Rev. Fr. Histotechnol., 2008, **21**, n° 1, p. 39 à 44

VISUALISATION DES SPERMATOZOÏDES DE BELIER DANS LE TRACTUS GENITAL DE BREBIS PAR MICROSCOPIE CONFOCALE FIBREE

*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*

**Xavier.Druart@tours.inra.fr*

INTRODUCTION

Chez les mammifères domestiques, la réussite de la fécondation, après accouplement ou insémination artificielle (IA) dépend de nombreux facteurs. Parmi ceux-ci, sont reconnus comme des éléments importants, le transit des spermatozoïdes dans le tractus femelle, ainsi que leur survie durant la période pré-ovulatoire. Ceci est particulièrement vrai lorsque la semence est soumise à des processus de conservation, comme la congélation ou la conservation liquide pour des durées de un à plusieurs jours. Par exemple, chez les ovins, la fertilité de la semence congelée est équivalente à la fertilité après saillie naturelle, lorsque la semence est déposée directement dans l'utérus, mais fortement réduite après un dépôt dans le vagin, en amont du col de l'utérus [1]. Ceci suggère que le passage du col de l'utérus par les spermatozoïdes est altéré par le procédé de conservation. Afin d'étudier l'impact de la conservation sur l'aptitude des spermatozoïdes à franchir le col de l'utérus et à transiter dans le tractus femelle, la mise au point d'une méthode de quantification des spermatozoïdes *in vivo* était nécessaire. En effet, jusqu'à présent, les études quantitatives ont été réalisées *ex vivo* par histologie, microscopie électronique ou comptage des spermatozoïdes après lavage du tractus femelle obtenu après abattage des animaux [2]. Chez certaines espèces, comme la souris et le hamster, les spermatozoïdes peuvent être directement observés ex vivo dans l'oviducte par transparence [3]. Les rares études réalisées *in vivo* sont basées sur la scintigraphie du tractus femelle qui permet, après insémination avec des spermatozoïdes marqués avec un traceur radioactif, de visualiser les régions du tractus contenant des spermatozoïdes [4].

L'objectif de cette étude, est donc de concevoir une méthode de visualisation *in vivo* des spermatozoïdes individuels dans le tractus génital femelle, basée sur l'utilisation de la microscopie confocale fibrée.

MATERIELS ET METHODES

La semence de 3 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 µg/ml). Deux fluorochromes sont utilisés conjointement pour la coloration des spermatozoïdes : l'octadecyl rhodamine B (R18) 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 15 minutes avant l'IA, ces fluorochromes sont ajoutés à la semence diluée. Celle-ci est incubée pendant 10 minutes à 37 °C. L'oestrus est induit chez 12 brebis de race Ile de France par un traitement progestatif de 13 jours (éponges vaginales de 30 mg d'acétate de fluorogestone) suivi d'une injection de 500 unités de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) au moment du retrait de l'éponge. L'insémination, avec la semence diluée et colorée, est réalisée par voie intra-utérine, 55 h après le retrait de l'éponge. Une quantité de 75.10^6 spermatozoïdes est déposée dans la base de chaque corne utérine, soit au total 150.10^6 spermatozoïdes par brebis. La visualisation des spermatozoïdes *in vivo* est réalisée à l'aide d'un microscope confocal fibré (FCM1000, Leica). Ce système est basé sur la technologie CellVizio (Mauna Kea Technologies), système d'imagerie *in vivo* initialement dédié à l'imagerie sur petits animaux de laboratoire. Le système comprend une source d'excitation laser (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 (S1500) 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 400x600 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 12 images par seconde. Une autre fibre de 4 mm (MiniO), présentant une résolution supérieure (1,8 µm), a également été ponctuellement utilisée pour observer les spermatozoïdes individuellement et visualiser les domaines membranaires (tête, pièce intermédiaire, flagelle). La quantification du transport des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles est réalisée 5 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 utérotubaire. 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 2 minutes sont enregistrées à chaque niveau du tractus. A partir de chaque séquence, 10 champs sont retenus et le nombre de spermatozoïdes par champ est compté. Un nombre moyen de spermatozoïdes par champ est ensuite calculé pour chacune des régions analysées.

RESULTATS

Par laparotomie sous anesthésie générale, nous pouvons extérioriser le tractus femelle et accéder aisément aux différentes régions des cornes utérines (bas, milieu, haut), à la jonction utérotubaire entre l'utérus et l'oviducte (JUT), et à l'oviducte (Figure 1A). Le site de dépôt de la semence, réalisé 5 heures auparavant par injection intra utérine, peut être retrouvé au niveau du bas de la corne utérine. Une fibre optique est ensuite insérée dans la corne utérine et permet de visualiser la lumière et la paroi interne du tractus. La paroi de l'endomètre utérin présente une autofluorescence importante, tandis que la lumière apparaît sombre. Cette autofluorescence peut être utilisée pour visualiser la paroi de l'endomètre à l'échelle cellulaire (Figure 1B). Les spermatozoïdes sont retrouvés à différents niveaux du tractus en concentration croissante entre le bas de la corne et la jonction utérotubaire (9,4 ± 1,75 vs 21,9 ± 2,9 spermatozoïdes/champ respectivement), puis à une concentration beaucoup plus faible dans l'oviducte (3,4 ± 0,8 spermatozoïdes/champ). La microscopie confocale fibrée, permet d'acquérir des séquences vidéo, donc d'observer la dynamique du transit des spermatozoïdes. Celui-ci est la résultante de la mobilité individuelle des spermatozoïdes et des contractions utérines ascendantes. Nous pouvons observer à la fois le mouvement d'ensemble dû aux contractions utérines (Figure 1C), ainsi que la mobilité individuelle due aux battements flagellaires (Figure 1D).

DISCUSSION

La visualisation des spermatozoïdes dans le tractus femelle, a été possible grâce au couplage de la microscopie confocale fibrée et de l'utilisation de marqueurs fluorescents adaptés à l'observation *in vivo*. En effet, la plupart des marqueurs de type "cell tracker" utilisés pour suivre des cellules dans des organismes vivants, sont inadaptés pour les spermatozoïdes. Ces « cell tracker » sont souvent internalisés par endocytose ou fluorescent en utilisant des activités enzymatiques cytoplasmiques qui sont limitées chez les spermatozoïdes. Nous avons donc, d'abord expérimenté des marqueurs fluorescents couramment utilisés pour l'analyse des fonctions biologiques des spermatozoïdes, mais beaucoup se sont révélés inutilisables pour la visualisation *in vivo,* principalement à cause de leur intensité de fluorescence insuffisante ou leur instabilité *in vivo*. Le marqueur R18 est un acide gras à longue chaine (C18) couplé à une molécule de rhodamine. Le marquage des liposomes avec le R18 a été utilisé pour quantifier la fusion de ces liposomes avec la membrane plasmique de cellules animales [5]. Ses propriétés hydrophobes participent à la stabilité de l'intégration du R18 dans la membrane plasmique. Lors de travaux préliminaires, nous avons vérifié, que le R18, n'altère pas la viabilité des spermatozoïdes *in vitro*. Le R18 permet de colorer les spermatozoïdes sur l'ensemble de leur surface en émettant une fluorescence dont l'intensité est stable pendant plusieurs heures *in vitro* et *in vivo*. La nécessité d'un signal fluorescent d'intensité élevée est également liée à l'autofluorescence de l'épithélium utérin [6]. Il est à noter que l'oviducte, contrairement à l'utérus, ne présente pas d'autofluorescence. La microscopie confocale fibrée permet donc, de visualiser les spermatozoïdes fluorescents avec une résolution suffisante, pour effectuer leur dénombrement, et quantifier leur transit dans le tractus femelle. La stabilité du marquage *in vivo,* nous a permis de retrouver les spermatozoïdes jusqu'à 24 h au

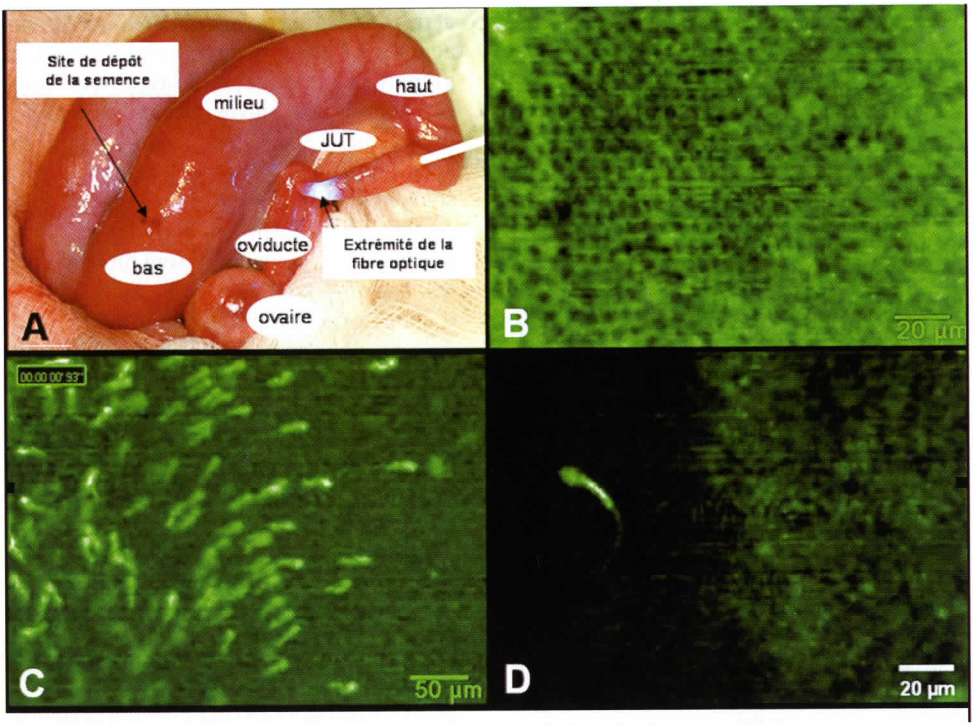

Figure 1. Visualisation des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle. A. Les cornes utérines de la brebis sont externalisées sous anesthésie générale 4 heures après insémination et la fibre optique du système de microscopie confocale fibrée est insérée dans la lumière de l'organe. **B.** Autofluorescence de l'épithélium de l'endomètre. **C.** Une population de spermatozoïdes en mouvement est visualisée à l'aide de la fibre optique de résolution latérale égale à 3,3 µm. **D.** Les différents domaines membranaires (tête, pièce intermédiaire, flagelle d'un spermatozoïde peuvent être visualisés à l'aide de la fibre optique de résolution latérale égale à 1,8 µm.

moins après l'insémination. Nos résultats montrent un gradient croissant de la concentration en spermatozoïdes, entre le bas de la corne utérine et la jonction utérotubaire, 4 heures après l'insémination. Ce gradient peut s'expliquer par le rôle de barrière que joue la jonction utérotubaire, en limitant fortement le passage des spermatozoïdes vers l'oviducte. Elle pourrait ainsi éviter qu'un nombre trop élevé de spermatozoïdes entraine une polyspermie et avoir également un rôle de filtre des spermatozoïdes, selon des critères morphologiques et fonctionnels, pour maximiser le pouvoir fécondant de la population de spermatozoïdes destinés à rencontrer l'ovocyte. Le transit des spermatozoïdes est le résultat des contractions utérines et de la mobilité des spermatozoïdes. Il est donc important de pouvoir mesurer la mobilité des spermatozoïdes *in vivo*. La fréquence d'acquisition des images (12 images/seconde) permet de visualiser la mobilité, et de caractériser les trajectoires des spermatozoïdes, selon des paramètres objectifs comme la vitesse linéaire. Toutefois, des développements seront nécessaires pour adapter les méthodes actuelles de mesure de la mobilité à ces nouvelles images vidéo obtenues *in vivo*. Ces données ont été obtenues chez les ovins, mais nous avons également réalisé des travaux préliminaires chez la truie. Les performances de la méthode d'imagerie ont été similaires, avec de plus l'obtention d'une gestation, ce qui semble indiquer que la méthode de visualisation par microscopie confocale fibrée n'interfère pas de manière délétère avec le processus de fécondation. A l'avenir, nous étendrons l'utilisation de la microscopie confocale fibrée pour étudier le transit des spermatozoïdes *in vivo* dans d'autres espèces modèles.

BIBLIOGRAPHIE

1. SALAMON S, MAXWELL WMC. : Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science,* 2000, **62**, 77-111.
2. HUNTER RH. : The Fallopian tubes in domestic mammals : how vital is their physiological activity ? *Reprod Nutr Dev,* 2005, **45** : 281-290.
3. SUAREZ SS. : Sperm transport and motility in the mouse oviduct : observations *in situ. Biol Reprod,* 1987, **36** : 203-210.
4. BRUCKNER G, Kampfer I, Rummer HJ, Menger H, Schneider G. : [Use of 131I labeling for studying the distribution and migration of spermatozoa in the genital tract of female sheep following artificial insemination. 1. Gamma camera studies of the course of migration]. *Arch Exp Veterinarmed,* 1982, **36** : 297-305.
5. HE L, BAILEY JL, BUHR MM. : Incorporating Lipids into Boar Sperm Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential. *Biol Reprod,* 2001, **64** : 69-79.
6. DREZEK RA, REBECCA Richards-KORTUM MAB, MICHAEL S. FELD, CONSTANTINOS Pitris, Alex FERENCZY, Mark L. FAUPEL, Michele FOLLEN : Optical imaging of the cervix, *Cancer* 2003, **98 :** 2015-2027.