

## **In vivo imaging of ram spermatozoa in the ewe genital tract using fibered confocal microscopy**

X. Druart, Juliette Cognie, G. Baril, F. Clement, J.-L. Dacheux, J.-L. Gatti

► **To cite this version:**

X. Druart, Juliette Cognie, G. Baril, F. Clement, J.-L. Dacheux, et al.. In vivo imaging of ram spermatozoa in the ewe genital tract using fibered confocal microscopy. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, Elsevier Masson, 2011, 39 (11), pp.633-635. 10.1016/j.gyobfe.2011.09.007 . hal-00776193

**HAL Id: hal-00776193**


**<https://hal.inria.fr/hal-00776193>**

Submitted on 29 May 2020

**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.

## QUESTIONS À L'AUTEUR

 ELSEVIER MASSON	<b>Revue :</b> GYOBFE  <b>Numéro d'article :</b> 2190	<b>Merci de retourner vos réponses par e-mail ou par fax à :</b>  <b>E-mail :</b> <a href="mailto:corrections.esme@elsevier.thomsondigital.com">corrections.esme@elsevier.thomsondigital.com</a>  <b>Fax :</b> +33 (0) 1 71 16 51 88
---	---	--

Cher auteur,

Vous trouverez ci-dessous les éventuelles questions et/ou remarques qui se sont présentées pendant la préparation de votre article. Elles sont également signalées dans l'épreuve par une lettre « Q » suivie d'un numéro. Merci de vérifier soigneusement vos épreuves et de nous retourner vos corrections soit en annotant le PDF ci-joint, soit en les listant séparément.

Pour toute correction ou modification dans les figures, merci de consulter la page <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**Articles de numéros spéciaux :** merci d'ajouter (dans la liste et dans le corps du texte) la mention « dans ce numéro » pour toute référence à d'autres articles publiés dans ce numéro spécial.

<b>Références non appelées :</b> Références présentes dans la liste des références mais pas dans le corps de l'article – merci d'appeler chaque référence dans le texte ou de les supprimer de la liste.	
<b>Références manquantes :</b> Les références ci-dessous se trouvaient dans le texte mais ne sont pas présentes dans la liste des références. Merci de compléter la liste ou de les supprimer du texte.	
Emplacement dans l'article	Question / Remarque
<a href="#">Q1</a> <a href="#">Q2</a>	Merci de vérifier que les prénoms et les noms ont été correctement identifiés. Veuillez compléter l'adresse de correspondance en nous transmettant les éléments manquants, soit: [le numéro et le nom de la voie, la ville]

### Utilisation des fichiers électroniques

Si nous n'avons pas pu exploiter le fichier de votre article et/ou de vos figures, nous avons utilisé la méthode suivante :

Scan de (ou de parties de) votre article

Ressaisie de (ou de parties de) votre article

Scan des figures

Merci de votre collaboration.



Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
 EM|consulte  
www.em-consulte.com



2 Quarante-deuxième Journée thématique de la Société française d'étude de la fertilité (Paris, 17 mars 2011)

3 Visualisation in vivo des spermatozoïdes de bélier dans le tractus génital  
4 de brebis par microscopie confocale fibrée

5 *In vivo imaging of ram spermatozoa in the ewe genital tract using fibered confocal microscopy*

6 Q1 X. Druart<sup>a,\*</sup>, J. Cognie<sup>a</sup>, G. Baril<sup>a</sup>, F. Clement<sup>b</sup>, J.-L. Dacheux<sup>a</sup>, J.-L. Gatti<sup>a</sup>

7 Q2<sup>a</sup> UMR 6175 Inra, CNRS-université de Tours-Haras Nationaux, physiologie de la reproduction et des comportements, 37380 Nouzilly, France  
8 <sup>b</sup> INRIA Paris-Rocquencourt, Domaine de Voluceau, Rocquencourt BP 105, 78153 Le Chesnay cedex, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 27 juillet 2011  
Accepté le 19 août 2011  
Disponible sur Internet le xxx

Mots clés :

Spermatozoïde  
Imagerie in vivo  
Tractus génital femelle  
Transit  
Fertilité

Keywords:

Sperm  
In vivo imaging  
Female genital tract  
Transit  
Fertility

RÉSUMÉ

Chez les mammifères domestiques, le transit des spermatozoïdes dans le tractus femelle, ainsi que leur survie durant la période pré-ovulatoire sont reconnus comme des éléments importants pour la réussite de l'insémination. Cependant, l'étude de ce transit est limitée par l'absence de méthode d'imagerie des spermatozoïdes in vivo. La visualisation des spermatozoïdes de bélier dans le tractus femelle de brebis a été possible grâce au couplage de la microscopie confocale fibrée et de l'utilisation de marqueurs fluorescents adaptés à l'observation in vivo, c'est-à-dire stables in vivo et marquant l'intégralité de la surface du spermatozoïde. Nos résultats montrent le rôle prédominant de la jonction uterotubaire, qui relie l'utérus à l'oviducte, dans la sélection des spermatozoïdes au cours du transit.

© 2011 Publié par Elsevier Masson SAS.

ABSTRACT

Sperm transit in the female tract is one of the key factors in the success of fertilization after artificial insemination in sheep species. However, its study is limited by the absence of in vivo imaging methods. The imaging of ram sperm in the female genital tract was made possible using the confocal fibered microscopy and fluorescent stains adapted to spermatozoa. Our results show the active role of the uterotubal junction in the selection of sperm during their transit.

© 2011 Published by Elsevier Masson SAS.

9  
10 **1. Introduction**

11 Chez les mammifères domestiques, la réussite de la fécondation  
12 après accouplement ou insémination artificielle (IA) dépend de  
13 nombreux facteurs. Parmi ceux-ci, le transit des spermatozoïdes  
14 dans le tractus femelle, ainsi que leur survie durant la période pré-  
15 ovulatoire, sont reconnus comme des éléments importants. Cela  
16 est particulièrement vrai lorsque la semence est soumise à des  
17 processus de conservation, comme la congélation ou la conser-  
18 vation liquide pour des durées de un à plusieurs jours. Par exemple,  
19 chez les ovins, la fertilité de la semence congelée est équivalente à  
20 la fertilité après saillie naturelle lorsque la semence est déposée  
21 directement dans l'utérus, mais fortement réduite après un dépôt  
22 dans le vagin, en amont du col de l'utérus [1]. Cela suggère que le

passage du col de l'utérus par les spermatozoïdes est altéré par le 23  
procédé de conservation. Afin d'étudier l'impact de la conservation 24  
sur l'aptitude des spermatozoïdes à franchir le col de l'utérus et 25  
transiter dans le tractus femelle, la mise au point d'une méthode de 26  
quantification des spermatozoïdes in vivo était nécessaire. En effet, 27  
jusqu'à présent, les études quantitatives ont été réalisées ex vivo 28  
par histologie, microscopie électronique ou comptage des sper- 29  
matozoïdes après lavage du tractus femelle obtenu après abattage 30  
des animaux [2]. Chez certaines espèces comme la souris et le 31  
hamster, les spermatozoïdes peuvent être directement observés ex 32  
vivo dans l'oviducte par transparence [3]. Les rares études réalisées 33  
in vivo chez les animaux domestiques sont basées sur la 34  
scintigraphie du tractus femelle après insémination avec des 35  
spermatozoïdes marqués avec un traceur radioactif, et permettent 36  
de visualiser les régions du tractus contenant des spermatozoïdes 37  
[4]. 38

L'objectif de cette étude est donc de concevoir une méthode de 39  
visualisation in vivo des spermatozoïdes individuels dans le tractus 40

\* Auteur correspondant.  
Adresse e-mail : xavier.druart@tours.inra.fr (X. Druart).

41 génital femelle basée sur l'utilisation de la microscopie confocale  
42 fibrée.

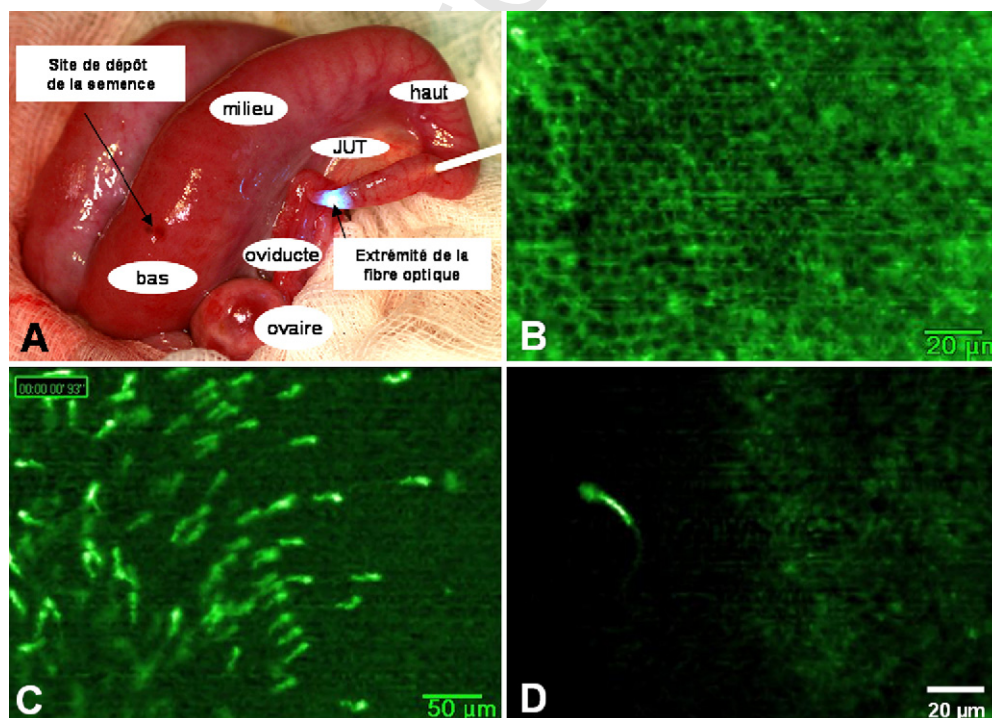
## 43 2. Patients et méthodes

44 La semence de trois béliers de race Lacaune est collectée à l'aide  
45 d'un vagin artificiel et diluée à une concentration finale de  
46  $1 \times 10^6$  spermatozoïdes par mL, dans un milieu à base de lait  
47 écrémé reconstitué (11,1 g de poudre de lait pour 100 mL d'eau  
48 déminéralisée) et supplémenté en antibiotiques (gentamycine à  
49  $50 \mu\text{g/mL}$ ). Quinze minutes avant l'IA, la semence est incubée à  $37^\circ\text{C}$   
50 avec un fluorochrome, l'octadécyl rhodamine B (R18) qui colore la  
51 membrane plasmique de tous les spermatozoïdes en orange.  
52 L'œstrus est induit chez 12 brebis de race Île de France par un  
53 traitement progestatif de 13 jours (éponges vaginales de 30 mg  
54 d'acétate de fluorogestone) suivi d'une injection de 500 unités de  
55 Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) au moment du retrait  
56 de l'éponge. L'insémination, avec la semence diluée et colorée, est  
57 réalisée par voie intra-utérine, 55 heures après le retrait de l'éponge.  
58 Une quantité de  $75 \times 10^6$  spermatozoïdes est déposée dans la base  
59 de chaque corne utérine, soit au total  $150 \times 10^6$  spermatozoïdes par  
60 brebis. La visualisation des spermatozoïdes *in vivo* est réalisée à  
61 l'aide d'un microscope confocal fibré, le Cellvizio<sup>®</sup> (Mauna Kea  
62 Technologies, Paris). Ce système comprend une source d'excitation  
63 laser (488 nm), une fibre optique et un logiciel d'acquisition et de  
64 traitement des images vidéo, en temps réel. Parmi la gamme de  
65 fibres optiques disponibles et présentant des diamètres et des  
66 résolutions optiques différentes, une fibre de 1,5 mm a été retenue  
67 car son diamètre est compatible avec les dimensions de la lumière de  
68 l'utérus et de l'oviducte, et sa résolution latérale de  $3,3 \mu\text{m}$  permet  
69 de visualiser correctement les spermatozoïdes. Les images sont  
70 acquises à une fréquence fixe de 12 images par seconde. Une autre  
71 fibre de 4 mm, présentant une résolution supérieure ( $1,8 \mu\text{m}$ ),  
72 a également été ponctuellement utilisée pour observer les  
73 spermatozoïdes individuellement et visualiser les domaines

morphologiques (tête, pièce intermédiaire, flagelle). La quantifica-  
tion 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. À partir de ces points d'entrée, l'acquisition  
des images est réalisée aux niveaux suivants : 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. À partir de chaque  
séquence, dix champs sont retenus aléatoirement et le nombre de  
spermatozoïdes par champ est compté. Un nombre moyen de  
spermatozoïdes par champ est ensuite calculé pour chacune des  
régions analysées. La distribution des spermatozoïdes au sein des  
différentes régions du tractus femelle est évaluée par analyse de  
variance (procédure GLM du logiciel SAS).

## 3. Résultats

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  
utéro-tubaire entre l'utérus et l'oviducte (JUT), et à l'oviducte  
(Fig. 1A). Le site de dépôt de la semence, réalisé cinq 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 autofluores-  
cence importante, tandis que la lumière apparaît sombre. Cette  
autofluorescence peut être utilisée pour visualiser la paroi de  
l'endomètre à l'échelle cellulaire (Fig. 1B). Les spermatozoïdes sont



**Fig. 1.** Visualisation des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle. A. Les cornes utérines de la brebis sont externalisées sous anesthésie générale quatre 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  $3,3 \mu\text{m}$ . D. Les différents domaines morphologiques (tête, pièce intermédiaire, flagelle) d'un spermatozoïde mobile peuvent être visualisés *in vivo* à l'aide de la fibre optique de résolution latérale égale à  $1,8 \mu\text{m}$ .

107 retrouvés à différents niveaux du tractus en concentration  
108 croissante entre le bas de la corne et la jonction uterotubaire  
109 ( $9,4 \pm 1,8$ ,  $16,2 \pm 2,2$ ,  $21,2 \pm 3,0$  et  $21,9 \pm 2,9$  spermatozoïdes/champ  
110 pour, respectivement, le bas, le milieu, le haut de corne et la jonction  
111 uterotubaire), puis à une concentration beaucoup plus faible dans  
112 l'oviducte ( $3,4 \pm 0,8$  spermatozoïdes/champ,  $p < 0,05$ ). La microscopie  
113 confocale fibrée permet d'acquérir des séquences vidéo, donc  
114 d'observer la dynamique du transit des spermatozoïdes. Celui-ci est  
115 la résultante de la mobilité individuelle des spermatozoïdes et des  
116 contractions utérines ascendantes. Nous pouvons observer à la fois le  
117 mouvement d'ensemble dû aux contractions utérines (Fig. 1C), ainsi  
118 que la mobilité individuelle des spermatozoïdes (Fig. 1D).

#### 119 4. Discussion

120 La visualisation des spermatozoïdes dans le tractus femelle a été  
121 possible grâce au couplage de la microscopie confocale fibrée et de  
122 l'utilisation de marqueurs fluorescents adaptés à l'observation in  
123 vivo. Nous avons expérimenté des marqueurs fluorescents couram-  
124 ment utilisés pour l'analyse des fonctions biologiques des sperma-  
125 tozoïdes, mais beaucoup se sont révélés inutilisables pour la  
126 visualisation in vivo, principalement à cause de leur intensité de  
127 fluorescence insuffisante ou de leur instabilité in vivo. Le marqueur  
128 R18 est un acide gras à longue chaîne (C18) couplé à une molécule de  
129 rhodamine. Le R18 permet de colorer les spermatozoïdes sur  
130 l'ensemble de leur surface en émettant une fluorescence dont  
131 l'intensité est stable pendant plusieurs heures in vitro et in vivo. Des  
132 essais préliminaires in vitro n'ont pas montré d'effet du R18 sur la  
133 viabilité et la mobilité des spermatozoïdes de bélier. La nécessité d'un  
134 signal fluorescent d'intensité élevée est également liée à l'auto-  
135 fluorescence de l'épithélium utérin [5]. Il est à noter que l'oviducte,  
136 contrairement à l'utérus, ne présente pas d'autofluorescence. La  
137 microscopie confocale fibrée permet donc de visualiser les  
138 spermatozoïdes fluorescents avec une résolution suffisante, pour  
139 effectuer leur dénombrement et quantifier leur transit dans le tractus  
140 femelle. La stabilité du marquage in vivo nous a permis de retrouver

les spermatozoïdes jusqu'à 24 heures au moins après l'insémination. 141  
Nos résultats montrent un gradient croissant de la concentration en 142  
spermatozoïdes, entre le bas de la corne utérine et la jonction 143  
uterotubaire, quatre heures après l'insémination. Ce gradient peut 144  
s'expliquer par le rôle de barrière sélective que joue la jonction 145  
uterotubaire, en limitant fortement le passage des spermatozoïdes 146  
vers l'oviducte [6]. Le transit des spermatozoïdes est le résultat des 147  
contractions utérines et de la mobilité des spermatozoïdes. Il est 148  
donc important de pouvoir mesurer la mobilité des spermatozoïdes 149  
in vivo. La fréquence d'acquisition des images (12 images/s) permet 150  
de visualiser la mobilité et de caractériser les trajectoires des 151  
spermatozoïdes, selon des paramètres objectifs comme la vitesse 152  
linéaire. Toutefois, des développements seront nécessaires pour 153  
adapter les méthodes actuelles de mesure de la mobilité à ces 154  
nouvelles images vidéo obtenues in vivo. À l'avenir, nous étendrons 155  
l'utilisation de la microscopie confocale fibrée pour étudier le transit 156  
des spermatozoïdes in vivo dans d'autres espèces modèles. 157

#### Déclaration d'intérêts 158

159 Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en  
160 relation avec cet article.

#### Références 161

- 162 [1] Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:  
163 77-111.
- 164 [2] Hunter RH. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their  
165 physiological activity? *Reprod Nutr Dev* 2005;45:281-90.
- 166 [3] Suarez SS. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in  
167 situ. *Biol Reprod* 1987;36:203-10.
- 168 [4] Bruckner G, Kampfer I, Rummer HJ, Menger H, Schneider G. Use of 131I labeling  
169 for studying the distribution and migration of spermatozoa in the genital tract  
170 of female sheep following artificial insemination. 1. Gamma camera studies of  
171 the course of migration. *Arch Exp Veterinarmed* 1982;36:297-305.
- 172 [5] Drezek RA, Rebecca Richards-Kortum MAB, Feld MS, Pitris C, Ferenczy A, Faupel  
173 ML, et al. Optical imaging of the cervix. *Cancer* 2003;98:2015-27.
- 174 [6] Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian  
175 oviduct. *Int J Dev Biol* 2008;52(5-6):455-62.