horseradish peroxidase-labeled secondary antibody. Immunoreactivity was revealed using chemiluminescence detection kit reagents and a Chimidoc<sup>TM</sup> Station (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

#### Acrosome reaction assessment

After capacitation, mouse sperm were fixed with 4% paraformaldehyde. Sperm were washed (100 mM ammonium acetate, 2 minutes), wet-mounted on slides, and air dried. Slides were then rinsed with water and stained with Coomassie blue (0.22%). Slides were analyzed, and at least 150 sperm cells were scored per condition.

#### Mouse in vitro fertilization and embryo development

Mouse sperm, obtained by manual trituration of caudae epididymides in M2 (10 min), were incubated as indicated:



For non-capacitating conditions. Sperm were incubated in M16 medium at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for various times, as specified. Sperm were then capacitated in M16 medium containing 2% fatty acid-free Bovine Serum Albumin (BSA) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for one hour, and then used for in vitro fertilization (IVF).

For capacitating conditions. Sperm were incubated in M16 medium with 2% fatty acid-free BSA at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for various times, as specified, before using for IVF.

Oocytes were collected from mature OF1 females, synchronized by exposure to 5 units of pregnant mare serum Gonadotropin (PMSG) and 5 units of human chorionic Gonadotropin (hCG). Washed sperm were introduced into droplets containing 25 to 50 oocytes. Oocytes were incubated with:  $1.5 \times 10^5$  to  $5 \times 10^5$  capacitated sperm/ml (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) in M16 medium, and unbound sperm were washed away after 4 h incubation. As an indication of successful fertilization, the number of 2-cell embryos were scored 24 h after insemination.

#### Bovine IVF and embryo development

##### Sperm preparation and motility assessment

Bovine sperm straws were obtained as explained above, and were stored in liquid nitrogen prior to in vitro fertilization. Straws containing clofilium were obtained as described above.

Straws were thawed in a water-bath at 37 °C for 45 s. Each straw was wiped with 70° ethanol before opening. The 0.25 mL thawed semen from each straw was layered under 4 mL of Sp-TALP capacitation medium (NaCl 114.0 mM; KCl 3.2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 mM; Na Lactate 60% 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM; HEPES 10 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; Na Pyruvate 1 mM and gentamicin 50 µg/mL; adjusted to pH 7.4 with 6 mg/mL BSA and 2 µg/mL heparin) in a 15 mL conical tube.

Sperm was centrifuged and resuspended in 4 mL Sp-TALP capacitation medium with or without clofilium (0.2  $\mu$ M). Sperm was stored at 37 °C under saturated humidity for 0 h or 24 h.

For motility tests, sperm were incubated with 0.2, 0.5, 1 and 5  $\mu$ M clofilium diluted in the capacitation medium for 24 h at 37 °C under saturating humidity. Sperm motility was measured using Computer Assisted Semen Analysis (CASA), performed using a CEROS<sup>TM</sup>, Hamilton Thorne Bioscience, USA.

#### Fertilization step

At the end of the incubation period, sperm were centrifuged, and the pellet was resuspended in 100  $\mu$ L of the solution remaining in the tube. Sperm concentration was measured and 750 000 sperm were injected into a fertilization droplet (500  $\mu$ L) containing oocytes bathed in fertilization medium (NaCl 114.0 mM; KCl 3.2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 mM; Na Lactate 10.0 mM; CaCl<sub>2</sub> 2.0 mM; MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25.0 mM; MEM (for Minimum Essential Medium) Amino Acids solution 50X (from Life technologies) 2% vol/vol). IVF medium also contained 6 mg/mL BSA, 0.2 mM pyruvate, 50  $\mu$ g/mL gentamycin, 23.5  $\mu$ g/mL heparin, 20  $\mu$ M/mL penicillamine, 10  $\mu$ M hypotaurine and 2  $\mu$ M/mL epinephrine. Sperm (1.5 M/mL) and cumulus oocyte complexes (COCs) were co-cultured at 38.5 °C under 5% v/v CO<sub>2</sub> and saturating humidity for 48 h before assessing fertilization outcome.

#### Oocyte preparation

Bovine ovaries were collected within 3 h of slaughter and transported to the laboratory in saline solution (0.9%) supplemented with antibiotic (kanamycin) in a container heated to 35 °C. COCs were recovered from 2-8 mm antral follicles by manual aspiration using a sterile 18-gauge needle attached to a sterile 5 mL syringe filled with collection medium (1% v/v PVA

(Poly(Vinyl Alcohol)), 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 50 IU/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin in M199 medium). Only grade 1 and 2 COCs were selected for further processing. Groups of 30 COCs were matured in 4-well plates with 500 µL oocyte maturation medium for 24 h at 38.5 °C under 5% CO<sub>2</sub> and saturating humidity.

Oocyte maturation medium was a modified M199 medium, comprising M199 medium Earle's salts complex solution (Life technologies, reference 31150-022) and 2 mM glutamine, 0.2 mM sodium pyruvate, 0.1 mM cysteamine, 50 µg/mL gentamycin, 10% v/v FBS (Fetal Bovine Serum) and 0.2 µg/mL EGF (Epidermal Growth Factor).

#### Assessing fertilization and embryo development

Oocytes were removed from fertilization wells 24 hours after fertilization, vortexed for 2 min to remove cumulus cells and washed three times by passing through dishes of collection medium. Presumed zygotes were then cultured in 4-well plates with 500 µL 10% RD-mKSOM/aa embryo culture medium (NaCl 98.6 mM; KCl 2.5 mM; CaCl<sub>2</sub> 1.71 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.35 mM; MgSO<sub>4</sub> 0.2 mM; Na Pyruvate 0.3 mM; Na Lactate 3.0 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; HEPES 10.0 mM; L-Glutamine + essential and non-essential amino acids; insulin 5 µg/mL; transferrin 5 µg/mL; Na-Selenite 5 ng/mL; EDTA 10 µM, dibekacin sulfate 65 µg/ml supplemented with RD 10% (v/v), corresponding to mix 1:1 of RPMI and Dulbecco's MEM (Momozawa & Fukuda 2011)) and covered with 250 µL equilibrated mineral oil. Embryo culture was continued for 24 hours before counting the number of cleaved oocytes. Culture medium was 10% RD-mKSOM/aa. Cleavage rates were assessed at 48 h and blastocyst rate 9 days post-fertilization.

#### Sperm DNA assessment

Chromomycin A3 staining: semen samples were washed twice with 5 ml of PBS 1X and fixed in a methanol/acetic acid (3:1,v/v) solution at 4 °C for at least 30 min. Cells were spread on Superfrost® slides and air dried at room temperature overnight. Cells were then labeled using a 0.25 mg/mL chromomycin A3 (CMA3) solution in McIlvaine buffer (pH 7) for 20 min, and washed twice for 2 min with McIlvaine buffer. Sperm nuclei were counterstained with a 0.5 µg/mL Hoechst solution for 3 min, and washed in PBS for 3 min before mounting with DAKO mounting media.

Aniline blue: semen samples were washed twice with 5 ml of PBS 1X, 10 µL were spread on a slide, allowed to air dry and then fixed with a 3% glutaraldehyde solution in PBS 1X for 30 min at room temperature. Slides were then incubated for 5 min in water, 10 min in 5% aniline blue diluted in 4% acetic acid solution, twice for 2 min in water, 2 min in 70, 90 and 100% ethanol solutions and finally for 2 min in Toluene.

DNA breaks: Semen samples were washed twice with 5 mL of PBS and fixed in a methanol/acetic acid (3:1,v/v) solution at 4 °C for at least 30 min. Cells were spread on Superfrost® slides and air dried at room temperature overnight. Cells were permeabilized using 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) sodium citrate in PBS 1× for 2 min and labeled by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxy-UTP nick end labeling (TUNEL) according to the protocol provided with the In Situ Cell Detection Kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Sperm nuclei were counterstained in a 0.5 µg/mL Hoechst solution for 3 min, washed in PBS for 3 min and mounted with DAKO mounting media.

### Chemicals

M2 medium, M16 medium, M199 medium (M0393) and BSA (ref A3803 for mouse experiments, ref A-6003 for bovine experiments) were from Sigma-Aldrich (Lyon, France). PMSG and HCG were from Intervet (Beaucouze, France).

### Statistics

All statistical analyses were performed with SigmaPlot. n represents the number of biological replicates, and for each AR replicate more than 100 sperm cells were assessed per condition. The statistical significance of the effects of clofilium and quinidine on AR and fertility, respectively, was determined using t tests. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical tests with 2-tailed P values  $\leq 0.05$  were considered significant.

## Results

Among potassium channels, KCNU1 has a specific pharmacology as it is strongly inhibited by clofilium (4-chloro-N, N-diethyl-N-heptyl-benzene butanaminium), quinine and quinidine but not by charybdotoxin, iberiotoxin, or extracellular TEA, in addition it is relatively insensitive to extracellular 4-AP (up to 100 mM) (Tang *et al.* 2010, Wrighton *et al.* 2015). We first investigated the effect of clofilium-induced Kcnu1 inhibition on sperm lifespan in a mouse model. Mouse sperm lifespan was evaluated by measuring in vitro oocyte fertilization (IVF) after incubation either in a non-capacitating or in a capacitating medium for various time from 30 min to 12 hours. Nevertheless, all sperm were capacitated and sperm incubated in a non-capacitating medium were transferred in a capacitation medium for 1 h after their initial incubation in the non-capacitating medium and prior to gamete mixing (Figure 1).

When incubated in non-capacitating medium, optimal fertilization outcome at the 2-cell stage was obtained with sperm collected less than 3 h earlier from epididymis. After this time frame, the fertilization rate dropped dramatically, reaching around 20% at 4 h and almost 0% at 13 h. For sperm incubated in capacitating medium, optimal fertilization outcome was obtained at 1 h and then declined over time to reach 10% at 12 h. Interestingly, with 3-h old sperm, cells incubated in capacitating medium only had significantly lower fertilization competence than sperm incubated for 2 h in non-capacitating medium followed by 1 hour in capacitating medium. This result underlines how over-capacitation can dramatically affect sperm lifespan. Nevertheless, it should be noted that incubating sperm in a non-capacitating medium did not prevent the decline of sperm fertilizing competence, thus sperm lifespan is limited whatever the composition of the medium.

The ultimate goal of this study was to discover a drug capable of improving sperm lifespan in the female reproductive tract, i.e., in capacitating conditions, so as to improve fertilization rates in AI. We therefore measured the impact of clofilium treatment on sperm lifespan only in capacitating conditions. To do so, we compared the ability of sperm to fertilize eggs when incubated prior to fertilization in a standard medium or in a medium containing clofilium. The sperm was incubated in these two media for between 0.5 to 12 hours before being introduced into the oocyte containing droplet. The number of oocytes reaching the two-cell stage were counted at 24 h, but also at 48 hours after fertilization to measure late fertilization (Figure 2). In the outbred OF1 mice used for this part of the study, embryos do not develop beyond the 2-cell stage due to a phenomenon known as the “2-cell block” and thus only at 48 h post fertilization, only 2-cell embryos were counted.

Interestingly, at 24 hours post-fertilization, clofilium had a positive effect on the 2-cell outcome for aging sperm presenting decreased fertilization competence, i.e., after 3 hours as shown in figure 1. After 12 h incubation with clofilium, the rate of fertilization was increased by 214%, from 7.8% to 24.5% ( $p=0.0004$ ,  $n=3$ ). In contrast, for shorter incubation periods, the number of 2-cell stage embryos was lower than in the control (Figure 2A) although at 48 hours, a significant improvement of the 2-cell embryo outcome was observed for short incubation periods (<3 hours), with rates similar to those observed at 24 hours for the control condition, suggesting a delay in fertilization for sperm incubated with clofilium for short incubation periods (<3 hours) (Figure 2B). It is worth noting that delayed 2-cell embryos developed into blastocysts when oocytes from D2B6, known not to present a “2-cell block”, were used (Figure 2C). With longer incubation periods (>3 hours), no change in the rate of 2-cell embryos was observed between 24 and 48 hours. This result clearly

indicated that clofilium potently improved mouse sperm lifespan, in particular for aging capacitated sperm with clearly decreased fertilization competence.

The half maximal inhibitory concentration  $IC_{50}$  of clofilium for KCNU1 has not yet been determined, and most studies describing KCNU1 inhibition by clofilium were performed at positive potential (from +65 to +200 mV) and at a concentration of 50  $\mu$ M, producing a rate of inhibition of around 90% (Navarro *et al.* 2007, Brenker *et al.* 2014). However, the resting potential of sperm tends to be much more negative, at between -40 and -90 mV. At this potential, the  $IC_{50}$  of clofilium is difficult to determine because the current amplitude is very low. We wondered if lower concentrations of clofilium would be as potent as 5  $\mu$ M on sperm lifespan. This point is important because side effects, including altered phospholipid metabolism, have been reported with this drug (Aussel & Pelassy 1992). We tested clofilium at a 25-fold lower concentration (0.2  $\mu$ M); the efficiency at this concentration was similar to that observed at 5  $\mu$ M (Figure 3AB).

Our working hypothesis was that clofilium improved sperm lifespan by slowing down the capacitation process. To validate this hypothesis, the level of protein tyrosine phosphorylation, which is the gold standard for assessing capacitation, was measured for various durations of incubation in a capacitating medium (Figure 4).

Analysis of tyrosine-phosphorylated proteins extracted from sperm incubated in the control medium showed that the number of bands and their intensity was maximal at 1 h and declined very rapidly thereafter, with a very low level of protein phosphorylation at 12 h (Figure 4A). In contrast, when sperm were incubated in the presence of 5  $\mu$ M clofilium, the number of bands and their intensity was maximized at 3 h, and the decline was slowed.



More bands were present at 6 and 12 h, indicating that clofilium delays sperm capacitation and maintains phosphorylation over time.

Over-capacitation is correlated with an increase in spontaneous AR. We therefore examined whether delayed capacitation induced by clofilium was associated with decreased spontaneous AR (Figure 4B). Clofilium effectively decreased the rate of spontaneous AR. This result is in agreement with the inhibition of the capacitation process observed when sperm were incubated in the presence of clofilium.

Overall, these results strongly suggest that clofilium has the potential to extend sperm lifespan and improves the fertilization competence of aging capacitated sperm. To confirm our hypothesis that effects of clofilium are due to KCNU1 inhibition, we tested the effect of quinidine. Quinidine is another potent KCNU1 inhibitor, but with a different structure to clofilium (Figure 5A). Quinidine is a strong inhibitor of KCNU1, with an  $IC_{50}$  of 19.86  $\mu$ M at +100 mV for heterologous Slo3 expression (Wrighton *et al.* 2015). We thus tested how quinidine concentrations from 5 to 100  $\mu$ M affected the fertilization rate with sperm capacitated for 12 h (Figure 5B). When sperm were capacitated for 12 h in the presence of 25  $\mu$ M quinidine, the rate of fertilization increased by 55%, from 9.86 to 15.36% (Figure 5). Although its potency was lower than that of clofilium, these results with quinidine confirm that KCNU1 inhibition potently improves sperm lifespan.

With these encouraging results on the mouse model, we went on to test the effect of clofilium on aging of bovine sperm. A similar strategy was used, performing IVF with sperm incubated for various time in a capacitating medium. However, in bovine species the capacitation process is much slower, therefore sperm fertility competence was verified at 24 and 48 h.

Initially, we studied sperm frozen in a standard medium and added clofilium to the capacitation medium after thawing. We compared three conditions: matured oocytes fertilized with sperm thawed immediately before insemination, matured oocytes fertilized with sperm thawed 24 h before insemination and incubated in the capacitating sp-TALP-H medium, and matured oocytes fertilized with sperm thawed 24 h before insemination and incubated in the capacitating sp-TALP-H medium containing 0.2  $\mu$ M clofilium (Figure 6). The development of 2-cell embryos was monitored up to the blastocyst stage.

Incubating sperm in capacitation medium for 24 h dramatically decreased the rates of both fertilization and blastocyst formation (Figure 6), indicating that 24 h in a capacitation medium is sufficient to render most bovine sperm incompetent for fertilization. Interestingly, treatment of sperm with clofilium in the capacitation medium increased the rate of fertilization of capacitated sperm at 24 h by ~100%, from 24.8% $\pm$  to 48.5%, and the rate of blastocyst formation by 150%, from 6.9% $\pm$  to 17.4% (Figure 6). Experiments performed with bovine sperm confirmed that clofilium has the potential to extend sperm lifespan.

To remain as close as possible to what will be done in the field, sperm were frozen with clofilium prior to testing their fertilizing competence after incubation in a capacitating medium for 24 or 48 h. Two types of straws were used: control straws and straws containing clofilium. For straws containing clofilium, two conditions were tested: in the first one, sperm were capacitated in the presence of 0.2  $\mu$ M clofilium, and in the second one, clofilium was washed out by washing sperm with sp-TALP-H just after thawing, thus closer mimicking the conditions that would be found in the female reproductive tract. Fertilization rates after 24 and 48 h incubation were compared in the following conditions (Figure 7):

i) “control 0 h”: control straws were thawed, freezing medium was removed by washing twice with sp-TALP-H, before injecting sperm into the droplets containing matured oocytes;

ii) “clofilium 0 h”: Clofilium straws were thawed, freezing medium was removed by a washing twice with sp-TALP-H containing 0.2  $\mu\text{M}$  clofilium, before injecting sperm into the droplets containing matured oocytes;

iii) “control 24 h” or “control 48 h”: control straws were thawed and freezing medium was removed by washing with sp-TALP-H, sperm were then incubated for 24 h or 48 h in sp-TALP-H. They were then washed with sp-TALP-H prior to injection into the droplets containing matured oocytes;

iv) “clofilium 24 h” or “clofilium 48 h”: Clofilium straws were thawed, freezing medium was removed by washing with sp-TALP-H containing 0.2  $\mu\text{M}$  clofilium, sperm were then incubated for 24 h or 48 h in sp-TALP-H + 0.2  $\mu\text{M}$  clofilium. Sperm cells were washed with sp-TALP-H prior to injection into the droplets containing matured oocytes;

v) “Washed clofilium 24 h” or “Washed clofilium 48 h”: Clofilium straws were thawed, freezing medium was removed by washing with sp-TALP-H. Sperm were then incubated for 24 h or 48 h in sp-TALP-H, washed once again with sp-TALP-H, and finally injected into the droplets containing matured oocytes

Several conclusions could be drawn from the results of these experiments. First, exposure to clofilium during the sperm handling/freezing steps did not alter fertilization competence (Figure 7A). Second, when clofilium was included in the capacitation medium throughout sperm aging, sperm fertilizing competence was improved up to 48 h (Figure 7C). Third, in washing conditions, the presence of clofilium during the handling/freezing process was

sufficient to prolong sperm survival and to improve sperm fertilizing competence at 24 h but not at 48 h.

Sperm motility is a key parameter for fertilization as it is essential for sperm to swim across the oviduct to reach the female gamete, to traverse the protective layers surrounding oocytes and for gamete fusion (Ravaux *et al.*, 2016). Moreover, it has been clearly shown that the rate of conception is directly proportional to the number of motile sperm (Publicover and Barratt, 2011). We thus examined whether clofilium preserved sperm motility in aging capacitated sperm. Mobility of sperm frozen in the presence of clofilium was assessed after incubating for 24 h in a capacitation medium containing 0.2  $\mu$ M clofilium (Figure 8). Interestingly, a higher percentage of motile sperm, and higher velocities were measured in samples incubated with clofilium. The positive effect of clofilium appeared progressively during capacitation (Figure 8CD), suggesting that the negative impact of capacitation on motility was slowed down.

In the final part of this study, we assessed the toxicity of clofilium by examining sperm DNA and bovine embryo development. Three tests were used to assess the toxicity of clofilium on sperm DNA: aniline blue (AB) and chromomycin A3 (CMA3) tests, which measure the degree of nuclear compaction, and TUNEL test, which assesses the level of DNA fragmentation (Figure 9). Clofilium at the effective concentration of 0.2  $\mu$ M had no impact on sperm compaction and sperm fragmentation. Nor were effects observed at a 25-fold higher concentration. These results demonstrate that clofilium is non-toxic at these concentrations.

We next assessed how clofilium affected bovine embryo development. To do so, bovine embryos were cultured up to the blastocyst stage in culture medium containing various

concentrations of clofilium, and measured the rate of fertilized oocytes developing in blastocysts and the rate of expanded and hatched blastocysts (Figure 10). No embryotoxicity was observed with clofilium concentrations up to 5  $\mu\text{M}$ . However, at 10  $\mu\text{M}$ , a significant decrease in both blastocyst formation and blastocyst quality was observed (none were expanded). At the concentration used to improve sperm lifespan, clofilium thus appears to be safe for both sperm and embryos.

## Discussion

In this report, we tested the hypothesis that sperm lifespan can be extended through modulation of key actors in capacitation, such as potassium channels. Our results show that clofilium has various effects on sperm physiology and effectively slows the kinetics of capacitation, as evidenced by the decrease of both intensity and number of bands corresponding to phosphotyrosine proteins, a hallmark of capacitation. Cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  influx is essential to capacitation (Visconti *et al.* 1995) and relies on the CATSPER channels (CATSPER1-4) (Xia & Ren 2009). CATSPER channels must be activated during sperm development, and directly control capacitation and sperm motility (Suarez 2008, Singh & Rajender 2015). The intensity of calcium influx through calcium channels depends on the  $\text{Ca}^{2+}$  driving force, which is dictated by the membrane potential ( $V_m$ ) and the chemical gradient of  $\text{Ca}^{2+}$ . Applying the Nernst equation to internal and external calcium concentrations of 0.0001 mM and 2.5 mM, respectively, results in an equilibrium potential of +134 mV, and indicates that increasing  $V_m$  to less depolarized or positive values should decrease the  $\text{Ca}^{2+}$  driving force and thus the flow of  $\text{Ca}^{2+}$  through calcium channels. Permeability of the plasma membrane for  $\text{K}^+$  is well known to be the main factor controlling

$V_m$ , particularly in sperm cells, and KCNU1 plays a critical role in this permeability. KCNU1  $K^+$  channels contribute predominantly to the net  $K^+$  current induced by depolarization at negative  $V_m$ , and comparison of the inhibition by clofilium of the net  $K^+$  current recorded from WT and KCNU1-deficient sperm cells indicates that clofilium selectively inhibits KCNU1 (Zeng *et al.* 2011). Therefore, clofilium treatment is likely to increase  $V_m$  to less depolarized potentials and limit  $Ca^{2+}$  influx through CATSPER, thus slowing down capacitation. In support of these effects, the rate of AR was observed to decrease. Indeed, the ZP3-induced AR is a calcium-dependent event which is triggered by voltage-dependent calcium channels, and whose activation is blocked when sperm is depolarized (Arnoult *et al.* 1999, Cohen *et al.* 2014). In agreement with these results, ZP3-induced  $Ca^{2+}$  influx is inhibited in the absence of KCNU1, in *Kcnu1*-deficient sperm (Chavez *et al.* 2014). Finally, the prolonged sperm motility observed in the presence of clofilium may be as a result of decreased oxidation associated with the reduced level of capacitation. Indeed, loss of sperm motility correlates with the level of lipid peroxidation (Storey 1997). In conclusion, the different effects on sperm physiology reported for clofilium are in agreement with KCNU1 inhibition and its effect on sperm  $V_m$ , which is a crucial factor controlling capacitation and AR through  $Ca^{2+}$  influx.

Prolonging survival of capacitating aging sperm is an important challenge for animal reproduction and has been the subject of intense research. It was reported that including antioxidant in the sperm storage medium (Maxwell & Stojanov 1996) or direct delivery of antioxidants inside sperm cells using antioxidant-carbohydrate complexes (Fleming *et al.* 2005) improved sperm survival, suggesting that decreasing oxidative damage induced by the capacitation process could be an appropriate strategy. Other tests involved immobilizing sperm, either using specific semen extender (Strom *et al.* 1997) or by embedding sperm in alginate gel (Alm-Kristiansen *et al.* 2017) and several products based on sperm

immobilization have been marketed. The efficiency of immobilization is nevertheless debated, with contradictory reports for both specific semen extender (Shahiduzzaman & Linde-Forsberg 2007) and alginate (Standerholen *et al.* 2015). In this paper, we show that the K<sup>+</sup> channels inhibitor clofilium broadens the time window within which capacitating aging sperm remain competent for in vitro fertilization. Our results also show that quinidine, another K<sup>+</sup> channel inhibitor with unrelated chemical structure, improves sperm survival. These results strongly suggest that K<sup>+</sup> channels inhibitors are potential targets when seeking to extend sperm lifespan in vivo. To our knowledge, this is the first report of increased fertilization competence in capacitating aging sperm through control of sperm potassium channels, and probably their membrane potential. This strategy is therefore clearly different to the methods previously proposed to prolong sperm survival.

In particular, our study showed that clofilium prolongs sperm survival when used at sub-micromolar concentrations, and that no toxicity is observed at these concentrations. Although the toxicity studies performed were very preliminary, two elements appear to indicate that clofilium can be used to extend sperm lifespan: first, clofilium was tested in human and dog as an antiarrhythmic agent in vivo at a plasma concentration of 10 µM, and no acute toxicity was reported; second, no sperm toxicity was observed with 25-fold higher concentrations. These results give this drug a usable therapeutic index. Finally, we showed that treating sperm with clofilium before and during sperm freezing followed by stringent washing, mimicking the dilution process which occurs in the female reproductive tract, is sufficient to maintain a positive effect on sperm survival.

In conclusion, our results demonstrate that clofilium prolongs sperm survival and improves the fertilization competence of aging capacitated sperm in vitro, strongly suggesting that

clofilium has the potential to prolong sperm lifespan in vivo. However, field trials will be necessary to validate the effects of this drug on sperm lifespan in in vivo conditions.

#### Declaration of interest

A patent "Method for increasing the lifespan and motility of non-human mammalian sperm using an inhibitor of Slo3 potassium channel" has been submitted (Application number EP 17306818.0 - 18 December 2017) by IMV Technologies & Université Grenoble Alpes & Swiss genetics & CNRS & INSERM

#### Funding

This work was supported by CNRS (to C.A.) the French National Research Agency (Agence Nationale de la Recherche; ANR-14-LAB7-0004) and by a grant from Swiss genetics to C.A.

Acknowledgments. We thank Dr Ulrich Witschi for valuable discussion

#### References

- Aitken RJ** 2017 Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development* **84** 1039-1052.
- Aitken RJ & Curry BJ** 2011 Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid.Redox.Signal.* **14** 367-381.
- Alm-Kristiansen AH, Gaustad ER, Bai G, Standerholen FB, Klinkenberg G, Kommisrud E & Waterhouse KE** 2017 In vitro studies of Norwegian Red bovine semen immobilized and cryopreserved in alginate solid gel network. *Reprod Domest Anim.*
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M & Florman HM** 1999 Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** 6757-6762.
- Aussel C & Pelassy C** 1992 Effects of antiarrhythmic drugs on phospholipid metabolism in Jurkat T cells. The potassium channel blocker, clofilium, specifically increases phosphatidylserine synthesis. *FEBS Letters* **304** 281-284.
- Austin CR** 1952 The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* **170** 326.



- Brenker C, Zhou Y, Muller A, Echeverry FA, Trotschel C, Poetsch A, Xia XM, Bonigk W, Lingle CJ, Kaupp UB & Strunker T** 2014 The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife* **3** e01438.
- Butler WR** 1998 Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **81** 2533-2539.
- Chavez JC, Ferreira JJ, Butler A, De La Vega Beltran JL, Trevino CL, Darszon A, Salkoff L & Santi CM** 2014 SLO3 K<sup>+</sup> channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *Journal of Biological Chemistry* **289** 32266-32275.
- Cohen R, Buttke DE, Asano A, Mukai C, Nelson JL, Ren D, Miller RJ, Cohen-Kutner M, Atlas D & Travis AJ** 2014 Lipid modulation of calcium flux through CaV2.3 regulates acrosome exocytosis and fertilization. *Dev.Cell.* **28** 310-321.
- Dorsey BR, Kasimanickam R, Whittier WD, Nebel RL, Wahlberg ML & Hall JB** 2011 Effect of time from estrus to AI on pregnancy rates in estrous synchronized beef heifers. *Animal Reproduction Science* **127** 1-6.
- Fissore RA, Kurokawa M, Knott J, Zhang M & Smyth J** 2002 Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction* **124** 745-754.
- Fleming C, Maldjian A, Da Costa D, Rullay AK, Haddleton DM, St John J, Penny P, Noble RC, Cameron NR & Davis BG** 2005 A carbohydrate-antioxidant hybrid polymer reduces oxidative damage in spermatozoa and enhances fertility. *Nature Chemical Biology* **1** 270-274.
- Leahy T & Gadella BM** 2011 Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* **142** 759-778.
- Maxwell WM & Stojanov T** 1996 Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility, and Development* **8** 1013-1020.
- Momozawa K & Fukuda Y** 2011 Establishment of an advanced chemically defined medium for early embryos derived from in vitro matured and fertilized bovine oocytes. *J Reprod Dev* **57** 681-689.
- Navarro B, Kirichok Y & Clapham DE** 2007 KSper, a pH-sensitive K<sup>+</sup> current that controls sperm membrane potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** 7688-7692.
- Norman HD, Wright JR, Hubbard SM, Miller RH & Hutchison JL** 2009 Reproductive status of Holstein and Jersey cows in the United States. *Journal of Dairy Science* **92** 3517-3528.
- Reith S & Hoy S** 2017 Review: Behavioral signs of estrus and the potential of fully automated systems for detection of estrus in dairy cattle. *Animal* **11**:10.
- Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J & Visconti PE** 2007 Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc.Reprod.Fertil.Suppl.* **65** 245-259.
- Santi CM, Martinez-Lopez P, de la Vega-Beltran JL, Butler A, Alisio A, Darszon A & Salkoff L** 2010 The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* **584** 1041-1046.
- Santi CM, Orta G, Salkoff L, Visconti PE, Darszon A & Trevino CL** 2013 K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels and transporters in sperm function. *Current Topics in Developmental Biology* **102** 385-421.
- Shahiduzzaman AK & Linde-Forsberg C** 2007 Induced immotility during long-term storage at +5 degrees C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* **68** 920-933.
- Shukla KK, Mahdi AA & Rajender S** 2012 Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility. *J.Androl* **33** 777-788.
- Singh AP & Rajender S** 2015 CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod.Biomed.Online.* **30** 28-38.
- Standerholen FB, Waterhouse KE, Larsgard AG, Garmo RT, Myromslien FD, Sunde J, Ropstad E, Klinkenberg G & Kommisrud E** 2015 Use of immobilized cryopreserved bovine semen in a blind artificial insemination trial. *Theriogenology* **84** 413-420.
- Storey BT** 1997 Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* **3** 203-213.

- Strom B, Rota A & Linde-Forsberg C** 1997 In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* **48** 247-256.
- Suarez SS** 2008 Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*. **14** 647-657.
- Tang QY, Zhang Z, Xia XM & Lingle CJ** 2010 Block of mouse Slo1 and Slo3 K<sup>+</sup> channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine. *Channels (Austin)* **4** 22-41.
- Travis AJ & Kopf GS** 2002 The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J.Clin.Invest.* **110** 731-736.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS** 1995 Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121** 1139-1150.
- Wrighton DC, Muench SP & Lippiat JD** 2015 Mechanism of inhibition of mouse Slo3 (KCa 5.1) potassium channels by quinine, quinidine and barium. *British Journal of Pharmacology* **172** 4355-4363.
- Xia J & Ren D** 2009 The BSA-induced Ca<sup>2+</sup> influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7** 119.
- Zeng XH, Yang C, Kim ST, Lingle CJ & Xia XM** 2011 Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K<sup>+</sup> current in mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** 5879-5884.

## Legends Figures

**Figure 1. Sperm fertilization competence decreases dramatically 2-4 hours after collection from epididymis.** Fertilization competence of sperm incubated in non-capacitating or capacitating medium was measured by determining the percentage of 2-cell embryos at 24 hours post-insemination. Time corresponds to the age of sperm (in hours) since recovery from the epididymides (n=3), statistical significance at 3 h was measured with t-test, n=3.

**Figure 2. Clofilium treatment increases sperm lifespan.** A. Sperm were incubated in M16 medium + 2% BSA (●) or in the presence of clofilium (●) for between 0.5 and 12 h and introduced into droplets containing OF1 oocytes. 2-cell embryos were counted at 24 h. B. Number of 2-cell embryos from the same experiment shown in A, but at 48 h (B) (n = 3). C-E. Sperm were capacitated for 1 h with or without clofilium and inseminated with C57BL6 oocytes. (C) 2-cell embryos generated were counted at 24h. (D) Embryos at ≥ 2-cell stage were counted at 48 h. (E) Rate of blastocysts formed versus 2-cell embryos generated at 24 h for non-treated sperm or generated at 48 h for clofilium-treated sperm.

**Figure 3. Sperm survival prolonged by clofilium at 0.2 to 5 μM.** A. Sperm were incubated in M16 medium + 2% BSA or in the presence of clofilium for 12 h, and introduced into droplets containing oocytes. 2-cell embryos were counted at 24 h A. 2-cell embryos generated from

sperm incubated for 12 h in capacitating medium containing 5  $\mu\text{M}$  of clofilium; B. Same experiment as A but with 0.2  $\mu\text{M}$  clofilium. statistical significances were assessed with t-test,  $n=3$ .

**Figure 4. Kinetics of capacitation and spontaneous acrosome reaction are altered by exposure to clofilium.** A. Sperm phosphotyrosine profiles at different times in the presence or absence of clofilium. Identical numbers of sperm cells were incubated for various times in M16 + 2% BSA or in the presence of 5  $\mu\text{M}$  clofilium. Protein tyrosine phosphorylation levels were measured by Western Blotting with an anti-phosphotyrosine antibody. Two representative blots are presented ( $n=3$ ). B. Clofilium alters the rate of spontaneous acrosome reaction occurring in capacitating medium over time ( $n=3$ ). Statistical significances were assessed with paired t-test,  $n=3$

**Figure 5. Quinidine improves sperm fertilizing competence of capacitated sperm.** A. Clofilium and quinidine structures. B. Sperm were incubated in M16 medium + 2% BSA with different concentrations of quinidine for 12 h and introduced into droplets containing oocytes. Two-cell embryos were counted 24 h post-insemination. Statistical differences were assessed by the t-test,  $n=3$ .

**Figure 6. Bovine sperm fertilizing competence prolonged when maintained in a capacitating medium containing clofilium.** Oocytes were matured in vitro and fertilized with thawed sperm. "Control 0 h" corresponds to sperm inseminated immediately after thawing, "control 24 h" to sperm incubated in Sp-Talp-H for 24 h prior to insemination, and "clofilium 24 h" to sperm incubated in Sp-Talp-H + 0.2  $\mu\text{M}$  clofilium for 24 h prior insemination. Statistical differences were measured with t-test,  $n=4$ ;  $n$  in the columns corresponds to the cumulative number of matured oocytes tested in 4 different IVF replicates.

**Figure 7. Prolonged survival of sperm treated by clofilium during the freezing process.** Two types of straws were used: control straws and clofilium straws. (A) Comparison of the rate of cleavage obtained when sperm from control and clofilium straws were inseminated immediately after thawing. (B) Comparison of the rate of cleavage obtained when sperm from control and clofilium straws were inseminated 24 h after thawing. For clofilium straws,

two conditions were tested: after removal of freezing medium, sperm were incubated for 24 h either in Sp-Talp-H containing clofilium (clofilium 24 h) or in Sp-Talp-H (Washed clofilium 24 h). (C) Similar experiment with sperm incubated 48 h before insemination. Statistical differences were determined by t-test,  $n=3$  for A, and paired t-test for B and C,  $n=7-9$ ,  $p$  values were as indicated.

**Figure 8. Clofilium treatment improves motility of aging capacitated sperm.**

Clofilium straws were thawed and sperm were incubated for 24 h either in control Sp-Talp-H medium or Sp-Talp-H containing 0.2 or 0.5  $\mu\text{M}$  clofilium. (A) Comparison of sperm motility after incubation in control or clofilium-containing media. (B) VCL of sperm in similar experimental conditions. (C) Kinetics of sperm motility loss during capacitation in control or clofilium-containing media. (D) Kinetics of loss of sperm velocity in control or clofilium-containing media. Statistical differences were measured by paired t-test,  $n=6$ ,  $p$  values were as indicated.

**Figure 9. Sperm DNA unaltered by clofilium at effective concentration extending sperm survival.**

Thawed bovine sperm were incubated in Sp-Talp-H medium containing 0.2 or 5  $\mu\text{M}$  clofilium for 24 h. (A) sperm DNA breaks were assessed with the TUNEL test. Histogram shows the number of TUNEL-positive fluorescent cells (green) as a percentage of the total number of sperm nuclei revealed by Hoechst staining (blue). (B) sperm DNA compaction was assessed by aniline blue and (C) chromomycin A3 staining. CMA3-positive cells were expressed as a percentage of the number of positive fluorescent cells (green) over the total number of sperm nuclei revealed by Hoechst staining (blue). Statistical differences were measured with t-test,  $n=3$  and for each replicate, more than 250 sperm were analyzed.

**Figure 10. Pre-implantation development unaltered by clofilium at concentrations effectively extending sperm survival.**

1-cell embryos were cultured in 10%RD-mKSOM/aa culture medium containing various concentrations of clofilium, from 0.2 to 10  $\mu\text{M}$ . (A) Percentage of 2-cell embryos versus total oocytes. (B) Percentage of blastocysts versus total number of oocytes. Statistical differences were measured with t-test,  $n=4$ .

For Review Only

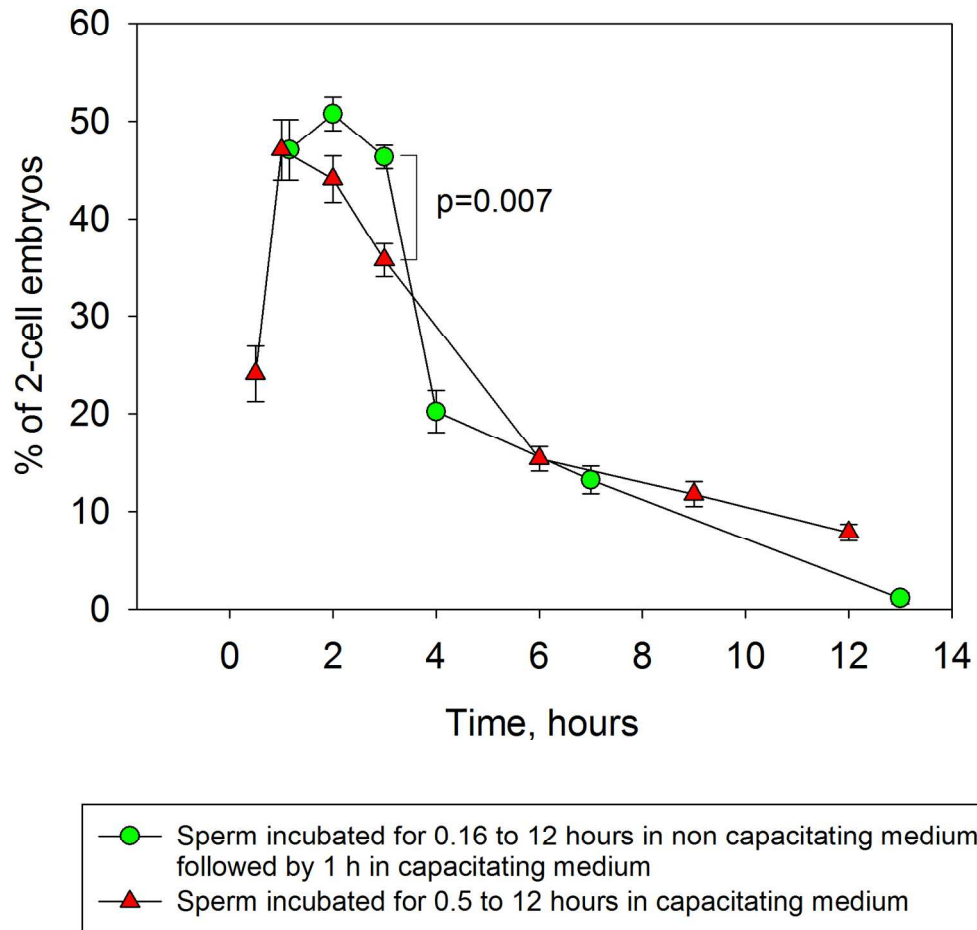


Figure 1. Sperm fertilization competence decreases dramatically 2-4 hours after collection from epididymis.

153x154mm (300 x 300 DPI)

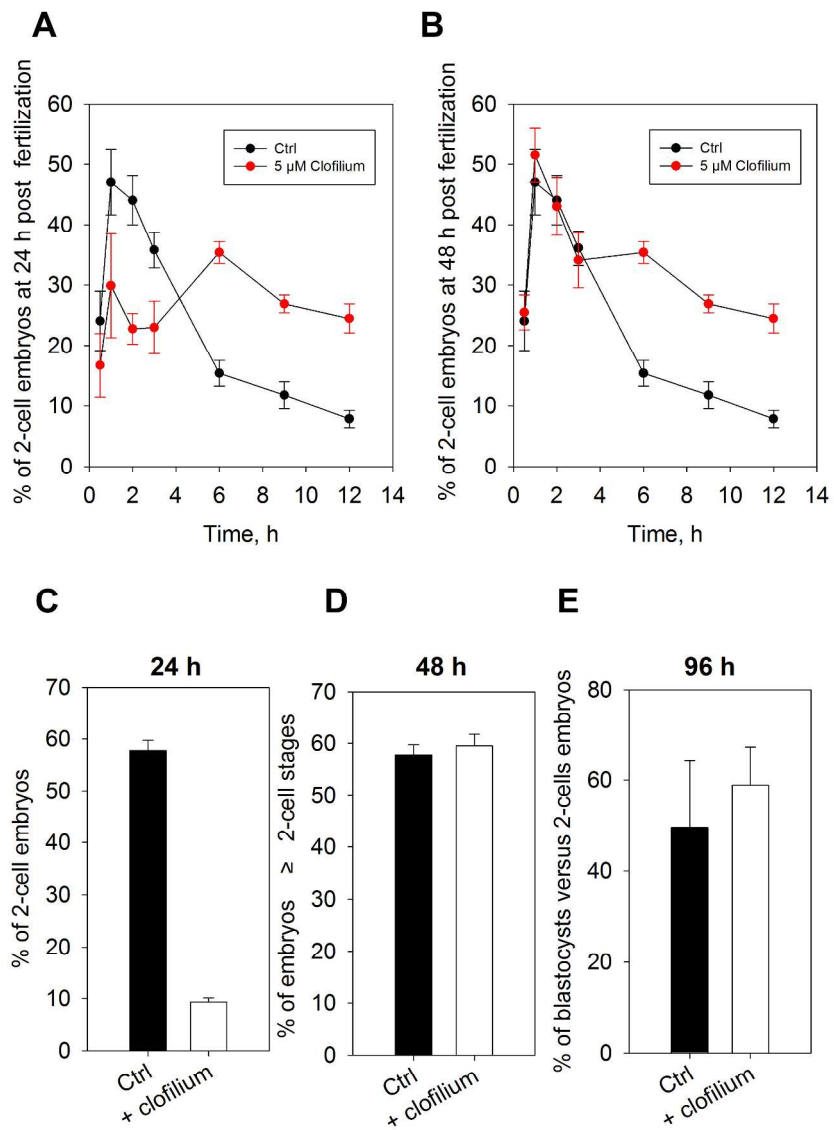


Figure 2. Clofilium treatment increases sperm lifespan

209x297mm (300 x 300 DPI)

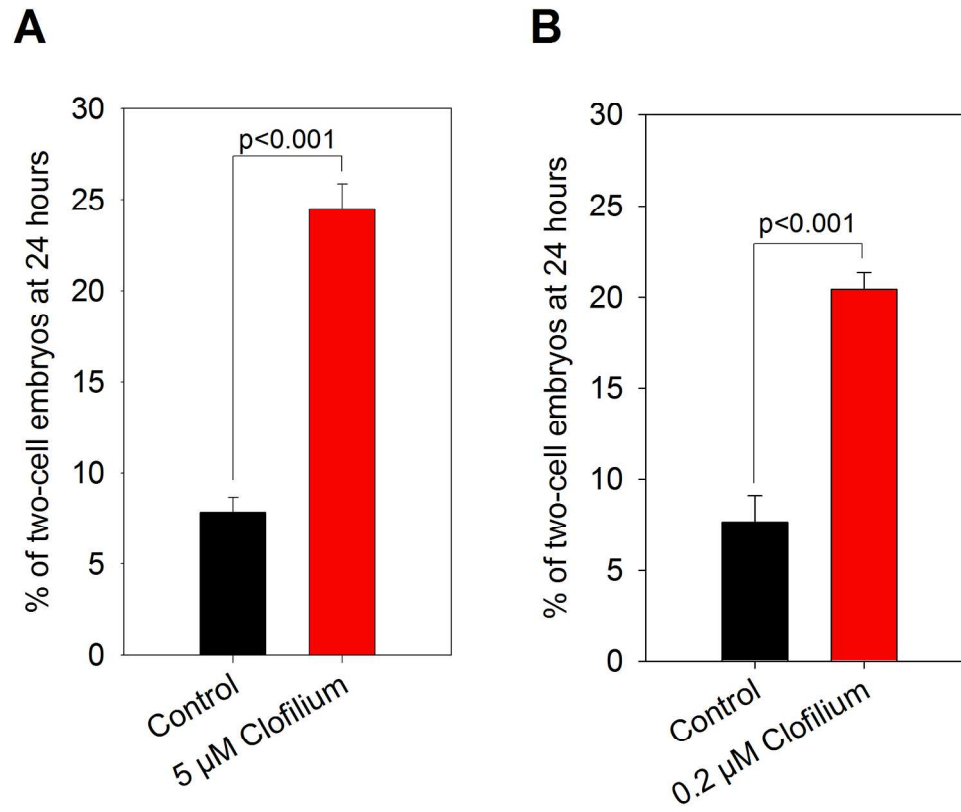


Figure 3. Sperm survival prolonged by clofilium at 0.2 to 5  $\mu$ M.

182x154mm (300 x 300 DPI)



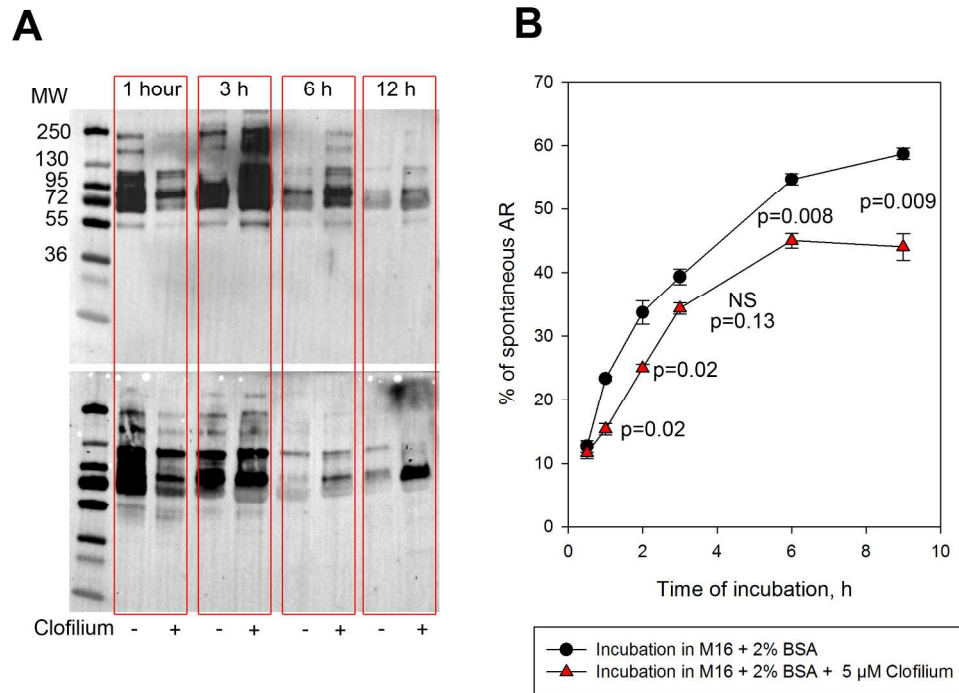


Figure 4. Kinetics of capacitation and spontaneous acrosome reaction altered by exposure to clofilium.

201x146mm (300 x 300 DPI)

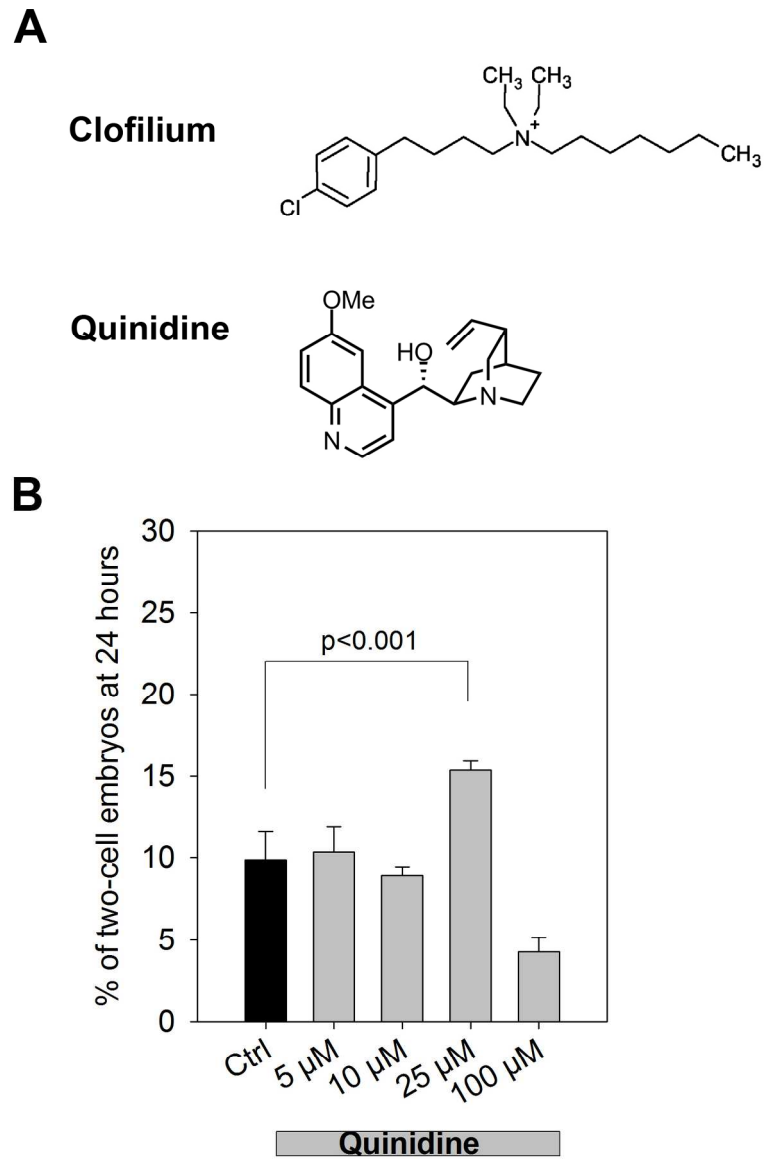


Figure 5. Quinidine improves sperm fertilizing competence of capacitated sperm.

158x219mm (300 x 300 DPI)

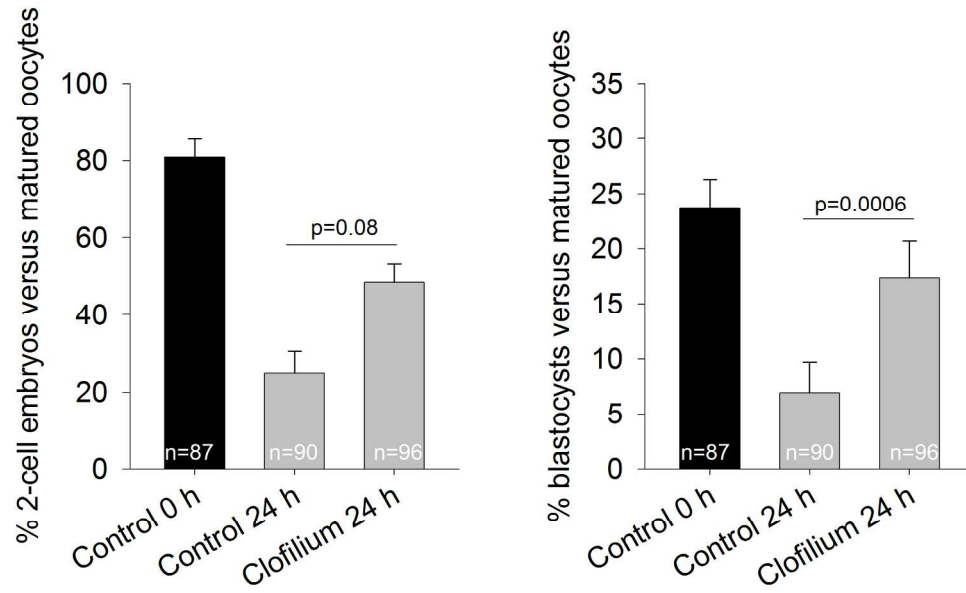


Figure 6. Bovine sperm fertilizing competence prolonged when maintained in a capacitating medium containing clofilium.

194x120mm (300 x 300 DPI)

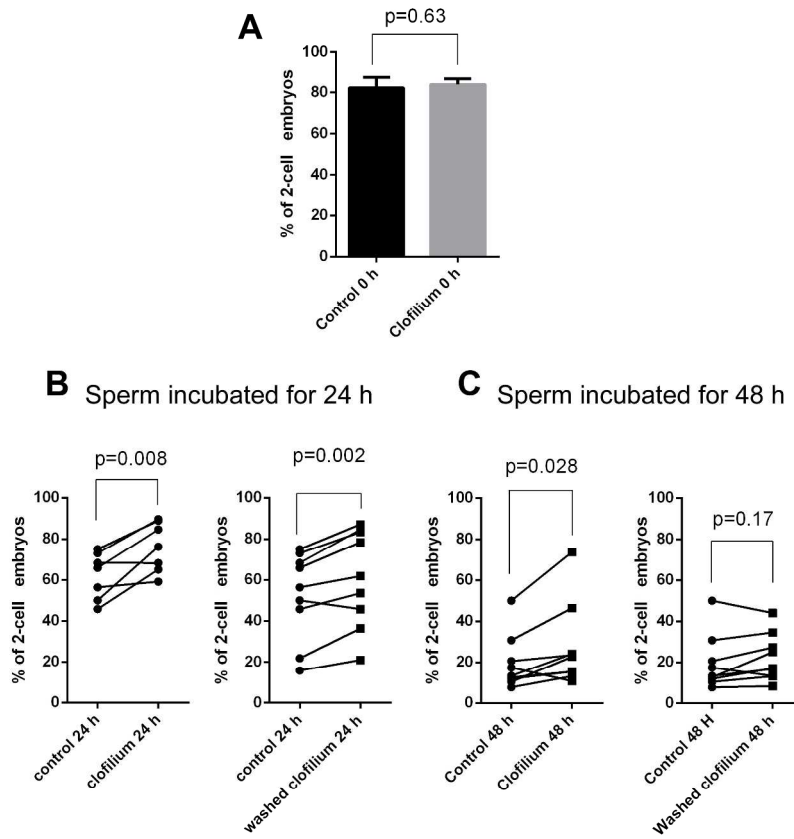


Figure 7. Prolonged survival of sperm treated by clofilium during the freezing process.

209x297mm (300 x 300 DPI)

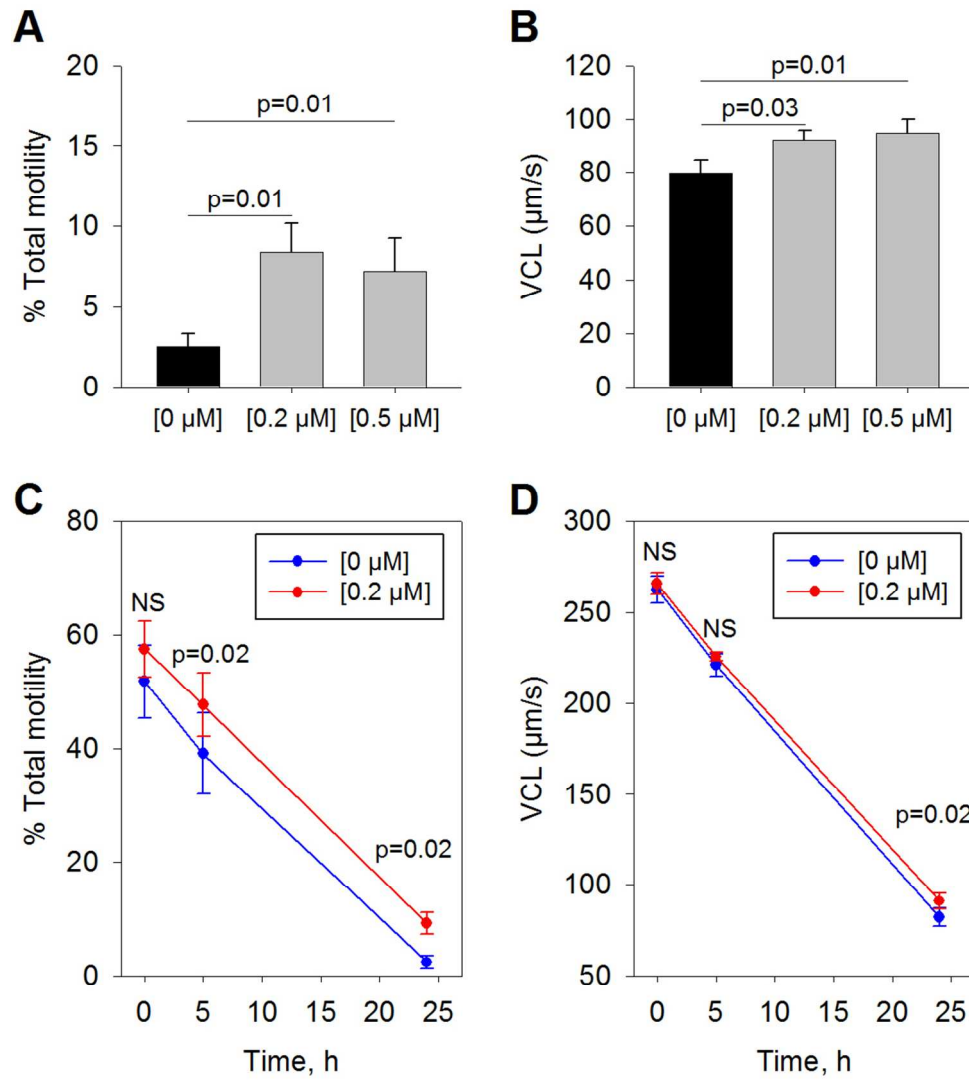


Figure 8. Clofilium treatment improves motility of aging capacitated sperm.

195x211mm (150 x 150 DPI)

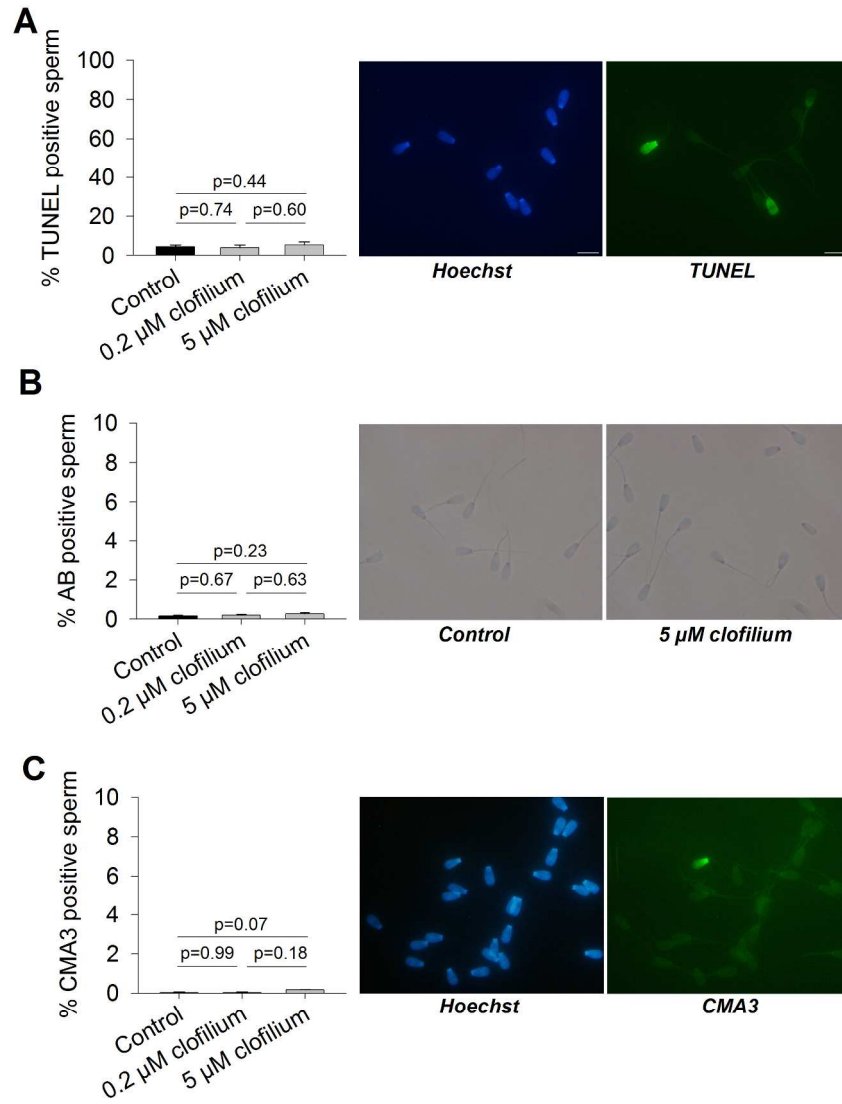


Figure 9. Sperm DNA unaltered by clofilium at effective concentration extending sperm survival.

211x292mm (300 x 300 DPI)

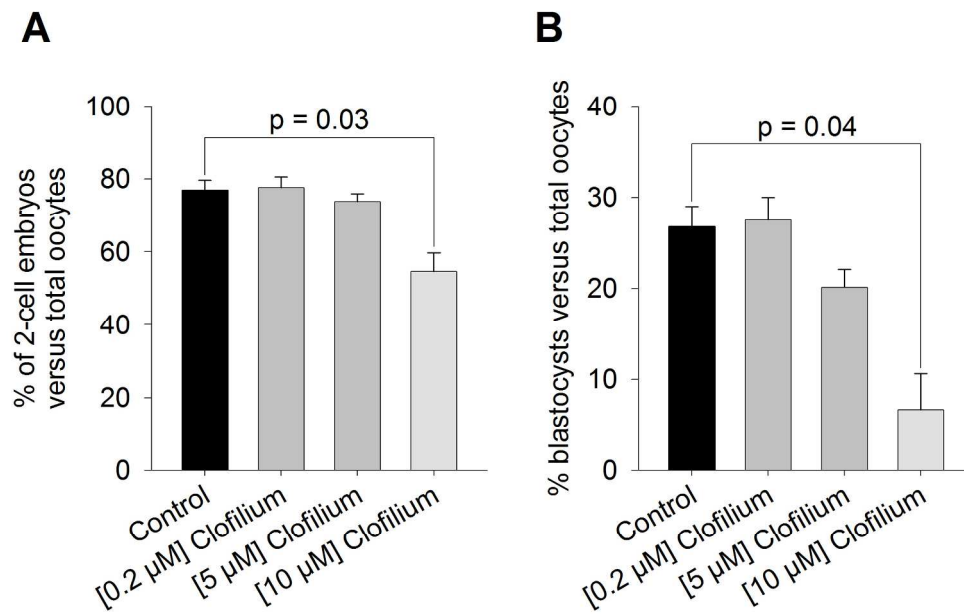


Figure 10. Pre-implantation development unaltered by clofilium at concentrations effectively extending sperm survival.

205x131mm (300 x 300 DPI)

# ANNEXE 2

ARTICLE PUBLIE SUR LA  
SPERMAURINE



# Spermaurin, an La I-like peptide from the venom of the scorpion *Scorpio maurus palmatus*, improves sperm motility and fertilization in different mammalian species

Guillaume Martinez<sup>1,2,3</sup>, Jean-Pascal Hograindleur<sup>2,3</sup>, Sébastien Voisin<sup>4</sup>, Roland Abi Nahed<sup>2,3</sup>, Tarek M. Abd El Aziz<sup>5</sup>, Jessica Escoffier<sup>2,3</sup>, Julien Bessonnat<sup>2,3,6</sup>, Claire-Maëlle Fovet<sup>7</sup>, Michel De Waard<sup>5</sup>, Sylviane Hennebicq<sup>2,3,6</sup>, Vincent Aucagne<sup>8</sup>, Pierre F. Ray<sup>2,3,9</sup>, Eric Schmitt<sup>1</sup>, Philippe Bulet<sup>2,3,4</sup>, and Christophe Arnout<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>IMV Technologies, ZI N° 1 Est, F-61300 L'Aigle, France <sup>2</sup>Université Grenoble Alpes, Grenoble F-38000, France <sup>3</sup>Institute for Advanced Biosciences INSERM U1209, CNRS UMR5309, Grenoble F-38000, France <sup>4</sup>Plateforme BioPark d'Archamps, Archamps Technopole, Saint Julien en Genevois F-74160, France <sup>5</sup>L'institut du thorax, Inserm UMR 1087/CNRS UMR 6291, Université de Nantes, Nantes F44007, France <sup>6</sup>CHU Grenoble Alpes, UF de Biologie de la procréation, Grenoble F-38000, France <sup>7</sup>Molecular Imaging Research Center, MIRCen CEA/INSERM UMR I 169, Fontenay-aux-Roses F-92265, France <sup>8</sup>Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, Orléans F-45071, France <sup>9</sup>CHU Grenoble Alpes, UF de Biochimie Génétique et Moléculaire, Grenoble F-38000, France

\*Correspondence address. E-mail: christophe.arnout@univ-grenoble-alpes.fr

Submitted on August 31, 2016; resubmitted on October 28, 2016; editorial decision on November 7, 2016; accepted on November 18, 2016

**STUDY QUESTION:** Is it possible to identify original compounds that are able to enhance sperm motility from the venom of the scorpion *Scorpio maurus palmatus*?

**SUMMARY ANSWER:** We identified a potent disulfide-rich peptide (DRP) of 73 amino acids that significantly improved the motility of fresh and frozen-thawed sperm in different mammalian species, including human, and improved fertilization outcome in mouse IVF experiments.

**WHAT IS KNOWN ALREADY:** Any disturbance of sperm motility has a strong impact on fertilization and can lead to subfertility or infertility. Significant efforts have, therefore, been made to identify pharmacological drugs that might improve sperm motility. Such compounds are particularly useful in azoospermia to improve testicular sperm extraction and in the domain of cryopreservation because the motility of frozen-thawed sperm is reduced.

**STUDY DESIGN, SIZE, DURATION:** This was a basic science/medical research study aimed at identifying original compounds from a library of venoms able to enhance mammalian sperm motility, including human. We first identified in the venom of a scorpion *S. m. palmatus* a fraction able to potentially activate sperm motility. We next purified and characterized the compound by liquid chromatography, mass spectrometry and peptide synthesis. Finally, the potency and toxicity of both purified and synthetic versions of the identified compound on sperm motility were assessed using different *in vitro* tests in different mammalian species.

**PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS:** For human sperm, biological samples were collected from normozoospermic donors and subfertile patients attending a reproduction department for diagnostic semen analysis. Testicular sperm was collected from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) euthanized for the needs of specific authorized research projects. The peptide was also tested on

bovine and mouse epididymal sperm. We measured different sperm motility parameters with a computer-assisted sperm analysis system in the presence or absence of the peptide.

**MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE:** Size exclusion chromatography enabled us to isolate a fraction of the venom of *S. m. palmatus* able to increase sperm motility. By liquid chromatography and mass spectrometry, a peptide comprising 73 amino acids with 4 disulfide bridges was identified as responsible for the biological activity and called 'spermaurin'. The identity of spermaurin was confirmed by chemical synthesis. We showed that the peptide increased the motility of fresh and frozen-thawed human sperm. We observed that the potency of the peptide was higher on fresh ejaculated spermatozoa with a low motility, achieving a 100% increase of curvilinear velocity in poorly performing sperm. We also demonstrated that peptide is effective on bovine and mouse fresh epididymal, bovine frozen-thawed ejaculated and fresh non-human primate testicular sperm. Finally, in mouse IVF, the production of 2-cell embryos was increased by 24% when sperm were treated with the peptide.

**LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION:** This work is an *in vitro* evaluation of the ability of spermaurin to improve sperm motility parameters. Another limitation of this study is the small number of human sperm samples tested with the natural ( $n = 36$ ) and synthetic ( $n = 12$ ) peptides. Moreover, the effect of the peptide on IVF outcome was only tested in mouse and further tests with human and bovine gametes are required to confirm and extend this result in other mammalian species.

**WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS:** This work confirms our initial study showing that venoms represent an interesting source of molecules that are able to modify sperm physiology. Moreover, this work presents the first demonstrated biological action of a venom peptide from the scorpion *S. m. palmatus* with sequence similarities to LaI peptide from *Liocheles australasiae* (Wood scorpion), a widespread family of DRPs.

**LARGE SCALE DATA:** Not applicable.

**STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S):** This work is part of the project 'LAB COM-I4 LAB7 0004 01-LIPAV', funded by the program LabCom 2014 from the French Research Agency (ANR). Dr Arnoult reports grants from IMV Technologies during the conduct of the study. In addition, Drs Arnoult, Martinez, Ray and Schmitt have a patent EPI 6305642.7 pending containing some of the information presented in this manuscript.

**Key words:** male infertility / sperm motility / pharmacology / library screening / LaI-like peptide / scorpion venom / peptide synthesis

## Introduction

Sperm motility is a key parameter for fertilization. Mammalian fertilization occurs deep within the female tract, close to the oocyte release point and sperm, which is released in the vagina, must reach the meeting point by swimming through the female tract. Moreover, motility is also required for sperm to cross the protective layers surrounding the oocytes. Finally, sperm flagellum beating is also essential for gamete fusion (Ravaux et al., 2016). The motility of sperm is thus crucial for the sperm to deliver its DNA content into the oocyte. As a consequence, any disturbance in sperm motility has a strong impact on fertilization and leads to subfertility or infertility. It was clearly shown that the percentage of conception depends on the number of motile sperm (Publicover and Barratt, 2011) and for these reasons, sperm motility is systematically assessed in a context of couple infertility. Sperm exhibiting absent or low motility, a condition known as asthenozoospermia, is an important cause of couple infertility and accounts for ~20% of observed defects (Thonneau et al., 1991; Curi et al., 2003).

Despite the development of ICSI, which even allows the treatment of patients presenting with complete sperm immobility (Wamborgue et al., 2016), sperm motility remains an important variable in ART. The discovery of a drug that could potentially increase sperm motility would be first essential in the domain of cryopreservation because sperm cryopreservation is an important component of ART. Indeed, extreme low temperature treatment decreases the motility of frozen-thawed sperm and thus hampers their ability to successfully fertilize the oocytes in artificial insemination (AI) as well as in IVF. Such a drug, with an ability to improve the motility of frozen-thawed sperm, would

encourage practitioners to use IVF, which partially preserves the sperm selection that operates during natural fertilization instead of using routine ICSI, which may be associated with a higher risk of birth defects (Davies et al., 2012). Secondly, such a compound would also be beneficial for azoospermic patients requiring testicular sperm extraction. Density gradient selection of motile sperm is often not useable because the number of sperm is very low, in particular in cases of non-obstructive azoospermia. Motile sperm can be more easily detected and recovery is greatly improved when sperm motility is enhanced and, furthermore, the selection of motile sperm ensures the selection of mature and likely viable spermatozoa. Enhancing sperm motility thus represents a key parameter to improve the extraction of mature sperm from testis biopsies. Sperm motility was also shown to be positively associated with the quality of the sperm nucleus (Nosrati et al., 2014) thus showing an added benefit to the selection of the most motile sperm. Moreover, such a drug would also be interesting for livestock, where AI with frozen-thawed sperm is heavily used, forcing the AI centers to increase sperm concentration in straws to circumvent the decreased motility of frozen-thawed sperm, reducing the overall success of the method.

For these reasons, significant efforts were made to identify pharmacological drugs able to improve sperm motility (Hammit et al., 1989; Lanzafame et al., 1994). Phosphorylation of sperm proteins, such as A-kinase anchoring proteins or glycogen synthase kinase-3 A, is a key control step inducing sperm motility (Somanath et al., 2004; Luconi et al., 2005). A cascade of different kinases ending with protein kinase A (PKA) controls these phosphorylations (Luconi et al., 2004). Because PKA is stimulated by increased concentrations of cyclic AMP,

both inhibition of phosphodiesterase, which hydrolyzes cyclic AMP, and stimulation of cyclic-AMP production improve sperm motility. It was shown that stimulation of cyclic-AMP production by 2-deoxyadenosine, an analog of adenosine, increased the percentage of motile sperm and was also potent in improving the motility of frozen-thawed human sperm (Aitken et al., 1986). Another compound, kallikrein, which improves cyclic-AMP production through increased fructose transport across the plasma membrane, was shown to stimulate sperm motility (Schill, 1975). The inhibitors of phosphodiesterase, for example xanthine derivatives such as pentoxifylline or caffeine, were successfully used to improve sperm motility (De et al., 1978) and to prepare testicular sperm (Tasdemir et al., 1998; Kovacic et al., 2006). However, some concerns arose concerning the use of this family of drugs, such as low specificity (Tournaye et al., 1994) and activation of acrosome reaction, leading to a progressive disinterest in this compound (Terriou et al., 2015). In order to find an alternative to xanthine derivatives, the screening of drugs able to more specifically inhibit sperm phosphodiesterases was performed recently and several compounds were identified including papaverine (Tardif et al., 2014). Phosphoinositide (PI)-3 kinase, another kinase of the cascade ending with the PKA was also targeted. Because it has been shown that phosphorylation of PKA by PI-3 kinase inhibits sperm motility, inhibitors of PI-3 kinase, such as LY294002, were therefore tested and shown to be potent stimulators of sperm motility in human (Luconi et al., 2001). It is worth noting that most of the studies performed on molecules able to improve sperm motility focused on the pathway controlling the activity of PKA. Only a few other compounds showing positive effects on sperm motility and involving other pathways, such as relexin or platelet activating factor, were characterized (Essig et al., 1982; Roudebush, 2001). However, contradictory reports showed notable differences in their potency (Lanzafame et al., 1994).

The aim of this work was to discover new bioactive natural compounds able to enhance sperm motility and unrelated to previous potent molecules in order to expand the range of molecules stimulating sperm motility. Moreover, these original compounds may highlight new molecular mechanisms controlling sperm motility and thus improve our limited knowledge of sperm motility.

To discover new pharmaceutical entities, large scientific programs have been launched all over the world to identify new drugs based on biotechnology and known as 'biologics'. The attractiveness of 'biologics' as novel drugs is attested by the success in bringing to market therapeutic peptides, proteins and antibodies, including over 140 peptides under clinical development and >50 therapeutic peptides on the market for >60 pathologies (Fosgerau and Hoffmann, 2015). The potential of therapeutic proteins stems from their high selectivity (<0.1 nM), often at the receptor subtype level, which is a clinically important feature that limits their side effects. Among biologics, we will focus on the subset that are peptide-based drugs and in particular disulfide-rich peptides (DRPs). These peptides are conformationally constrained, which provides them with an exceptional *in vivo* stability. Since 2000, seven DRPs have been approved by the US Food and Drugs Administration, and several dozens of others are currently under preclinical or clinical evaluation (Gongora-Benitez et al., 2014). Interestingly, venoms represent a remarkable source of DRPs with still unforeseen pharmacological profiles and thus represent an under-exploited reservoir of pharmacological compounds (Vetter et al., 2011). Because of the great potential of venom extracts, we

performed the first sperm bioassay-driven analysis of venom extracts and demonstrated that animal venoms contain numerous compounds able to modulate sperm physiology (Escoffier et al., 2010, 2011). In particular, we characterized several compounds able to inhibit sperm motility. During screening, several fractions of venoms were shown to improve mouse sperm motility. Here we showed that a fraction of the venom from the scorpion *Scorpio maurus palmatus* stimulates the motility of sperm from different mammalian species (human, non-human primates (NHP), bovine and mouse). Proteomic analysis enabled us to identify a peptide of 73 amino acids that we named spermaurin, which increased the motility of fresh and frozen-thawed ejaculated sperm in different mammalian species. Interestingly, spermaurin is also a potent drug to stimulate testicular sperm motility. Finally, we showed that spermaurin improves mouse IVF outcome.

## Materials and Methods

### Biological samples

#### Human sperm

Human sperm were obtained from patients consulting for diagnosis or undergoing ART at the fertility center of Grenoble University Hospital (Grenoble, France). The samples were then cryopreserved and stored in the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Germetheque (certification under ISO-9001 and NF-S 96-900) following a standardized procedure. Consent for CRB storage was approved by the CPP Sud-Ouest of Toulouse, France (coordinator of the multi-site CRB Germetheque). The storage and cession authorization number for the CRB Germetheque is AC2009-886. The scientific and ethical board of the CRB Germetheque approved the cession of the semen samples for this study. The total number of human samples used in this study is 56.

Ejaculate was liquefied at 37°C for 30 min and sperm were washed twice in Sperm Preparation Medium (Origio, Måløv, Denmark) by centrifugation at 500g for 5 min at room temperature. Concentration is then adjusted for computer-assisted sperm analysis (CASA) (~8 million/ml). Sperm were also frozen with SpermFreeze (Fertipro NV, Beernem, Belgium) for further analysis as frozen sperm. All patients consulted for couple infertility and we only used sperm with normal morphology parameters according to the [World Health Organization 2010](#) guidelines (World Health Organization, 2010).

All the patients signed an informed consent for use of part of their sample in research programs. Approval for the study was given by the Germetheque ethical board.

#### NHP sperm

Testes were collected from Mauritian cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), 4–6 years old, euthanized in the framework of another studies at MIRCen (CEA/INSERM UMR1169, Fontenay-aux-Roses, France; agreement number: 92-032-02). These animals had not received any treatment that could have affected spermatogenesis. Testis, with epididymis attached and kept at 4°C, were delivered and processed within 24 h after NHP death. Testicular sperm were collected from a biopsy, and seminiferous tubules dispersed with needles. Testicular sperm were selected by a swim-up procedure (30 min, 37°C) and the upper fractions were washed twice in DMEM high glucose media (by centrifugation at 500g, 5 min). The total number of NHP samples used in this study is 3.

#### Bovine sperm

Testes were collected at the slaughter house and sperm extracted <3 h after bull death. Epididymal sperm were collected from the distal part of the caudae epididymis in non-capacitating medium sp-TALP (in mM: NaCl

114; KCl 3.2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3; Na-Lactate 10; MgCl<sub>2</sub> 0.5; HEPES 10; NaHCO<sub>3</sub> 25; Na Pyruvate 1; 50 µg/ml Gentamicine; pH 7.4). Epididymal sperm were washed twice in sp-TALP. Frozen bovine sperm were obtained from IMV Technologies (L'Aigle-France) and conserved as straws in liquid nitrogen.

### Mouse sperm

All protocols have been reviewed and approved by the local ethical committee. OF1 male mice were 2–6 months old (Charles River, France). Sperm from caudae epididymides were allowed to swim for 10 min at 37°C in 1 ml of M2 medium (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). Sperm were then washed by centrifugation at 500g twice with M2 medium, and concentration adjusted for CASA analysis.

## Sperm cryopreservation

### Human sperm

Human semen was layered in a plastic tube of 50 ml, and mixed with Spermfreeze (Fertipro NV) (1/0.7 vol/vol) added drop by drop. The suspension was then mounted in straws and frozen first in liquid nitrogen vapor and then dipped in liquid nitrogen.

### Bovine sperm

Fractions of ejaculate were diluted (1/1 vol/vol) at 34°C in OptiXcell medium (IMV Technologies, L'Aigle, France). After 10 min of incubation at 34°C, fractions were diluted to obtain a final concentration of 60 million of sperm/ml. Fractions were then cooled down to 4°C over 4 h then 0.2 ml straws were filled using an MRS1 device (IMV Technologies) and frozen using a DigitCool device (IMV Technologies) using the following parameters: from 4°C to –10°C at 5°C/min, from –10°C to –110°C at 40°C/min, from –110°C to –140°C at 20°C/min. Straws were then stored in liquid nitrogen. Straws were thawed for 30 s at 37°C before assessment *in vitro*.

## Computer-assisted sperm analysis

Samples were divided in two equal samples in terms of volume: one was the treated sample and second was the control sample. For the treated sample, we added a certain volume of peptide (synthetic or natural) dissolved in ultrapure water, while in the control sample, we added the same volume of ultrapure water. Then, both samples were incubated for various times (from 10 min for standard tests to 240 min for analysis of long-lasting effects), and finally the different motility parameters were recorded. The time delay between testing the control and treated samples was around 1 min, and we shifted the order of samples between different experiments. After incubation, the sperm suspension was immediately placed into an analysis chamber (Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, the Netherlands) of 100 µm depth for mouse sperm and 20 µm depth for human, NHP and bovine sperm, and kept at 37°C for microscopic quantitative study of sperm movement. Sperm motility parameters were measured at 37°C using a sperm analyzer (Hamilton Thorn Research, Beverley, MA, USA). The settings employed for analysis were as follows for human, NHP, bovine and mouse, respectively: acquisition rate: 60, 60, 60, 60 Hz; number of frames: 30, 20, 30, 45; minimum contrast: 80, 80, 80, 50; minimum cell size: 3, 4, 5, 5; low static-size gate: 0.85, 0.79, 0.1, 0.3; high static-size gate: 4.24, 2.52, 3.4, 1.95; low static-intensity gate: 0.39, 0.62, 0.3, 0.5; high static-intensity gate: 1.4, 1.4, 1.7, 1.3; minimum elongation gate: 0, 2, 8, 0; maximum elongation gate: 85, 50, 97, 87; magnification factor: 1.89, 1.89, 1.89, 0.7. A minimum of 100 motile spermatozoa were analyzed for each assay. Motile sperm were defined by an average path velocity (VAP) > 1, 1, 1, 1 and progressive sperm were defined by VAP > 25, 25, 50, 30

and average path straightness > 80, 80, 70, 70, for human, NHP, bovine and mouse, respectively. analyze

## Measurement of vitality of sperm treated with spermaurin

Forty microliter of sperm were mixed with 20 µl of eosin 1% diluted in NaCl 0.9% and 20 µl of nigrosin 10% diluted in NaCl 0.9%. Sperm were layered onto a glass slide and dried. A minimum of 100 spermatozoa were analyzed for each assay.

## Venom separation and spermaurin isolation

### Venom origin

Crude venom from *S. m. palmatus* was obtained from Alphabiotoxine Laboratory (Montroeuil-au-Bois, Belgium) or Venomtech (Sandwich, Kent, UK). Ten milligram of lyophilized crude venom was dissolved in 500 µl of 100 mM ammonium acetate pH 6.8 and centrifuged at 10 000g for 10 min. Two hundred and fifty microliter of supernatant were used for further purifications.

### Purification by size exclusion chromatography

Separation was performed on a Superdex peptide 10/300 GL gel filtration column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), with elution at 0.5 ml/min in 100 mM ammonium acetate pH 6.8. Fractions were collected every minute and the absorbance was monitored at 225 nm. The fractions were kept at –20°C until bioactivity screening and mass spectrometry analysis.

## Purification of spermaurin from crude venom of *S. m. palmatus*

### Prepurification by solid phase extraction

The crude lyophilized venom from *S. m. palmatus* (2 mg) was dissolved in 200 µl of 0.1% trifluoroacetic acid (0.1% TFA) and prepurified onto two serially linked SepPak C<sub>18</sub> Light columns (Waters Corporation, Milford, MA, USA), following the manufacturer's instructions and eluted with 3 ml 80% acetonitrile (ACN) in 0.1% TFA. The 80% eluted fraction was dried under vacuum using a vacuum system (Labconco, Freezone 2.5plus, Kansas City, MO, USA) and suspended in 0.1% TFA.

**Analysis by online liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry** A fraction aliquot of an equivalent of 200 µg crude venom was injected for online electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) analysis on an Agilent HPLC HP-1290 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Separation was performed on an Accucore C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 150 mm from Thermo Scientific, Bremen, Germany), maintained at 35°C and online coupled to a Thermo Q-Exactive Orbitrap. Solvent A was 0.1% formic acid and solvent B was ACN in 0.1% formic acid. A linear gradient, starting from 4% B to 60% B for 120 min at a flow rate of 350 µl/min was applied to fractionate the venom components. The high-resolution mass spectrometer was operating in positive polarity and data-dependent mode. The Q-Exactive Orbitrap acquired a full-range scan from 380 to 2000 Th (70 000 resolution, AGC target 3.10<sup>6</sup>, maximum IT 200 ms) and then fragmented the top 10 peptide ions in each cycle (17 500 resolution, AGC target 10<sup>5</sup>, maximum IT 100 ms, intensity threshold 2 × 10<sup>4</sup>, excluding charge-unassigned ions, Normalized Collision Energy selected at 27). Parent ions were then excluded from MS/MS for the next 15 s. The software Chemstation B.04.03 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) and Xcalibur™ 2.2 (Thermo Electron SAS, Courtaboeuf, France) were used to control the HPLC and the mass spectrometer, respectively.

### Isolation of native spermaurin by reversed-phase HPLC

To isolate the bioactive fraction (called 7.8-purified fraction below), an equivalent of 1.7 mg of crude venom was injected using an Agilent HPLC HP-1290 system in the same conditions of elution as detailed above. Fractions were hand collected following the absorbance monitored at 225 nm, dried under vacuum and kept dried until use.

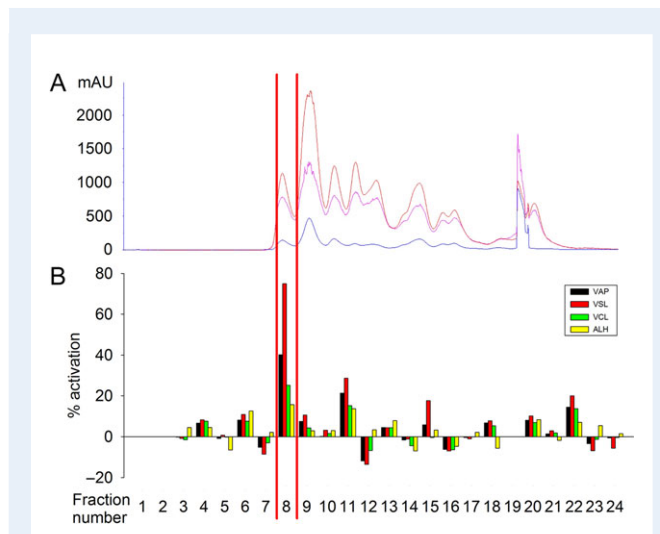
### Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

For matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) analysis, a Bruker Autoflex III equipped with the Smartbeam laser (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was used. Samples were diluted 1:10 in 0.1% TFA and deposited on the MALDI target using the sandwich sample preparation method with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (4CHCA) as matrix. Briefly, 0.5  $\mu$ l of 4CHCA saturated in acetone was spotted onto a polished ground steel target (Bruker Daltonics), followed by the deposition of 0.6  $\mu$ l of the acidified sample and 0.4  $\mu$ l of 4CHCA matrix prepared in 50% ACN in 0.1% TFA. Calibration was performed using a mixture of the Peptide Calibration II kit (mass range 700–4000 Da) and the Protein Calibration I kit (mass range 5000–17 500 Da). Acquisition was performed in a linear positive mode at a laser power setting over the ionization threshold using FlexControl™ 3.3 software (Bruker Daltonics). The data were processed under FlexAnalysis 3.2 (Bruker Daltonics) consisting on baseline subtraction, spectra smoothing and peak picking.

### Peptide synthesis

Spermaurin was synthesized through native chemical ligation (NCL) of two peptide segments followed by oxidative folding to form the four disulfide bridges, using already described protocols. Briefly, an N-terminal cysteinyl peptide segment (sequence:  $^{43}$ CADVLDKSGCRQVPGAASANFPECCPMVIC $^{73}$ K-NH $_2$ ) and a C-terminal crypto-thioester segment (sequence:  $^1$ SGESCKAGKFTVLVGHQNDKSTCTLYKCLNFKRKYALQIS $^{42}$ S-(Hnb)C(StBu)G-NH $_2$ ) were synthesized on a Prelude peptide synthesizer (Protein Technologies, Tucson, AZ, USA) using standard Fmoc/tBu chemistry at a 25  $\mu$ mol scale starting from a Tentagel resin equipped with a Rink's amide linker, and including automated introduction of the N-2-hydroxy-5-nitrobenzyl (Hnb) group through on resin reductive amination. Both peptide segments were purified by C18 reverse phase (RP)-HPLC then chemoselectively coupled under standard NCL conditions (2 mM peptide segments, 50 mM tris-carboxyethylphosphine, 100 mM 4-mercaptophenylacetic acid, 6 M guanidinium chloride, 200 mM phosphate buffer, pH 6.5, 37°C, 18 h) (Lelievre et al., 2016; Terrier et al., 2016). Purification by C18 RP-HPLC afforded the pure reduced form of spermaurin (sequence:  $^1$ SGESCKAGKFTVLVGHQNDKSTCTLYKCLNFKRKYALQISSCADVDLKSRCRQVPGAASANFPECCPMVIC $^{73}$ K-NH $_2$ ).

Peptide purification was performed by RP-HPLC on a Nucleosil C18 column (300 Å, 250 × 10 mm) (Macherey-Nagel, Düren, Germany), maintained at 25°C. Solvent A was 0.1% TFA in water and B was 0.1% TFA in ACN. A linear gradient, starting from 25% B to 45% B for 30 min at flow rate of 3 ml/min was applied and afforded the pure reduced form of spermaurin through collection of the peak identified as the target compound. The purified compound was further analyzed by ESI-HRMS (Bruker maXis™ 22 ultra-high-resolution Q-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), positive mode): [M+H] $^+$  23  $m/z$  7873.8160 (theoretical monoisotopic  $m/z$  calculated for C $_{337}$ H $_{540}$ N $_{97}$ O $_{102}$ S $_9$ : 7873.8162) and analytical HPLC on a Chromolith HighResolution RP-18e column (150 Å, 10 × 4.6 mm) (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), maintained at 25°C. Solvent A was 0.1% TFA in water and B was 0.1% TFA in ACN. A linear gradient, starting from 20% B to 50% B for 30 min at flow rate of 3 ml/min was applied. A single peak was observed at a retention time = 2.93 min under these conditions.



**Figure 1** A fraction of the venom of *Scorpio maurus palmatus* improves mouse sperm motility. **(A)** Chromatogram measured at different wavelengths (red 215, pink 227 and blue 280 nm) and showing the separation of 12.5 mg of venom by size exclusion chromatography (SEC) on a Superdex peptide 10/300 GL column. **(B)** Fractions were lyophilized and subsequently dissolved in 200  $\mu$ l ultra-pure H $_2$ O. Activity of the corresponding fractions (dilution 1/20) on mouse sperm motility parameters including curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL) and amplitude of lateral head displacement (ALH), expressed as a percentage increase (positive values) or decrease (negative values) of motility parameters relative to a non-treated sperm aliquot. Fraction 8 (F8) was able to highly increase sperm motility. mAU: Arbitrary unit.

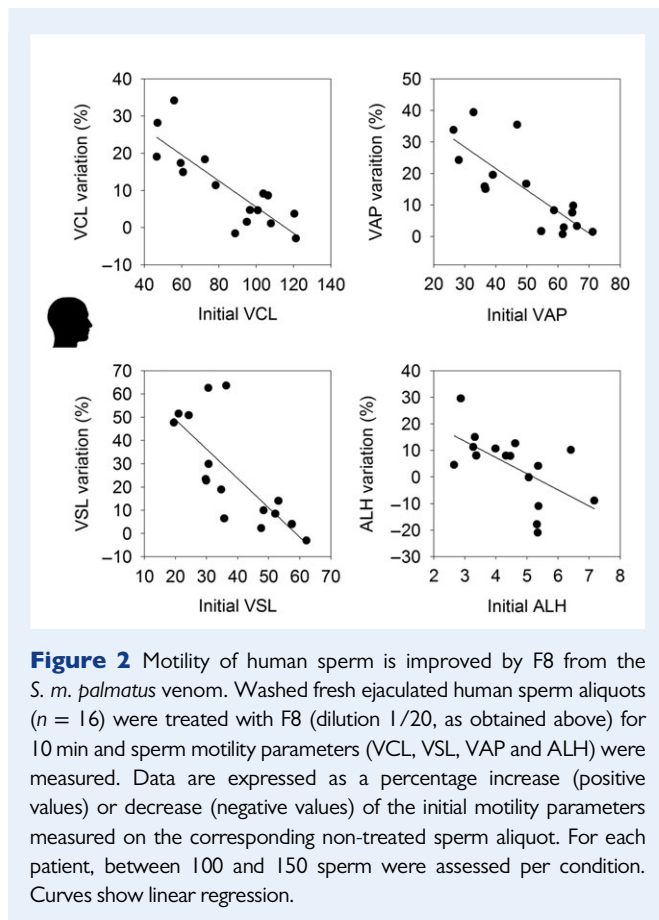
Subsequent oxidative folding (10  $\mu$ M peptide concentration, 0.1 mM oxidized glutathione, 1 mM glutathione, 1 mM EDTA, 100 mM TRIS, pH 8.5, 20°C, 24 h) (Da Silva et al., 2009; Derache et al., 2012) afforded a product that was purified to homogeneity by C18 RP-HPLC, and which MS analysis was consistent with the formation of four disulfide bridges. ESI-HRMS: [M+H] $^+$   $m/z$  7865.7627 (theoretical monoisotopic  $m/z$  calculated for C $_{337}$ H $_{540}$ N $_{97}$ O $_{102}$ S $_9$ : 7865.7536). MALDI-TOF MS (Bruker Ultraflex, reflectron mode, matrix: 4CHCA): [M+H] $^+$   $m/z$  7871.4 (theoretical average  $m/z$  calculated for C $_{337}$ H $_{540}$ N $_{97}$ O $_{102}$ S $_9$ : 7870.2). HPLC: retention time 2.29 min (Chromolith HighResolution RP-18e, 150 Å, 10 × 4.6 mm column, 3 ml/min flow rate, 20–50% gradient of 0.1% TFA in H $_2$ O and 0.1% TFA in MeCN).

### Mouse IVF

Two-cell embryos were produced as already described (Abi Nahed et al., 2014). Briefly, eggs were collected from oviducts of synchronized OF1 females and sperm from cauda epididymis of OF1 males. Capacitated sperm were introduced into droplets containing oocytes in M16 medium (Sigma-Aldrich, France) and unbound sperm were washed away after 4 h incubation. Twenty-four hours after fertilization, 2-cell embryos (as an indication of successful fertilization) were scored. Number of replicates = 6.

### Statistical analyses

The number of biological replicates is given as  $n$  and for each replicate, between 100 and 150 sperm were assessed per condition. Statistical analyses were performed with SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., San José,

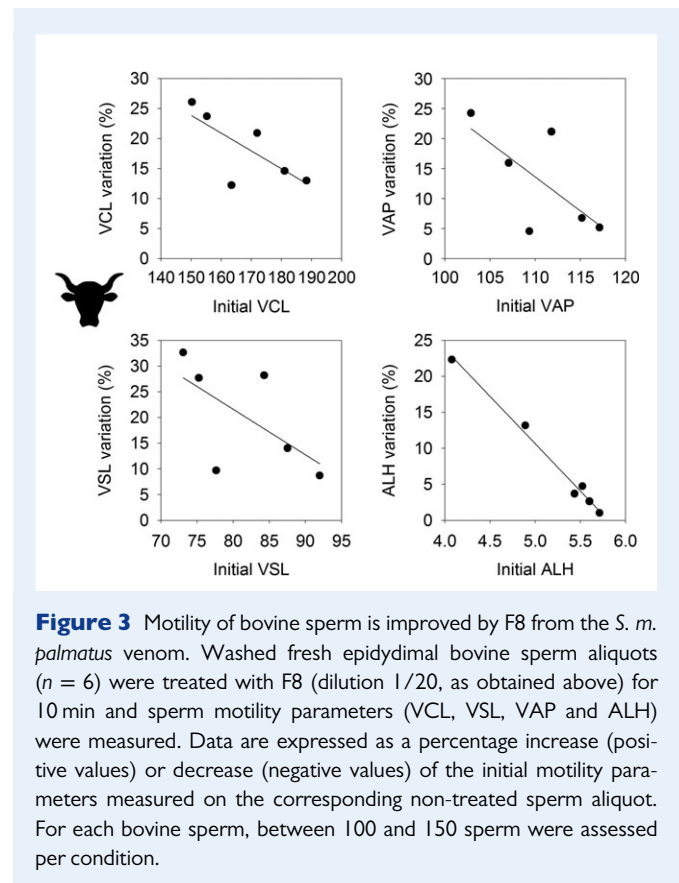


CA, USA). Student's *t*-tests were used to compare the effect of spermaurin on sperm motility versus control. Data represent mean  $\pm$  SEM or SD, as indicated. Statistical tests with a two-tailed *P*-values  $\leq 0.05$  were considered significant.

## Results

### Presence of a compound which improves sperm motility in the venom of *S. m. palmatus*

The goal of this study was to discover original compounds able to improve sperm motility, inspired by our previous study showing that screening a library of compounds made from snake venoms enabled us to identify compounds able to modulate sperm motility (Escoffier et al., 2010). In this study, we focused our attention on the venom of the scorpion *S. m. palmatus*. The crude venom was fractionated by SEC in 24 fractions (Fig. 1A). A CASA system was used to test the effects of venom fractions on mouse sperm motility. We examined the following sperm motility parameters: VAP ( $\mu\text{m/s}$ ), the straight-line velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), the curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ) and the amplitude of lateral head displacement (ALH, microns) (Fig. 1B). One of the fractions, Fraction 8 (F8), stimulated the different parameters of sperm velocity. Although ART are used in the mouse species, improvement of sperm motility is not required, contrary to other species such as human and bovine. For this reason, the ability of F8 to improve sperm motility parameters was then tested on fresh ejaculated human and fresh epididymal bovine sperm. In human, there is a great variability

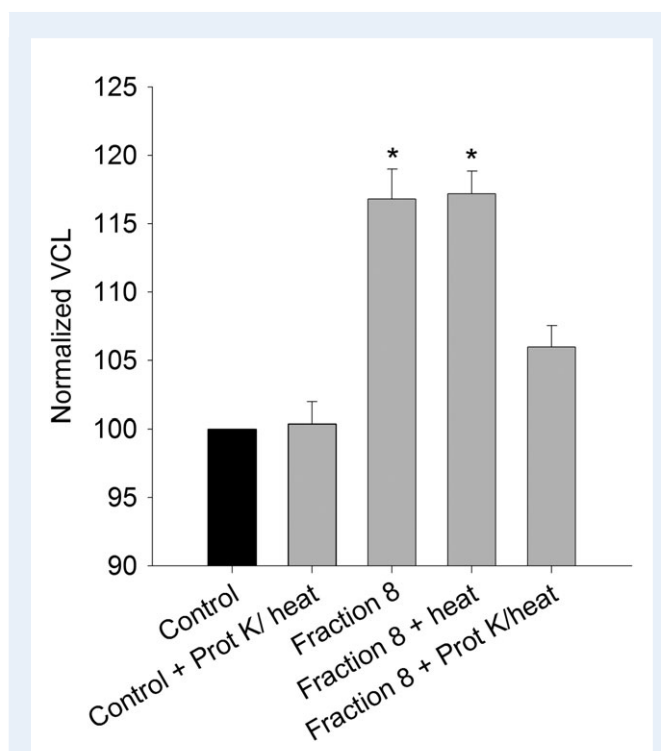


among the different patients consulting at the department of reproduction, and for this reason, we plotted for each patient ( $n = 16$ ) the percentage increase of VAP, VCL, VSL and ALH as a function of initial (non-treated) values (Fig. 2). Figure 2 shows clearly that F8 improved the four sperm motility parameters and that the potency of the fraction was inversely proportional to the initial value of the parameters measured without treatment. Contrary to human sperm, bovine sperm present a noticeable homogeneity among the different bulls, and most of them presented a high percentage of motile sperm (70–75%,  $n = 6$ , fresh epididymal bovine sperm). As observed for human sperm with the highest motility parameters, F8 poorly stimulated high performing bulls' sperm (Fig. 3). Nevertheless, we found one bull with poorer parameters, with a VCL  $< 155 \mu\text{m/s}$ , and interestingly F8 improved the VCL of this bull's sperm (Fig. 3). These experiments clearly showed that F8 contained one or several compounds able to improve motility of fresh sperm in mouse, bovine and human, the two latter species being particularly relevant in the framework of ART improvement.

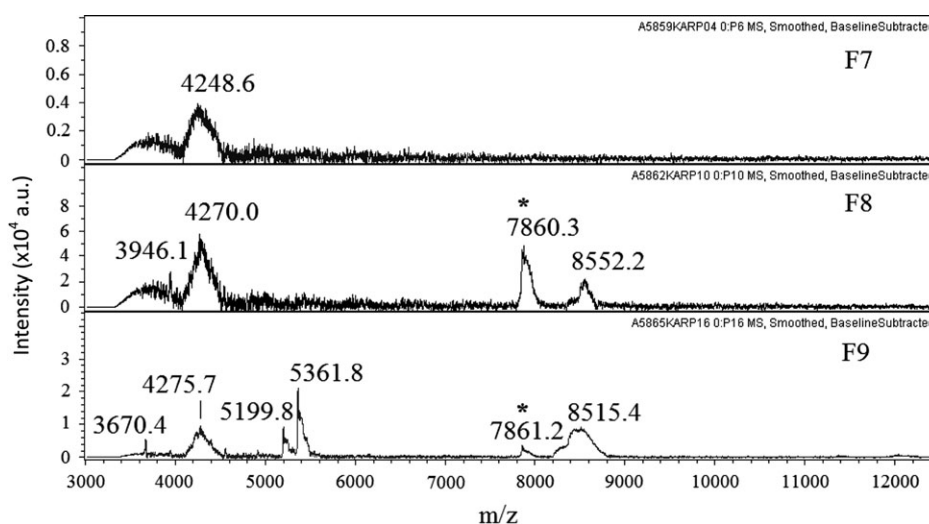
### Identification of a peptide of 73 amino acids responsible for the effect on sperm motility

The next step was to identify the chemical nature of the compound(s) responsible of the biological effect. Several types of molecules are present in venoms, including proteins, peptides and polyamines. In order to test the hypothesis that the chemical nature of the molecule(s) responsible for the observed biological effect was a protein or a peptide, F8 was incubated with proteinase K at  $56^\circ\text{C}$  for 1 h before testing

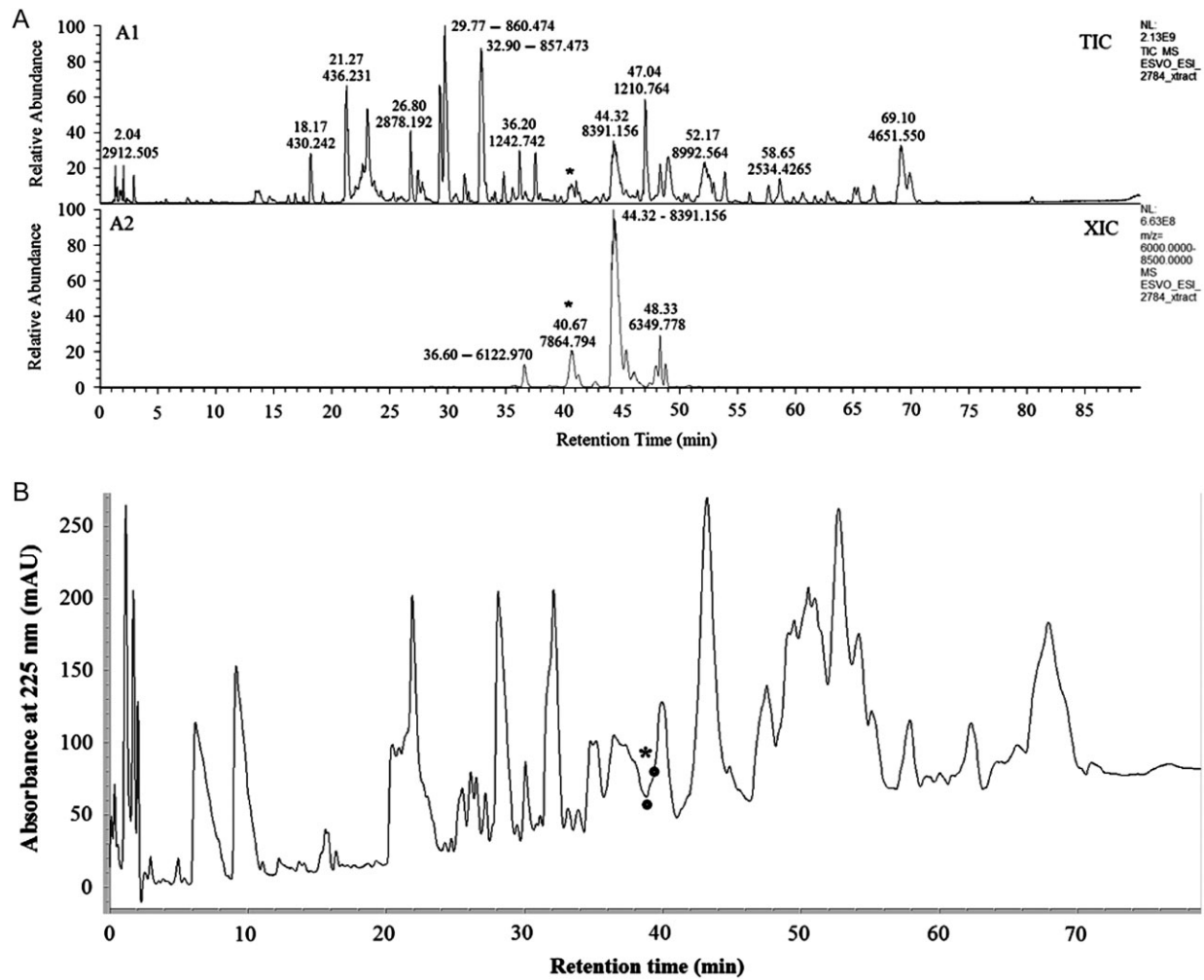
its activity on sperm motility (Fig. 4). This protease was chosen because of its weak specificity and its action on a broad type of protein or peptide substrates. We first checked that proteinase K (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) heated at  $56^\circ\text{C}$  had no effect by itself. The increase of sperm motility observed in the presence of F8 was blocked when the fraction was pretreated with proteinase K (Fig. 4). This result strongly suggested the protein or peptide nature of the molecule(s) responsible for the biological effects. Moreover, we previously calibrated the gel filtration column with protein standards (cytochrome C, aprotinin and vitamin B12) (Escoffier et al., 2010) and showed that F8 co-eluted within the mass range of 5–12 kDa. Altogether, these results indicated that the active compound in F8 was likely a polypeptide/small protein. In order to go further in the identification of the bioactive compounds present in F8, MALDI-MS analysis was performed on the active F8 and on the two surrounding fractions (F7 and F9) in order to determine the complexity and the molecular mass of the compounds present in these fractions (Fig. 5). In F8, four different molecular ions were observed at  $m/z$  3946, 4270, 7860 and 8552 (average values, see Fig. 5, F8). In fraction F7, which had no effect on sperm motility, only a molecular ion at  $m/z$  4249 was detected. In contrast in F9, which had a very small positive effect on sperm motility, several molecular ions were detected at  $m/z$  ranging from 3670 to 12 043 f. The comparison of the different mass spectra obtained on F7–F9 allowed the identification of a unique peptide present in F8 and F9 at  $m/z$  7860.3 and 7861.2, respectively (see Fig. 5, F8, F9). To confirm that the 7.8 kDa molecule was responsible for the biological effect, we next purified this peptide by online LC–ESI-MS/MS in a two-step approach. After prepurification of the crude venom ( $\sim 2$  mg) by solid phase extraction, a fraction aliquot (equivalent to 200  $\mu\text{g}$  of crude venom) was subjected to reversed-phase chromatography by online LC–ESI-MS/MS to determine the retention time of the 7.8 kDa molecule, which was 40.67 min as observed in Fig. 6A



**Figure 4** Treatment of fraction 8 (F8) by proteinase K inhibits its biological activity on sperm motility. Washed ejaculated human sperm ( $n = 3$  replicates) was either incubated with F8 (dilution 1/20, as obtained above), or with F8 pretreated with proteinase K (Prot K) at  $56^\circ\text{C}$  for 60 min. Heated proteinase K added at the same concentration had no effect on sperm motility. Heat by itself has no effect on biological activity of F8. For each replicate, between 100 and 150 sperm were assessed per condition. Data represent mean  $\pm$  SD. Statistical differences were assessed using  $t$ -test. \* $P < 0.05$  versus control.



**Figure 5** MALDI-MS analysis of fractions of crude venom of *S. m. palmatus* purified by SEC. The three fractions (F7–F9) were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) using 4HCCA as matrix and a sandwich sample preparation. Mass spectra were recorded in a linear positive mode. The molecular ions are expressed in  $m/z$  (average values). The 7.8 kDa peptide is marked with an asterisk.



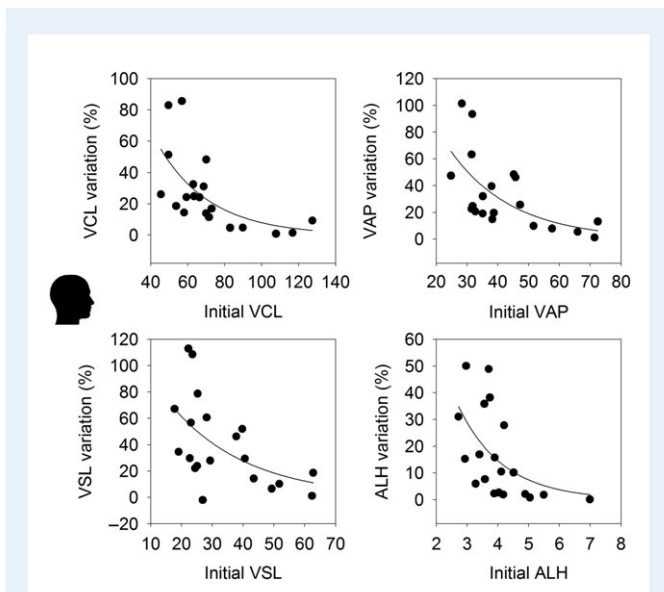
**Figure 6** Analysis by liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) of crude venom of *S. m. palmatus* following prepurification by solid phase extraction. **(A)** The venom constituents (equivalent to 200  $\mu$ g crude venom) were purified by a linear gradient of acetonitrile (ACN) on a  $C_{18}$  reversed-phase column coupled online to a high-resolution Orbitrap mass spectrometer. The liquid chromatography (LC)–ESI-MS/MS reconstructed chromatograms after deconvolution of the acquired molecular ions (monoisotopic values) at  $m/z$  are represented as a full chromatogram (A1, total ion current) and as an extracted ion chromatogram between  $m/z$  6000 and 8500 (A2, XIC); the retention time and monoisotopic value of major peaks are indicated. The peptide of interest at  $m/z$  7864.79 is eluted at 40.67 min in our eluting conditions (see asterisk). **(B)** An equivalent of 1.7 mg of crude venom were purified by reversed-phase HPLC UV, fractions were hand collected following the absorbance monitored at 225 nm. The molecular ion ( $m/z$  at 7864.79) corresponding to the peptide of interest was eluted at 40 min. Fraction 34 (collected between the two dots and indicated by an asterisk) containing the 7.8-purified peptide was lyophilized and subsequently dissolved in 100  $\mu$ l ultrapure  $H_2O$ .

(Panel A2). To go further into the isolation and characterization of the 7.8 kDa peptide, an equivalent of 1.7 mg of crude venom was injected on the same column without coupling the LC to the mass spectrometer to collect manually three fractions eluting between 38 and 41 min (Fig. 6B), following the absorbance at 225 nm. The presence of the 7.8 kDa was confirmed by MALDI-MS (data not shown) only in the fraction eluted between 39 and 40 min. The potency of the three collected fractions was tested on the motility parameters of human sperm and only the fraction comprising the 7.8 kDa peptide improved the four sperm motility parameters (Fig. 7). This fraction was called 7.8-purified fraction. Similar to what observed with

the SEC fraction, the potency of the purified 7.8 kDa peptide was inversely proportional to the initial value of the parameters measured without treatment (Fig. 7). These results strongly suggest that 7.8 kDa peptide is responsible for the improvement of the sperm motility parameters.

Interestingly, the transcriptome of the venom gland of *S. m. palmatus* was recently released (Abdel-Rahman et al., 2013), and there is only one peptide with a molecular mass at 7.8 kDa, referred to as Smp73. This peptide, belonging to the family of the LaI-like peptide, has 73 amino acids, including eight cysteines presumably involved in four internal disulfide bonds and a putative





**Figure 7** The 7.8-peptide purified by HPLC/MS has similar activity to F8 on sperm motility parameters. Washed ejaculated human sperm aliquots ( $n = 20$  replicates) were treated with 1/40 of 7.8-purified fraction (fraction 34) for 10 min and sperm motility parameters (VCL, VSL, VAP and ALH) were measured. Data are expressed as percentage of increase of the initial motility parameters measured on the corresponding non-treated sperm aliquot. Data were fitted with the equation:  $\text{variation} = ae^{-bx} + ce^{-dx}$ ,  $x$  corresponding to initial values, with SigmaPlot 10.

amidated C-terminus, with the following deduced amino acid sequence:

SGESCKAGKFTVLVGHQNDKSTCTLYKCLNFKRKYALQISSCAD VDLKSGCRQVPGAASANFPECCPMVICK<sub>-NH<sub>2</sub></sub>. These results strongly suggest that the 7.8 kDa peptide purified in our experiments corresponds to the Smp73 peptide identified by transcriptomics in Abdel-Rahman publication.

To confirm the identity of the 7.8 kDa present in 7.8-purified fraction as Smp73, we first synthesized Smp73 through NCL of two segments, making use of our recently described methodology for the Fmoc-based solid phase synthesis of the thioester segment (Mende and Seitz, 2011), based on a stable 'crypto-thioester' precursor that is converted *in situ* into a reactive thioester (Terrier et al., 2016). Subsequent oxidative folding using a glutathione-based redox buffer (Da Silva et al., 2009; Derache et al., 2012) afforded a peptide with a 8-Da decrease in mass (Fig. 8A), consistent with the formation of four disulfide bonds (Nagao et al., 2015). This synthetic peptide showed an identical retention time in RP-HPLC and molecular mass as the natural product, suggesting a native fold (data not shown). Next, a new fractionation of the scorpion *S. m. palmatus* crude venom was performed and the peptide of 7.8 kDa was found by MALDI-TOF-MS (TOF, time of flight) to be present in the fraction #40, eluted at the retention time between 39 and 40 min. Fraction#40 and the synthetic peptide Smp73 were then analyzed by LC-MS/MS before and after reduction-alkylation to assist in the identification of spermaurin as Smp73. Two compounds sharing the same mass and the same multicharge profile were found at the same retention time, before and after reduction-alkylation (data not shown). This confirms that both peptides have the

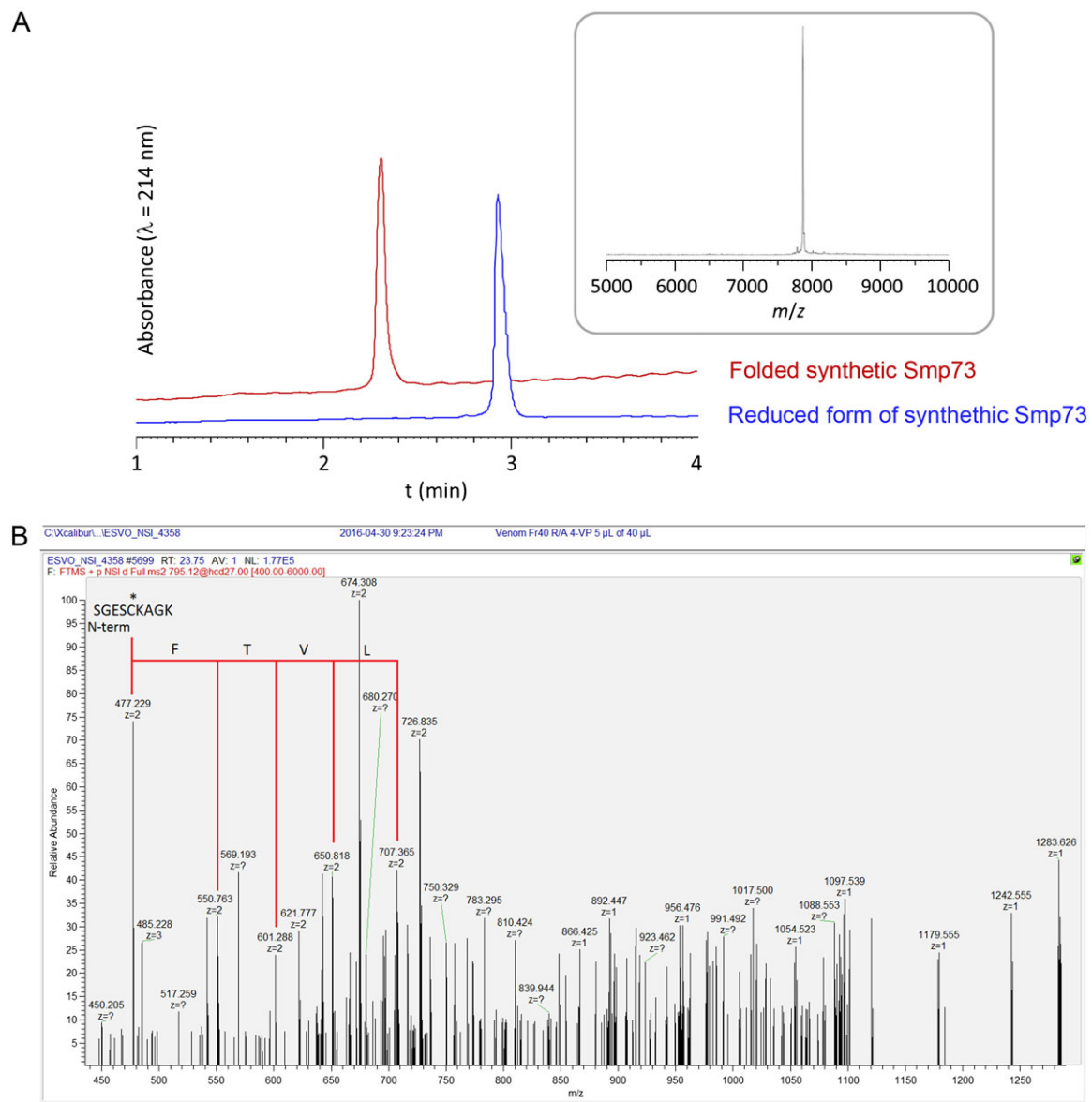
same number of cysteines and are C-terminally amidated. In the reduced-alkylated samples, an oxidized form of this peptide was also found and is the major form for the crude venom fraction #40. Additionally, the sequence of the peptide from the crude venom fraction was partially determined from one MS/MS spectrum (Fig. 8B). The ion at  $m/z$  477.229<sup>2+</sup> corresponded to the peptide's N-terminal fragment **SGESCKAGK**, including an alkylated cysteine. An estimated amount of  $\sim 5 \mu\text{g}/\text{mg}$  of crude venom of this peptide was determined to be present in 3.4 mg of crude venom, thanks to the data obtained by LC-ESI-MS/MS and to the availability of the synthetic peptide. We finally tested the biological effect of the synthetic peptide on sperm motility to unequivocally demonstrate that the 7.8 kDa peptide corresponds to Smp73. We first determined the dose-response curve of the synthetic peptide on frozen-thawed human sperm and its activity corresponded to a bell-shape curve and the maximum activation was obtained at concentrations around 170 nM (Fig. 9). Activity was next tested on frozen-thawed bovine and human sperm from fertile donors (Fig. 10A, B) and fresh epididymal mouse sperm (Fig. 10C) at the potent concentration of 170 nM. The results clearly showed that the synthetic peptide was able to improve sperm motility as the natural 7.8 kDa did. Altogether, these results demonstrated that the 7.8 kDa found in F8 and purified by LC/MS corresponds to the La I-like peptide of 73 amino acids identified by transcriptomic analysis and called initially Smp73. As the peptide was extracted from *S. m. palmatus* scorpion and because of its activity on sperm, we called this peptide 'spermaurin'.

### Spermaurin does not affect sperm viability and has a long-lasting effect on sperm motility

Although none of the La I-like peptides tested so far showed any cellular or *in vivo* toxicity (Quintero-Hernandez et al., 2015), the viability of the sperm incubated with spermaurin was assessed. Human fresh ejaculated sperm were incubated for up to 240 min with the peptide and the percentages of viable sperm were measured by eosin-nigrosin staining and compared to the percentage of untreated viable sperm (Fig. 11A). No difference was observed between the two conditions, confirming the absence of toxicity of spermaurin. *In vitro*, the motility of sperm decreases rapidly and we wondered whether the stimulation of sperm motility by spermaurin could affect the kinetics of sperm motility decrease. To answer this question, VCL of ejaculated human sperm was followed for 240 min in the presence or absence of spermaurin. The VCL of treated sperm was always higher than control VCL during the whole 240 min, indicating that spermaurin prevented the motility decrease over time (Fig. 11B).

### Spermaurin is a potent tool to improve testicular sperm motility

We clearly showed above that spermaurin improved key parameters of fresh epididymal and ejaculated sperm motility. The next step was to assess if spermaurin can improve testicular sperm motility. In human, testicular sperm is collected for use in ART in patients presenting either obstructive or non-obstructive azoospermia. However, testicular sperm have a very low motility and remain embedded in the testicular tissue. To circumvent this problem, compounds able to increase their motility are often used, thus helping sperm collection and recovery of the most mature sperm. At this stage, testicular

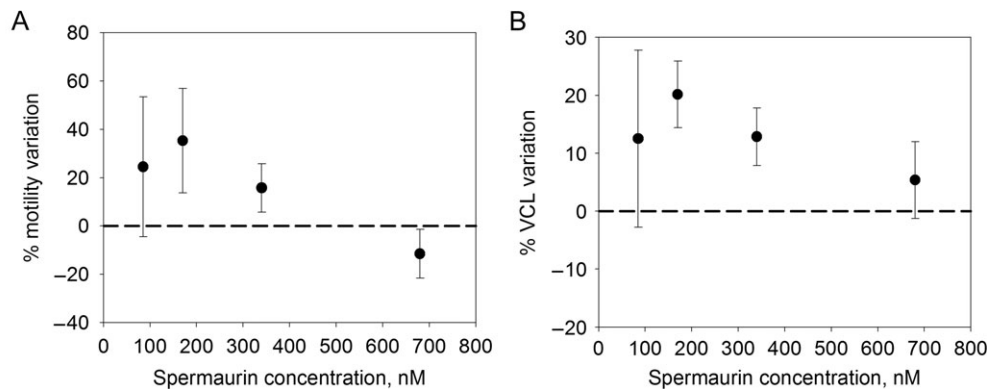


**Figure 8** Identification of the compound responsible for the effect on sperm motility by peptide synthesis and tandem MS. **(A)** HPLC characterization of the reduced and folded form of synthetic Smp73 (spermaurin), as described previously by [Abdel-Rahman et al. \(2013\)](#). Blue trace: purified reduced form; red trace: purified folded spermaurin; black insert: mass spectrum of the folded form obtained by MALDI-time of flight (TOF). **(B)** MS/MS spectrum for the ion at  $m/z$  795.12, from the reduced/alkylated venom fraction #40 obtained by LC-MS/MS. Daughter ions describing the peptide's sequence have been annotated; The asterisk above the Cysteine (C) in the sequence is a reminder that the peptide's cysteines have been reduced-alkylated by 4-vinyl-pyridine and as such support and extra mass of 105 Da.

human sperm recovery to test spermaurin was not possible. We therefore tested spermaurin on testicular NHP sperm. Macaca testicular sperm was collected from *Cynomolgus* monkeys (*M. fascicularis*) euthanized for other research purposes. Testicular NHP sperm were incubated for 10 min either with the natural or the synthetic spermaurin. Sperm motility parameters were measured with the CASA system before and after treatment (Fig. 12A). The comparison of the dot plots clearly shows that spermaurin increased sperm motility parameters, increasing both the number of motile sperm and the mean VCL (Fig. 12BC).

### Spermaurin increases fertilization outcome in mouse

The percentage of motile sperm directly influences the rate of IVF ([Publicover and Barratt, 2011](#)) and because spermaurin increased both the percentage of motile sperm and the mean VCL, the ability of spermaurin to increase the yield of IVF in mouse was assessed. This work was carried out before we obtained the synthetic spermaurin and was therefore carried out using the 7.8-purified fraction diluted at 1/40, a dilution known to improve sperm motility parameters.



**Figure 9** Dose–response curve of the activity of the synthetic spermaurin on sperm motility and velocity. **(A)** Frozen-thawed human sperm were incubated with the synthetic peptide for 10 min and percentage of motile sperm increase in function of different synthetic peptide concentrations was assessed. **(B)** Frozen human sperm were incubated with the synthetic peptide for 10 min and percentage of VCL increase in function of different synthetic peptide concentrations was assessed ( $n = 4$  replicates). For each replicate, between 100 and 150 sperm were assessed per condition. Data represent mean  $\pm$  SD.

Spermaurin was introduced into the droplets containing the pooled eggs from several synchronized females at the same time as the sperm and IVF was evaluated as the percentage of 2-cell embryos (ratio of the number of 2-cell embryos to the number of layered oocytes within one droplet), 24 h later (Fig. 13). Gamete treatment with spermaurin increased the yield of 2-cell embryos after IVF from  $47.2 \pm 1.5\%$  to  $58.6 \pm 3.8\%$  ( $n = 6$ ,  $P < 0.001$ ), representing an increase of 24%, and thus suggests that increasing sperm motility parameters with spermaurin improves IVF outcome in mice.

## Discussion

### Spermaurin as a new tool for sperm motility enhancement

Herein, we showed that a DRP of the venom of *S. m. palmatus*, and called herein spermaurin, is a potent compound able to significantly improve different sperm motility parameters in several mammalian species and improves IVF outcome in experiments in mouse. Spermaurin is effective on fresh testicular, epididymal and ejaculated sperm. It also improves frozen-thawed ejaculated sperm motility in human and bovine species. This compound represents a promising tool for use in ART. Spermaurin could thus be considered as a new lead compound to enhance sperm motility and the present work paves the way for the development of new peptides or peptidomimetic-based drugs with simpler structures and more potent activities.

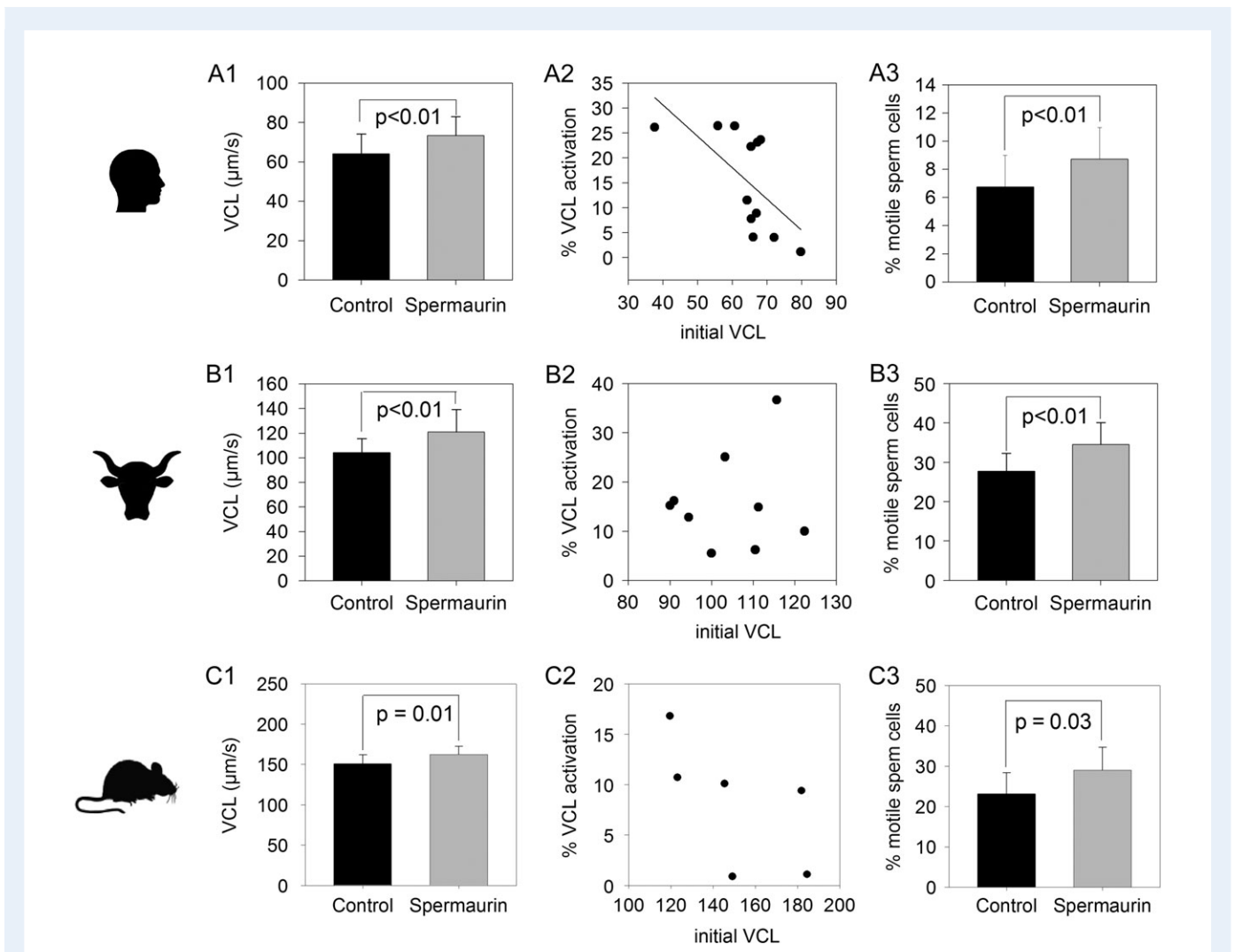
This work confirms the great interest in venom DRPs for 'biologics' development. Indeed, venoms have been successfully used for the development of marketed painkillers, and metabolic disease and cardio-vascular drugs (Harvey, 2014). For example, Prialt<sup>®</sup> (25 aa, six Cys), isolated from the venom of the cone snail *Conus magus*, selectively blocks N-type voltage-gated calcium channels and is the only approved non-opioid therapy for severe chronic pain (Miljanich, 2004). A peptide from viper venom, Integrilin<sup>®</sup> is used in the treatment and prevention of acute coronary syndrome. More than 20 other venom-derived reticulated peptides are under development by

pharmaceutical companies, illustrating the major interest in the venoms as a source of DRPs for drug discovery, a rapidly emerging scientific research area. Spermaurin would expand the use of venom DRPs to the field of assisted reproduction for the first time. Although assisted reproduction already benefits from 'biologics', such as gonadotrophins for ovarian stimulation, spermaurin is the first 'biologics' proposed for sperm enhancement. The potential use of spermaurin or its derivatives in ART should be facilitated for the following reasons: first, spermaurin would be added directly into the sperm incubation medium and the peptide could thus directly reach its target, avoiding any difficulty of biodistribution; second, the presence of disulfide bonds greatly improve its stability and the peptide could be mixed in a defined protease-free medium, avoiding lack of activity over time; third, the immunogenicity of DRPs, being small and stable miniproteins, is generally considered to be absent or weak, and last but not least, spermaurin belongs to the LaI-like peptide family, a family known for its absence of toxicity (Quintero-Hernandez et al., 2015).

Because spermaurin is a large peptide of 73 amino acids, and is unlikely to cross the plasma membrane freely, it likely activates a non-characterized pathway to increase sperm motility. Its action site is most probably a membrane receptor or an ion channel, contrary to already characterized compounds known to stimulate sperm motility such as pentoxifylline or LY294002. Previous compounds act indeed mainly on the kinase pathway ending with PKA or by inhibiting sperm phosphodiesterases, in order to increase cyclic-AMP concentration within the cell (Tardif et al., 2014). It will be important to characterize the receptor for spermaurin in order to identify the molecular pathway activated by the peptide as this putative receptor could constitute a new target for developing other treatments to improve sperm motility or to block motility as a new lead for male contraception.

### Differences in potency of different venom samples/preparations

The graphs obtained with the F8 fraction (Fig. 2) and the 7.8-purified fraction (Fig. 7), although similar, present specific features. First, they



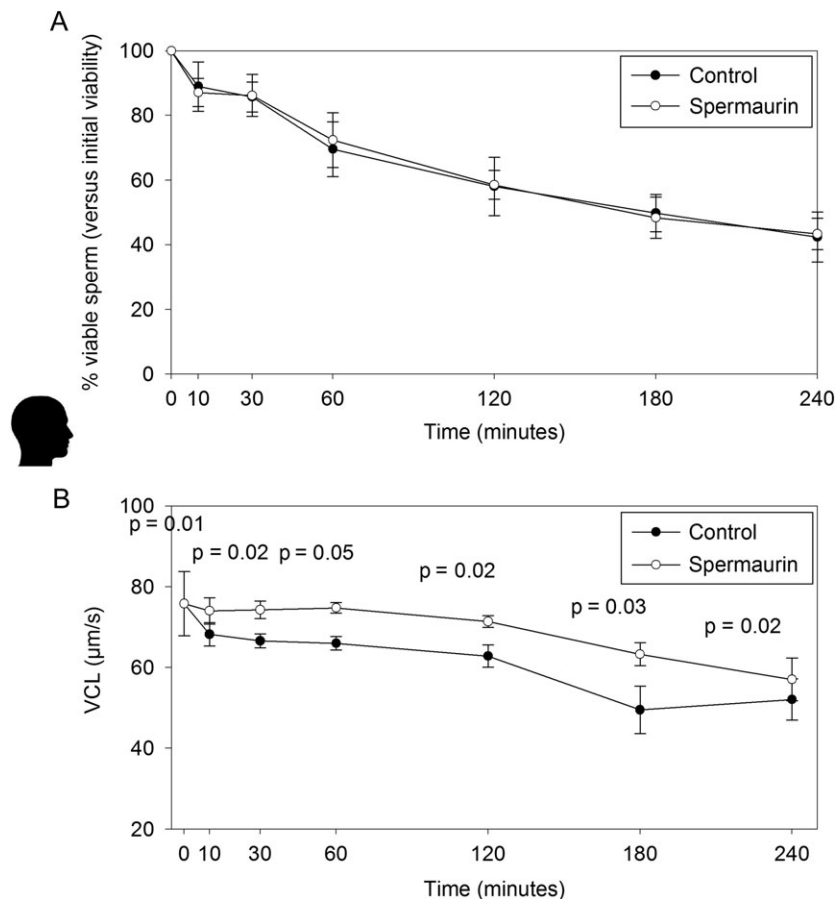
**Figure 10** The synthetic peptide obtained by native chemical ligation (NCL) enhances sperm motility parameters. (A1–3) Effect of synthetic spermaurin (270 µg/ml stock solution; dilution at 1/200 corresponding to a concentration of 170 nM) on human frozen-thawed sperm samples ( $n = 12$  replicates) on mean VCL (mean  $\pm$  SD) (A1), on VCL of each sample (A2) (data are expressed as the percentage of increase of the initial VCL measured on the corresponding non-treated sperm aliquot) and on the percentage of total motile sperm cells (VAP > 1 µm/s) (A3). (B1–3) Similar experiments and results for bovine frozen sperm samples ( $n = 9$  replicates). (C1–3) Similar experiments and results for fresh mouse epididymal sperm samples ( $n = 6$  replicates). For each replicate, between 100 and 150 sperm were assessed per condition. Statistical differences were assessed using paired Student's *t*-test. \**P*-value as indicated versus control.

present different levels of maximum VCL enhancement: with F8, the VCL of samples presenting the lowest motility values was increased by 35% whereas with the 7.8-purified fraction, the VCL of samples presenting the lowest motility values was increased by 90%. Second, F8 decreased the VCL of samples presenting the highest values (>80 µm/s) by 5%, whereas the 7.8-purified fraction did not modify the VCL of these samples. Third, the relation between the percentage increase and the initial value of VCL is no longer linear but exponential. Several reasons likely explain these differences. First, the expected concentration of spermaurin should be higher in the F8 fraction (dilution 1/20 of 12.5 mg) than in the 7.8-purified fraction (dilution 1/40 of 1.7 mg). We have shown that the potency of spermaurin is maximum around 200 nM and decreases at concentrations higher than 500 nM (Fig. 9) and the lower effect of the F8 fraction may thus be due to a higher

concentration of spermaurin in this fraction; It is worth noting that there is an uncertainty in the comparison of the concentrations of spermaurin in both fractions because the purifications were carried out using venoms from different suppliers and it is well known that the proportion of the different components of a specific venom may differ from batch to batch. Second, the F8 fraction contained several compounds as clearly shown by MS analyses (Fig. 5) and the difference observed between both fractions may also be due to the presence of inhibitory/toxic compounds in F8.

### First biological effect for a LaI-like toxin

Venoms from scorpions contain different well-characterized families of peptides. Most of them are neurotoxic peptides that target ion

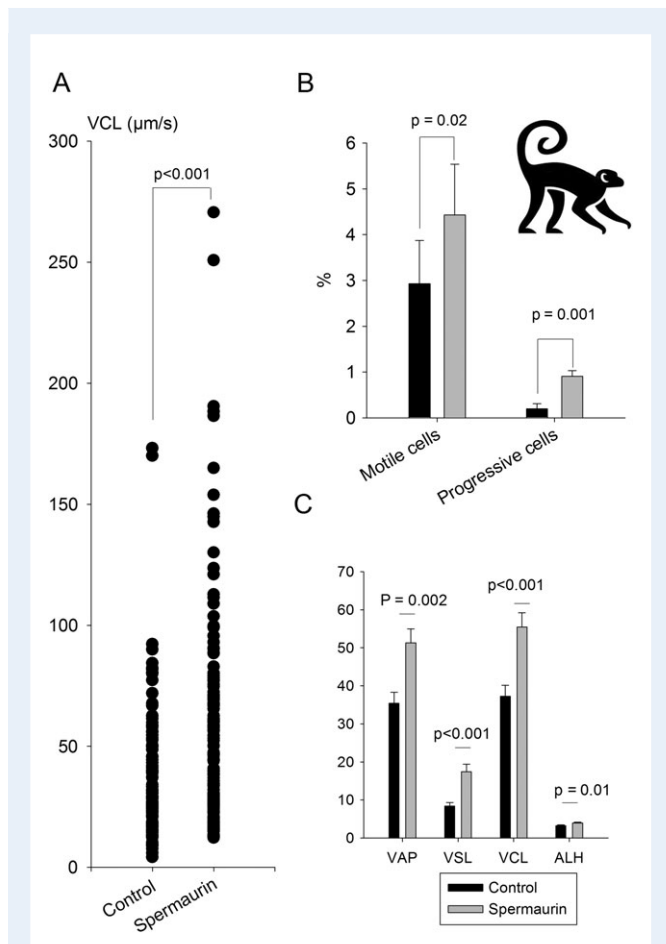


**Figure 11** Spermaurin does not modify human sperm viability and has a long-lasting effect. **(A)** Viabilities of ejaculated human sperm, assessed by a eosin–nigrosin test, continuously exposed to purified spermaurin (7.8-purified peptide prepared as indicated above) for up to 240 min (○) and control sperm (●) were measured at various times ( $n = 4$  replicates). Values are expressed as percentage of viability at  $t = 0$  min. **(B)** VCLs of ejaculated human sperm continuously exposed to purified spermaurin for up to 240 min (○) and control sperm (●) were measured at various times ( $n = 4$  replicates). For each replicate, between 100 and 150 sperm were assessed per condition. All data are mean  $\pm$  SEM.

channels and paralyze their prey. Nevertheless, there are also other families of peptide, such as antimicrobial peptides and peptides with unknown functions. Among these peptides with unknown function, there is a family of DRPs, named the LaI-like family, which was first isolated from the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* (*Liochelidae* family) and originally called LaI peptide (Miyashita et al., 2007). LaI was presented as the most abundant component of the venom of *L. australasiae* and this suggests that this peptide may have an important biological function. Moreover, these peptides are found in many toxic and non-toxic families of scorpions. LaI-like peptides were found in different species belonging to the *Scorpionidae* family, such as *Opisthacanthus cayaporum* (Silva et al., 2009), *Pandinus cavimanus* (Diego-Garcia et al., 2012) and *S. m. palmatus* (Abdel-Rahman et al., 2013), the *Euscorpidae* family such as *Scorpiops margerisonae* (Ma et al., 2012), the *Urodacidae* family such as *Urodacus yashenkoi* (Luna-Ramirez et al., 2013), the *Buthidae* family such as *Lychas mucronatus* and *Isometrus maculatus* (Ma et al., 2012) and the *Vaejovidae* family of

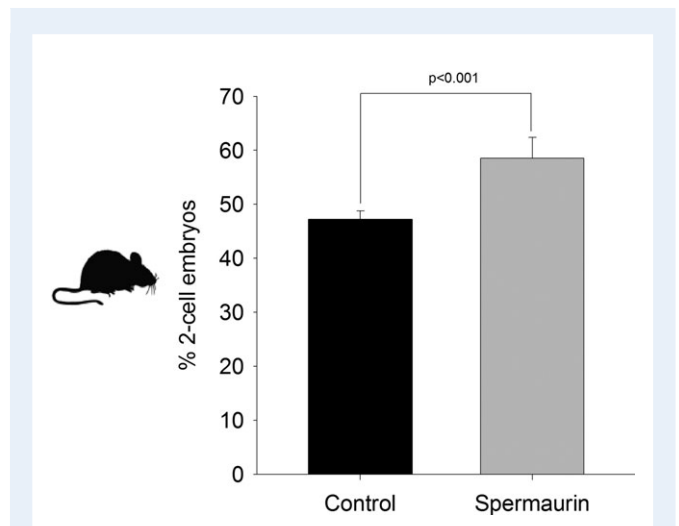
*Vaejovis* spp. (Quintero-Hernandez et al., 2015). These peptides are thus found in 6 of 17 families of scorpions so far. Interestingly, it is worth noting that peptides homologous to LaI were also found in ticks and insects (Sheldon et al., 2007; Ribeiro et al., 2011), confirming that they may have an important biological function. However, the function of this family of peptides remains unknown so far. Herein, we have shown for the first time that the LaI-like toxin of *S. m. palmatus* is able to modify sperm motility and this result strongly suggests the presence of a specific receptor for this peptide on the sperm plasma membrane. The characterization of this receptor will likely provide clues to identify the molecular targets of this family of scorpion peptides and may allow characterization of their biological function.

In conclusion, since 2007, we have screened natural compound libraries for substances controlling sperm motility (Escoffier et al., 2010, 2011) and this report presents spermaurin, a unique peptide that significantly improves sperm motility and fertilization. It is worth noting that spermaurin improves the motility of both fresh and frozen-thawed



**Figure 12** Purified spermaurin stimulates fresh non-human primate testicular sperm. **(A)** Vertical point plots of VCL values for control and spermaurin (7.8-purified fraction, dilution 1/40) treated testicular sperm ( $n = 3$  replicates). Sperm treated with spermaurin have a higher VCL than control ( $P < 0.001$ ). **(B)** Mean  $\pm$  SEM percentage of motile (VAP  $> 1$ ) and progressive (VAP  $> 25$  and Straightness  $> 80\%$ ) for control and spermaurin treated testicular sperm ( $n = 3$  samples). **(C)** Mean values  $\pm$  SEM for the four main parameters. For each replicate,  $>50$  sperm were assessed per condition. Statistical differences were assessed using paired Student's  $t$ -test. \* $P$ -value as indicated versus control.

sperm collected in epididymis, testis or ejaculate. Moreover, it is active on sperm from different mammalian species, suggesting that it targets a major and conserved pathway controlling sperm motility. However, spermaurin is a complex peptide of 73 amino acids containing 4 disulfide bridges and likely represents in the process of drug discovery a lead compound. Similar to what was done with 'Bradykinin Potentiating Factor', a peptide from the venom of *Bothrops jararaca*, which allowed the design of Captopril<sup>®</sup>, a powerful antihypertensive drug, further studies need to be performed to drive spermaurin and its analogs toward use as a medical compound. These studies should include the identification of the molecular pathways activated by spermaurin, the characterization of its 3D structure and the synthesis of lower molecular weight analogs with improved potency.



**Figure 13** Purified spermaurin increases IVF outcome in mouse. Sperm and oocytes were mixed and incubated in M16 medium with or without purified spermaurin (for 4 h; dilution 1/40). Mean values  $\pm$  SD of the percentages of 2-cell embryos were measured 24 h later. The value  $n$  represents the number of males tested and for each male between 12 and 33, oocytes were fertilized in each group. Percentages of 2-cell embryos were calculated for each male and correspond to the ratio of the number of 2-cell embryos to the number of collected oocytes. Statistical differences were assessed using paired Student's  $t$ -test. \* $P < 0.001$  versus control.

## Acknowledgements

We thank Sevcan Yavuz, Lucie Jomain and Deborah Reynaud for help with CASA analysis. We thank also Julien Pêcher and Smartox Biootechnology (<https://www.smartox-biotech.com/>) for help in size exclusion chromatography. We thank also Karim Arafah for help in MALDI-MS analysis, Guillaume Jousset for help in folding experiments and Philippe Marceau for assistance with solid phase peptide synthesis. We also thank Dr Cyril Colas, Dr Guillaume Gabant and the CBM and FR2708 federation MS platforms for performing MS analyses of synthetic spermaurin and precursors.

## Authors' roles

G.M., E.S., P.F.R., V.A., P.B. and C.A. analyzed the data and wrote the manuscript; G.M., J.P.H. and J.E. performed CASA experiments. T.M.A. and MDW performed size exclusion chromatography, S.H. and J.B. provided human samples, C.M.F. provided NHP samples, S.V. and P.B. performed HPLC and MS for peptide identification, V.A. synthesized the peptide. R.A. performed IVF experiments, C.A. designed the study, had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and its accuracy. All authors contributed to the report.

## Funding

French National Funding Agency 'LAB COM-14 LAB7 0004 01-LIPAV' (to C.A. and E.S.); ANR-15-CE07-022 EasyMiniProt grant (to V.A.).

## Conflict of interest

Dr Arnoult reports grants from IMV Technologies during the conduct of the study. In addition Drs Arnoult, Martinez, Ray and Schmitt have a patent EPI 6305642.7 pending containing some of the information presented in this manuscript.

## References

- Abdel-Rahman MA, Quintero-Hernandez V, Possani LD. Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae). *Toxicon* 2013;**74**:193–207.
- Abi Nahed R, Escoffier J, Revel C, Jeamment L, Payre C, Ray PF, Hennebicq S, Lambeau G, Arnoult C. The effect of group X secreted phospholipase A2 on fertilization outcome is specific and not mimicked by other secreted phospholipases A2 or progesterone. *Biochimie* 2014;**99**:88–95.
- Aitken RJ, Mattei A, Irvine S. Paradoxical stimulation of human sperm motility by 2-deoxyadenosine. *J Reprod Fertil* 1986;**78**:515–527.
- Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, Mendeluk GR, Pugliese MN, Sardi Segovia LM, Repetto HE, Blanco AM. Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch Androl* 2003;**49**:343–349.
- Da Silva P, Strzepa A, Jouvencal L, Rahioui I, Gressent F, Delmas AF. A folded and functional synthetic PA1b: an interlocked entomotoxic mini-protein. *Biopolymers* 2009;**92**:436–444.
- Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, Van EP, Priest K, Scott H, Haan EA, Chan A. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2012;**366**:1803–1813.
- De TE, Aparicio NJ, Turner D, Schwarzsstein L. Effect of two phosphodiesterase inhibitors, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate, and a beta-blocking agent on human sperm motility. *Fertil Steril* 1978;**29**:328–331.
- Derache C, Meudal H, Aucagne V, Mark KJ, Cadene M, Delmas AF, Lalmanach AC, Landon C. Initial insights into structure-activity relationships of avian defensins. *J Biol Chem* 2012;**287**:7746–7755.
- Diego-Garcia E, Peigneur S, Clynen E, Marien T, Czech L, Schoofs L, Tytgat J. Molecular diversity of the telson and venom components from *Pandinus cavimanus* (Scorpionidae Latreille 1802): transcriptome, venomomics and function. *Proteomics* 2012;**12**:313–328.
- Escoffier J, Couvet M, de Pomyers H, Ray PF, Sève M, Lambeau G, De Waard M, Arnoult C. Snake venoms as a source of compounds modulating sperm physiology: secreted phospholipases A2 from *Oxyuranus scutellatus scutellatus* impact sperm motility, acrosome reaction and in vitro fertilization in mice. *Biochimie* 2010;**92**:826–836.
- Escoffier J, Pierre V, Jemel I, Munch L, Boudhraa Z, Ray PF, De Waard M, Lambeau G, Arnoult C. Group X secreted phospholipase A2 specifically decreases sperm motility in mice. *J Cell Physiol* 2011;**226**:2601–2609.
- Essig M, Schoenfeld C, Amelar RD, Dubin L, Weiss G. Stimulation of human sperm motility by relaxin. *Fertil Steril* 1982;**38**:339–343.
- Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today* 2015;**20**:122–128.
- Gongora-Benitez M, Tulla-Puche J, Albericio F. Multifaceted roles of disulfide bonds. Peptides as therapeutics. *Chem Rev* 2014;**114**:901–926.
- Hammit DG, Bedia E, Rogers PR, Syrop CH, Donovan JF, Williamson RA. Comparison of motility stimulants for cryopreserved human semen. *Fertil Steril* 1989;**52**:495–502.
- Harvey AL. Toxins and drug discovery. *Toxicon* 2014;**92**:193–200.
- Kovacic B, Vlasisavljevic V, Reljic M. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *J Androl* 2006;**27**:45–52.
- Lanzafame F, Chapman MG, Guglielmino A, Gearon CM, Forman RG. Pharmacological stimulation of sperm motility. *Hum Reprod* 1994;**9**:192–199.
- Lelievre D, Terrier VP, Delmas AF, Aucagne V. Native chemical ligation strategy to overcome side reactions during Fmoc-based synthesis of C-terminal cysteine-containing peptides. *Org Lett* 2016;**18**:920–923.
- Luconi M, Carloni V, Marra F, Ferruzzi P, Forti G, Baldi E. Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A. *J Cell Sci* 2004;**117**:1235–1246.
- Luconi M, Marra F, Gandini L, Filimberti E, Lenzi A, Forti G, Baldi E. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition enhances human sperm motility. *Hum Reprod* 2001;**16**:1931–1937.
- Luconi M, Porazzi I, Ferruzzi P, Marchiani S, Forti G, Baldi E. Tyrosine phosphorylation of the a kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylate cyclase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate. *Biol Reprod* 2005;**72**:22–32.
- Luna-Ramirez K, Quintero-Hernandez V, Vargas-Jaimes L, Batista CV, Winkel KD, Possani LD. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenko*: molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon* 2013;**63**:44–54.
- Ma Y, He Y, Zhao R, Wu Y, Li W, Cao Z. Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *J Proteomics* 2012;**75**:1563–1576.
- Mende F, Seitz O. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-based solid-phase synthesis of peptide alpha-thioesters. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011;**50**:1232–1240.
- Miljanich GP. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem* 2004;**11**:3029–3040.
- Miyashita M, Otsuki J, Hanai Y, Nakagawa Y, Miyagawa H. Characterization of peptide components in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* (Hemiscorpiidae). *Toxicon* 2007;**50**:428–437.
- Nagao J, Miyashita M, Nakagawa Y, Miyagawa H. Chemical synthesis of LaI isolated from the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* and determination of its disulfide bonding pattern. *J Pept Sci* 2015;**21**:636–643.
- Nosrati R, Vollmer M, Eamer L, San Gabriel MC, Zeidan K, Zini A, Sinton D. Rapid selection of sperm with high DNA integrity. *Lab Chip* 2014;**14**:1142–1150.
- Publicover SJ, Barratt CL. Sperm motility: things are moving in the lab! *Mol Hum Reprod* 2011;**17**:453–456.
- Quintero-Hernandez V, Ramirez-Carreto S, Romero-Gutierrez MT, Valdez-Velazquez LL, Becerril B, Possani LD, Ortiz E. Transcriptome analysis of scorpion species belonging to the *Vaejovis* genus. *PLoS One* 2015;**10**:e0117188.
- Ravaux B, Garroum N, Perez E, Willaime H, Gourier C. A specific flagellum beating mode for inducing fusion in mammalian fertilization and kinetics of sperm internalization. *Sci Rep* 2016;**6**:31886. 10.1038/srep31886.
- Ribeiro JM, Anderson JM, Manoukis NC, Meng Z, Francischetti IM. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics* 2011;**12**:136.
- Roudebush WE. Role of platelet-activating factor in reproduction: sperm function. *Asian J Androl* 2001;**3**:81–85.
- Schill WB. Increased fructolysis of kallikrein-stimulated human spermatozoa. *Andrologia* 1975;**7**:105–107.
- Sheldon TJ, Miguel-Aliaga I, Gould AP, Taylor WR, Conklin D. A novel family of single VWC-domain proteins in invertebrates. *FEBS Lett* 2007;**581**:5268–5274.
- Silva EC, Camargos TS, Maranhao AQ, Silva-Pereira I, Silva LP, Possani LD, Schwartz EF. Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus caya-porum*. *Toxicon* 2009;**54**:252–261.

- Somanath PR, Jack SL, Vijayaraghavan S. Changes in sperm glycogen synthase kinase-3 serine phosphorylation and activity accompany motility initiation and stimulation. *J Androl* 2004;**25**:605–617.
- Tardif S, Madamidola OA, Brown SG, Frame L, Lefievre L, Wyatt PG, Barratt CL, Martins Da Silva SJ. Clinically relevant enhancement of human sperm motility using compounds with reported phosphodiesterase inhibitor activity. *Hum Reprod* 2014;**29**:2123–2135.
- Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S. Effect of pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 1998;**15**:90–92.
- Terrier VP, Adihou H, Arnould M, Delmas AF, Aucagne V. A straightforward method for automated Fmoc-based synthesis of bio-inspired peptide crypto-thioesters. *Chem Sci* 2016;**7**:339–345.
- Terriou P, Hans E, Cortvrindt R, Avon C, Charles O, Salzman J, Lazdunski P, Giorgetti C. Papaverine as a replacement for pentoxifylline to select thawed testicular or epididymal spermatozoa before ICSI. *Gynecol Obstet Fertil* 2015;**43**:786–790.
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod* 1991;**6**:811–816.
- Tournaye H, Van der Linden M, Van den Abbeel E, Devroey P, Van SA. The effect of pentoxifylline on mouse in-vitro fertilization and early embryonic development. *Hum Reprod* 1994;**9**:1903–1908.
- Vetter I, Davis JL, Rash LD, Anangi R, Mobli M, Alewood PF, Lewis RJ, King GF. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino Acids* 2011;**40**:15–28.
- Wambergue C, Zouari R, Fourati Ben MS, Martinez G, Devillard F, Hennebicq S, Satre V, Brouillet S, Halouani L, Marrakchi O *et al*. Patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella due to DNAH1 mutations have a good prognosis following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2016;**31**:1164–1172.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edn. Switzerland. 2010. ISBN: 978 92 4 154778 9.



# Biotechnologie de la reproduction chez le bovin

## *Découverte et étude de nouvelles biomolécules d'intérêt*

*Hograindleur Jean-Pascal*

*Le 22 Juin 2018*

### RÉSUMÉ

Toute perturbation de la mobilité des spermatozoïdes a un fort impact sur la fécondation et peut conduire à une sous-fertilité ou infertilité. Des efforts importants ont donc été faits pour identifier des composés pharmacologiques susceptibles de moduler la mobilité des spermatozoïdes. Les composés activateurs sont particulièrement utiles en azoospermie pour améliorer l'extraction des spermatozoïdes testiculaires et dans le domaine de la cryoconservation car la mobilité des spermatozoïdes congelés-dégelés est réduite. L'étude présentée dans ce manuscrit s'attache plus particulièrement à l'identification d'un composé original, à partir d'une bibliothèque de venins, capable d'améliorer la mobilité des spermatozoïdes de mammifères, y compris chez l'homme. Nous avons d'abord identifié dans le venin d'un scorpion *S. m. palmatus* un peptide de 73 acides aminés et riche en disulfure capable d'activer puissamment la mobilité des spermatozoïdes. Nous avons ensuite purifié et caractérisé ce peptide responsable par chromatographie liquide, spectrométrie de masse et synthèse peptidique. Enfin, la puissance et la toxicité des versions purifiée et synthétique du composé identifié sur la motilité des spermatozoïdes ont été évaluées à l'aide de différents tests *in vitro* chez différentes espèces de mammifères. Nous avons observé que la puissance du peptide était plus élevée sur les spermatozoïdes éjaculés frais avec une faible motilité, obtenant une augmentation de 100% de la vitesse curviligne dans les spermatozoïdes peu performants. Nous avons également démontré que le peptide est efficace sur l'épididyme frais des bovins et des souris, l'éjaculation congelée des bovins et les spermatozoïdes frais des testicules de primates non humains.

Ce manuscrit évoque également brièvement les travaux réalisés durant ce diplôme sur un composé inhibant la mobilité dont l'utilisation permettrait d'élargir la fenêtre de fécondation optimale en insémination artificielle en retardant le phénomène de capacitation du spermatozoïde.

**MOTS-CLÉS :** Mobilité spermatique, venin de scorpion, infertilité, fécondation, synthèse peptidique, insémination artificielle.