

Etude *in vivo* par endoscopie à fluorescence du transport et de la survie des spermatozoïdes de bélier dans le tractus génital femelle

DRUART X. (1), COGNIE J. (1), BARIL G. (1), CLEMENT F. (2), DACHEUX J.L. (1), GATTI J.L. (1)

(1) UMR 6175 INRA - CNRS-université de Tours-Haras nationaux - Nouzilly - France

(2) INRIA - Paris - France

RESUME - La fertilité de la semence ovine après insémination cervicale diminue fortement après vingt-quatre heures de conservation à 15°C, ce qui constitue un frein important à la diffusion de la génétique ovine au-delà des bassins de production. Cette chute de fertilité a lieu tandis que la qualité apparente de la semence, estimée selon les paramètres actuels de qualité *in vitro*, est maintenue. Cette baisse de fertilité pourrait être expliquée par une diminution de l'aptitude des spermatozoïdes à transiter dans les voies génitales femelles. Pour valider cette hypothèse, nous avons développé une méthode originale de suivi des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles à l'aide d'un système d'imagerie par endoscopie à fluorescence. Grâce à cette méthode, nous avons pu montrer que la conservation de la semence de bélier pendant vingt-quatre heures altère l'aptitude des spermatozoïdes à atteindre le site de fécondation. En effet, la conservation de la semence entraîne une diminution de la traversée par les spermatozoïdes du col de l'utérus ainsi que de leur transit jusqu'à l'oviducte. De nouvelles méthodes de conservation de la semence permettant le maintien de cette activité biologique sont donc à mettre au point.

***In vivo* imaging of sperm transport and survival in the female genital tract using fiber confocal fluorescence microscopy**

DRUART X (1), COGNIE J.(1), BARIL G.(1) , CLEMENT F.(2), DACHEUX J.L.(1), GATTI J.L. (1)

(1) UMR 6175 INRA - CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux - Nouzilly - France

SUMMARY - Fertility of ram sperm is reduced after 24 h of storage at 15°C in milk diluent even though the *in vitro* properties, such as viability and motility, are well preserved. This might be explained by a decrease of sperm transport and survival of stored ram sperm in the female genital tract. We studied the influence of *in vitro* storage of ram sperm on *in vivo* transport in the female genital tract of the ewe using fiber confocal fluorescence microscopy. In the 5-h interval after intrauterine insemination, a sperm gradient was observed in the uterus *in vivo* using fiber confocal fluorescence microscopy. *In vitro* storage of ram sperm at 15°C for 24 h reduced sperm migration to the uterotubal junction *in vivo*. When cervical inseminations were performed, the crossing of the cervix was also reduced after semen preservation. Therefore, methods designed to increase the fertility of ram semen after preservation need to consider sperm transport and survival in the female genital tract.

INTRODUCTION

Au cours des vingt dernières années, l'insémination artificielle chez les ovins a connu un développement important dans plusieurs bassins de production ovine français. Ce développement est en partie lié à de bons résultats techniques après insémination par voie cervicale avec de la semence fraîche. La semence utilisée est préparée par dilution des éjaculats dans un milieu simple et peu coûteux à base de lait écrémé (Baril *et al.*, 1993). Cependant le délai d'utilisation de la semence ne peut dépasser douze heures en raison d'une forte diminution de son pouvoir fécondant passé ce délai. Ceci entraîne des fortes contraintes pour les centres d'insémination artificielle (CIA). Ces contraintes sont d'ordre organisationnel puisque les CIA doivent collecter les béliers très tôt le matin pour assurer la diffusion de la semence dans la journée. Un allongement de la durée de conservation permettrait de nouveaux rythmes de travail. Les contraintes sont également d'ordre technique et financier car la diffusion du progrès génétique est limitée. Ainsi les CIA ne peuvent diffuser correctement leur génétique sous forme de semence fraîche au-delà de leur bassin d'origine. Le recours à la semence congelée est par ailleurs difficile dans cette espèce : la très faible fertilité obtenue après insémination cervicale avec de la semence congelée (10 à 20 % de réussite) nécessite de réaliser des inséminations intra-utérines par laparoscopie. Les résultats sont alors comparables à ceux obtenus après insémination cervicale avec de la semence fraîche mais la méthode est plus longue, plus coûteuse et nécessite des compétences techniques (Maxwell *et al.*, 1993a). Une conservation de la semence fraîche d'au moins vingt-quatre heures permettrait de lever certaines contraintes techniques et d'assurer de nouveaux débouchés.

Les raisons de la diminution de la fertilité après conservation de la semence fraîche à 15°C sont mal connues. En effet, la qualité de la semence, estimée par les paramètres microscopiques comme la mobilité des spermatozoïdes, ne semble pas fortement modifiée par la conservation. En dehors de la question scientifique posée par cette observation, ce contraste entre qualité de la semence *in vitro* et fertilité *in vivo* est un frein à la mise au point de nouvelles méthodes de conservation. Toutefois, l'hypothèse d'une altération de la capacité des spermatozoïdes à traverser le col de l'utérus peut être avancée. En effet, de manière similaire à la semence congelée, la fertilité de la semence conservée peut être en partie restaurée par insémination intra-utérine (Maxwell *et al.*, 1993b).

L'objectif de cette étude est de vérifier cette hypothèse par la quantification du transit des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles après conservation *in vitro*. Une méthode originale de visualisation et de quantification des spermatozoïdes *in utero* chez l'animal vivant est présentée.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. COLLECTE, DILUTION ET COLORATION DE LA SEMENCE

La semence de trois béliers de race Lacaune est collectée à l'aide d'un vagin artificiel et diluée à une concentration finale de $1,10^6$ spermatozoïdes par ml dans un milieu à base de lait écrémé reconstitué (11,1 g de poudre de lait pour 100 ml d'eau déminéralisée) et supplémenté en antibiotiques (gentamycine à $50 \mu\text{g} / \text{ml}$). La semence diluée est divisée en deux parties. La première moitié est utilisée immédiatement (J0) et la deuxième moitié est conservée à 15°C pendant vingt-quatre heures (J1). Le protocole de coloration est ensuite identique pour les deux traitements J0 et J1.

Deux fluorochromes sont utilisés conjointement pour la coloration des spermatozoïdes : l'octadecyl rhodamine B qui colore la membrane plasmique de tous les spermatozoïdes en orange, et le *Mito Tracker Green FM* qui colore en vert les mitochondries, donc la pièce intermédiaire, des spermatozoïdes vivants. Environ quinze minutes avant l'IA, ces fluorochromes sont ajoutés à la semence diluée. Celle-ci est incubée pendant dix minutes à 37°C.

1.2. INSEMINATION CERVICALE ET INTRA-UTERINE

L'oestrus est induit chez vingt-trois brebis de race Ile de France par un traitement progestatif de treize jours (éponges vaginales de 30 mg d'acétate de fluorogestone) suivi d'une injection de PMSG (500 unités) au moment du retrait de l'éponge. L'insémination avec la semence diluée et colorée (J0 et J1) est réalisée cinquante-cinq heures après le retrait de l'éponge. Deux expériences successives ont été réalisées. Au cours d'une première expérience, la semence a été déposée par voie intra-utérine. Un premier lot de douze brebis a été utilisé. Six brebis ont été inséminées le jour de la collecte de la semence (J0) et six autres brebis ont été inséminées le lendemain avec la semence conservée (J1). Au moment de l'insémination, la semence initialement diluée à 1.10^9 spermatozoïdes par ml est rediluée dans le milieu à base de lait pour obtenir une concentration finale de 6.10^8 spermatozoïdes / ml, et conditionnée dans une paillette de 0,25 ml. La moitié d'une paillette, soit 75.10^6 spermatozoïdes, est ensuite inséminée dans la base de chaque corne utérine, soit au total 150.10^6 spermatozoïdes par brebis. Au cours de la deuxième expérience, la semence a été déposée à l'entrée du col selon la procédure classique d'insémination cervicale. Un deuxième lot de douze brebis indépendant du premier lot a été utilisé. Six brebis ont été inséminées le jour de la collecte de la semence (J0) et six autres brebis ont été inséminées le lendemain avec la semence conservée (J1). Deux paillettes de semence à 1.10^9 spermatozoïdes / ml sont utilisées par brebis, soit un total de 500.10^6 spermatozoïdes par brebis.

1.3. QUALITE DE LA SEMENCE

La mobilité des spermatozoïdes est mesurée avant et après coloration à l'aide d'un système automatisé d'analyse de la mobilité (Hamilton Thorne).

1.4. ANALYSES IN UTERO

La visualisation des spermatozoïdes *in utero* a été réalisée à l'aide d'un endoscope à fluorescence (FCM 1000, Leica), système d'imagerie *in vivo* initialement dédié à l'imagerie sur petits animaux de laboratoire. Le système comprend une source d'excitation à 488 nm, une fibre optique et un logiciel d'acquisition et de traitement des images vidéo en temps réel. Parmi la gamme de fibres optiques disponibles et présentant des diamètres et des résolutions optiques différentes, la fibre de 1,5 mm a été retenue car son diamètre est compatible avec les dimensions de la lumière de l'utérus et de l'oviducte et sa résolution latérale de 3,3 μm permet de visualiser correctement les spermatozoïdes. Le champ d'acquisition de 400 x 600 μm permet de visualiser les trajectoires sur un nombre de positions successives suffisant pour une analyse qualitative de la mobilité (vitesse de déplacement et forme des trajectoires). Les images sont acquises à une fréquence fixe de douze images par seconde. La quantification du transport des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles est réalisée cinq heures après insémination. Les brebis sont placées sous anesthésie générale et le tractus génital (cornes utérines, oviductes et ovaires) est extériorisé par laparotomie. Afin d'insérer la fibre optique dans la lumière de l'utérus et de l'oviducte, un trou de 2 mm est réalisé à l'aide d'un bistouri électrique à différents niveaux : dans le corps utérin près du cervix, dans les régions basses et hautes de la corne utérine et, au niveau de la jonction utéro-tubaire. A partir de ces points d'entrée, l'acquisition des images est réalisée aux niveaux suivants : cervix, bas, milieu et haut de corne, jonction utéro-tubaire et oviducte. La procédure d'acquisition est standardisée et des séquences vidéo de deux minutes sont enregistrées à chaque niveau du tractus.

1.5. ANALYSE DES DONNEES.

Au cours de la première expérience, l'insémination est réalisée par voie intra-utérine au niveau du bas de chacune des deux cornes utérines des onze brebis (six brebis à J0 et cinq brebis à J1). Pour chaque région analysée par endoscopie à fluorescence (bas, milieu et haut de corne, JUT, oviducte), 5 à 10 images (champs) sont choisies dans la séquence vidéo de deux minutes, soit en moyenne seize champs par brebis. L'effet de la durée de conservation est estimé sur un total de quatre-vingts champs par région.

Le nombre de spermatozoïdes présent sur chaque champ est compté manuellement. Les effets de la durée de conservation sur le nombre de spermatozoïdes par champ sont analysés à l'aide d'un modèle linéaire généralisé (procédure GENMOD, SAS) avec une loi de distribution de Poisson pour la variable « nombre de spermatozoïdes par

champ ». Le modèle inclut les facteurs « durée de conservation » (J0 et J1), « région du tractus » (cinq modalités), et les interactions « durée »/ « région ». La variable « brebis » est incluse comme variable répétée (modèle GEE : *generalized estimating equations*).

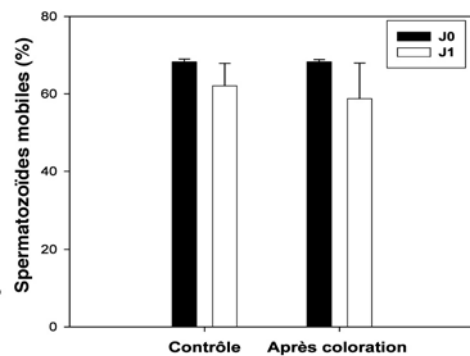
Au cours de la deuxième expérience, l'insémination est réalisée par voie cervicale chez douze autres brebis (six brebis par durée de conservation). Les spermatozoïdes sont comptabilisés dans une seule région, à la sortie du cervix côté utérin. L'effet de la durée de conservation est analysé avec un modèle GENMOD similaire à celui décrit pour l'IA intra-utérine sans le facteur « région ».

2. RESULTATS

Dans cette étude, la qualité de la semence, estimée par le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, n'est pas significativement diminuée par la conservation ($p < 0,05$; figure 1). Le protocole de coloration des spermatozoïdes à l'aide de fluorochromes, nécessaire à leur visualisation dans les voies génitales femelles, ne modifie pas non plus la mobilité ($p < 0,05$).

Figure 1 : mobilité des spermatozoïdes de bélier après conservation pendant 24 h à 15°C.

Moyenne +/- écart-type de la moyenne.



Dans un délai de cinq heures après insémination intra-utérine au niveau de la base de la corne, un gradient croissant de la concentration en spermatozoïdes est observé depuis la base de la corne jusqu'à la jonction utéro-tubaire (figure 2). Ce gradient est très marqué pour la semence à J0 mais nettement diminué pour la semence à J1. Quelle que soit la durée de conservation de la semence, la jonction utéro-tubaire constitue une barrière fonctionnelle car la concentration en spermatozoïdes dans l'oviducte est très inférieure à la concentration utérine. La conservation de la semence induit une forte diminution du transit des spermatozoïdes depuis la base de la corne jusqu'à l'oviducte.

Lorsque l'insémination est réalisée par voie cervicale, la conservation de la semence conduit à une diminution du passage des spermatozoïdes au travers du col de l'utérus (figure 3). En effet, le nombre de spermatozoïdes par champ retrouvé dans le corps de l'utérus, à proximité du cervix, est significativement inférieur à J1 par rapport à J0.

Figure 2 : effet de la conservation sur le transport des spermatozoïdes de bélier dans le tractus génital femelle après insémination intra-utérine.

* différence significative entre J0 et J1 dans chaque région ($p < 0,05$).

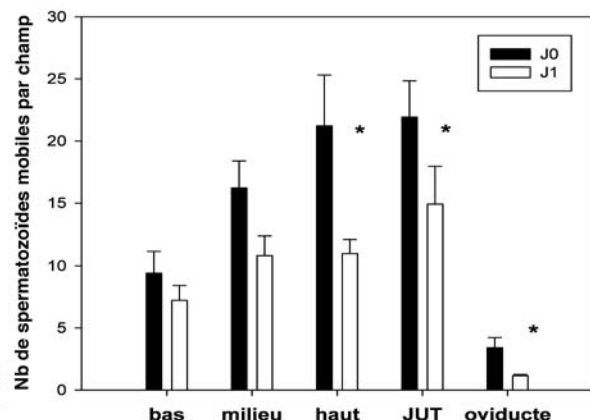
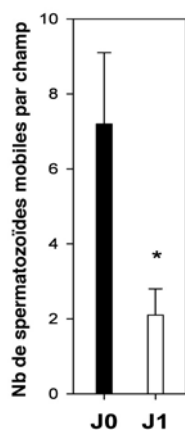


Figure 3 : effet de la conservation sur le passage des spermatozoïdes de bélier dans l'utérus après insémination cervicale.

* différence significative entre J0 et J1 ($p < 0,05$). n = six brebis par traitement.



CONCLUSION

Dans cette étude, nous confirmons l'hypothèse d'une altération de la capacité des spermatozoïdes à transiter dans les voies génitales femelles après vingt-quatre heures de conservation *in vitro* à 15°C. Cette modification se traduit à la fois par une diminution de leur aptitude à traverser le col de l'utérus et par un transit réduit jusqu'à l'oviducte. Nous observons également que la mobilité des spermatozoïdes est réduite *in utero* après conservation. Ceci est d'autant plus important que la mobilité *in vitro* est peu modifiée. Il apparaît donc que l'interaction des spermatozoïdes avec le tractus femelle est un élément important qui doit être pris en compte dans l'évaluation de leur pouvoir fécondant. La quantification du transit des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles par la méthode présentée dans cette étude pourrait permettre une meilleure estimation de la fertilité de la semence conservée en amont d'essais terrains.

Baril G., Chemineau P., Cognie Y., Guérin Y., Leboeuf B., Orgeur P., Vallet J-C., 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. FAO, Rome.
 Maxwell WM., Salamon S., 1993. *Reprod Fertil Dev*; 5: 613-638
 Maxwell WM., Evans G., Rhodes S-L., Hillard M-A., Bindon B-M., 1993. *Reprod Fertil Dev*; 5: 57-63