



HAL
open science

Rôle de la résistance des spermatozoïdes au stress osmotique dans leur migration dans le tractus génital chez la cochette

Guillaume Tsikis

► To cite this version:

Guillaume Tsikis. Rôle de la résistance des spermatozoïdes au stress osmotique dans leur migration dans le tractus génital chez la cochette. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. hal-04911416

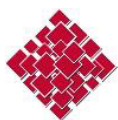
HAL Id: hal-04911416

<https://ephe.hal.science/hal-04911416v1>

Submitted on 24 Jan 2025

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

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



École Pratique
des Hautes Études

PSL 

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES - PSL
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par

Guillaume Tsikis

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études - PSL

**Rôle de la résistance des spermatozoïdes au stress osmotique
dans leur migration dans le tractus génital chez la cochette**

Soutenu 17/12/2024 devant le jury suivant :

Dr Daniel Stockholm – Président

Dr Xavier Druart – Tuteur scientifique

Dr Sophie Thenet – Tutrice pédagogique

Pr Sylvie Chastant – Rapportrice

Dr Alice Fatet – Examinatrice

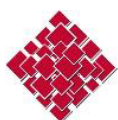
Mémoire préparé sous la direction du ***Dr Xavier Druart***

*Equipe Interactions Cellulaires et fertilité. UMR INRAE-CNRS-Université de Tours,
Physiologie de la Reproduction et des Comportements (PRC), 37380 Nouzilly,*

Et du ***Pr Sophie Thenet***

EPHE-PSL (Sciences de la Vie et de la Terre) :

*Equipe Microbiote Intestin et Inflammation. UMR Centre de Recherche Saint-Antoine,
75012 Paris,*



École Pratique
des Hautes Études

PSL 

Rôle de la résistance des spermatozoïdes au stress osmotique dans leur migration dans le tractus génital chez la cochette

Prénom et nom : *Guillaume Tsikis*

Date de soutenance : **17/12/2024**

RÉSUMÉ

L'insémination artificielle (IA) porcine, qui consiste à déposer à l'aide d'un cathéter une quantité définie de spermatozoïdes dans le tractus génital de la truie, nécessite un contrôle précis de la qualité des gamètes. Cependant, cette qualité, mesurée par la mobilité *in vitro* des spermatozoïdes, est peu prédictive de la fertilité. Ceci conduit au dépôt d'un nombre excessif de spermatozoïdes pour assurer la réussite à l'insémination artificielle, mais en limitant la diffusion de semence de verrats de haute valeur génétique (car plus de doses pourraient être produites par verrat). Nos travaux antérieurs ont montré une corrélation positive entre la résistance des spermatozoïdes à un stress hypo-osmotique et la fertilité. Une faible résistance des spermatozoïdes semble liée à l'abondance des protéines du plasma séminal fixées sur les spermatozoïdes au cours de l'éjaculation. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent le lien entre résistance osmotique et fertilité ne sont pas connus. Nous avons posé l'hypothèse que l'efficacité du transit des spermatozoïdes dans le tractus femelle, un facteur clé de la réussite à l'IA, est liée à la résistance osmotique des spermatozoïdes. Au cours de mon projet EPHE, je me suis donc intéressé à l'impact de la résistance des spermatozoïdes sur leur migration dans le tractus femelle. Le premier travail, méthodologique, a consisté à mettre au point une méthode semi-automatisée de quantification du transit des spermatozoïdes par lavage et comptage des spermatozoïdes fluorescents collectés dans les différentes régions du tractus femelle. En utilisant un second fluorochrome, un marquage différentiel a été validé, prérequis pour comparer deux éjaculats de résistance contrastée dans le même tractus. Ensuite, nous avons décrit le phénotype de la migration spermatique et montré l'existence d'un gradient ascendant de spermatozoïdes dans les cornes utérines. En accord avec les résultats précédemment publiés, nous avons confirmé la très forte sélection des spermatozoïdes dans la jonction utéro-tubaire et leur stockage dans l'isthme de l'oviducte, ainsi qu'une redistribution des spermatozoïdes de l'isthme vers l'ampoule au moment de l'ovulation. Enfin, nous avons identifié des verrats qui présentaient une grande variabilité quant à la résistance au stress hypo-osmotique de leurs spermatozoïdes et comparé leur migration dans le tractus femelle. Les résultats préliminaires indiquent une plus forte proportion de spermatozoïdes ayant une forte résistance dans le tractus femelle. En conclusion, la méthodologie développée dans ce projet a permis de caractériser la migration des spermatozoïdes chez la truie et d'évaluer le lien entre cette migration et la résistance au stress osmotique. En perspective, le rôle des protéines du plasma séminal liées aux spermatozoïdes dans la résistance au stress osmotique et le transit dans le tractus femelle sera approfondi, en développant aussi d'autres méthodes d'imagerie pour mieux décrire la migration spermatique.

MOTS-CLÉS : Porc, migration des spermatozoïdes, résistance osmotique, insémination artificielle, quantification, imagerie de fluorescence.

Remerciements

Ces 3 années de reprise des études ont été pour moi une grande source d'épanouissement professionnel et personnel, où j'ai pu mener un projet passionnant au sein d'une équipe que j'apprécie beaucoup. J'ai en particulier pu me rendre compte de la chance que j'avais par les nombreux conseils, contributions, encouragements que mes collègues de l'équipe et de l'unité m'ont donnés.

Mon premier remerciement est pour Karine Reynaud qui a été le déclencheur et m'a permis de « sauter le pas » et de débiter ce projet que j'avais envisagé depuis longtemps. Guillaume : « je pensais peut-être faire une EPHE », Karine : « Ah oui, Guillaume, c'est quand les inscriptions ! Tu as vu un sujet avec Xavier ! » Avec son enthousiasme constant et communicatif et son énergie hors du commun, elle a été un soutien précieux pour l'aide au laboratoire, des réponses à mes questionnements, les corrections (d'une rigueur orthographique implacable) et surtout les discussions décontractées au café qui permettent de relativiser.

Je poursuivrais par Xavier Druart, mon tuteur scientifique, non pas seulement depuis 3 ans, mais depuis 2005 quand j'ai commencé à le suivre dans ses projets au sein de l'équipe « gamètes mâles et fertilité » (cela ne nous rajeunit pas...). Avec humilité, Xavier a toujours partagé et transmis sa passion et m'a encouragé dans mon désir d'évolution scientifique, ce qui m'a mené finalement à la réalisation de ce projet EPHE. Je garde un excellent souvenir de notre congrès en Australie, merci pour ces belles découvertes. C'est avec grand plaisir que je continuerai à participer à tous tes nombreux projets enthousiasmants.

L'équipe ICF a été grandement renforcée au début de mon EPHE avec l'arrivée de Véronique Demattei, Ludivine Laffont et Isabelle Grasseau, et j'ai vite réalisé dès mes premiers prélèvements que je ne m'en sortirai pas tout seul : heureusement, le trio de choc était là ! C'est dans une ambiance conviviale et détendue, autour des rires (sans tabous) entre reproducteurs, qu'elles m'ont été d'une aide précieuse pour les dissections, en plus de toute l'expérience qu'elles ont pu apporter sur ce projet lors de nos échanges.

J'adresse un grand merci à mes « chefs », Marie Saint-Dizier et Pascal Mermillod, qui m'ont grandement soutenu dans mon projet. N'hésitant pas à me dégager du temps pour que je puisse avancer, ils m'ont donné des conseils, toujours avisés et orientés dans mon parcours professionnel et scientifique.

Merci à Théo Prudhomme, embauché dans l'équipe à la suite à son Master 1 et 2 avec nous, pour son renfort pour les analyses de résistance osmotique et les échanges et questionnements que nous avons pu avoir, sur les spermatozoïdes bien sûr !

Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe, titulaires et étudiants, pour leur soutien et leur dynamisme. Je pense en particulier à Anaïs pour son aide en statistique,

Lorraine Schmaltz qui a fait sa thèse en parallèle de mon parcours d'étude sur l'espèce porcine et Elie Barakat qui commence sa thèse.

Ce projet n'aurait pas pu se réaliser sans notre partenaire, l'entreprise de sélection porcine YXIA, et je remercie Isabelle Merour et Garance Chatain pour leur réactivité et leur professionnalisme.

J'adresse aussi mes remerciements à toute l'équipe de Porganic, Stéphane Ferchaud, Doryan Grivault, Patrick Manceau et Yoann Bailly avec qui nous collaborons depuis plusieurs années, pour leur accueil et leur travail de qualité.

Merci à Anaïs Giovanetti, Eric Royer et Valentin Le-Guet de l'UEPAO porcine pour leur participation à ce projet, les traitements à réaliser en horaire décalé et leur enthousiasme et efficacité. J'adresse ma reconnaissance à Sylvain et Benoît, pour la qualité des prélèvements qu'ils ont effectués.

Toute ma gratitude va aussi à Marie-Claire Blache et Renaud Fleurot, membres de la Plateforme d'Imagerie Cellulaire de l'unité, pour leur investissement qui a permis au projet d'avancer. Je les ai sollicités à maintes reprises pour les acquisitions et analyses d'images, et c'est toujours avec gentillesse et une grande expertise qu'ils ont résolu mes problèmes.

Merci à Isabelle Lantier, ingénieure de la plateforme Image'in pour les analyses à l'IVIS Spectrum.

Je tenais à remercier Sophie Thenet, ma tutrice pédagogique, pour la richesse de ses interventions lors des UE et la transmission avec bienveillance de la démarche scientifique.

Ses bonnes suggestions pour le choix des UE et pour la rédaction du rapport ont été très précieuses. La qualité de cette formation tient pour beaucoup aux compétences pédagogiques des enseignants dont j'ai grandement apprécié les interventions pendant les UE.

J'en profite pour adresser mes remerciements à Daniel Stockholm, dont les enseignements sont passionnants et avec qui j'ai pu échanger sur des sujets scientifiques divers. Merci de présider mon jury. Merci aussi à Sylvie Chastant d'avoir accepté d'être rapportrice du mémoire et Alice Fatet pour son rôle d'examinatrice.

J'adresse ma reconnaissance à mon employeur, le CNRS, et le collège de direction de mon unité pour leur soutien et le financement de cette formation.

Enfin, je remercie de tout mon cœur celle qui est la plus importante à mes yeux et qui partage ma vie, Karine, pour son soutien inconditionnel et ses encouragements dans ce projet professionnel.

Table des matières

Remerciements	3
Listes des abréviations	8
Liste des figures et des tableaux	9
Liste des documents en annexes.....	10
I. Introduction.....	11
1. L'insémination artificielle	11
1.1. Prélèvement et conservation de la semence porcine	11
1.2. Réussite de l'insémination	12
1.2.1. Le cycle œstral chez la truie	12
1.2.2. Le moment de l'insémination.....	13
1.3. Traits compensables et nombre de spermatozoïdes à l'insémination	14
1.4. Diagnostic de la fertilité des verrats.....	15
2. La migration des spermatozoïdes dans les voies génitales de la truie.....	16
2.1. Anatomie du tractus femelle de la cochette/truie.....	16
2.2. Barrières physiologiques du tractus femelle	17
2.3. Contractions utérines et mobilité des spermatozoïdes	17
2.3.1. Migration dans les cornes utérines	17
2.3.2. Interactions des spermatozoïdes dans l'utérus	20
2.3.3. Migration dans la jonction utéro-tubaire.....	21
2.4. Migration et interaction des spermatozoïdes dans l'oviducte.....	22
2.4.1. Capacitation et hyperactivation des spermatozoïdes	23
2.4.2. Réservoir spermatique et liaison des spermatozoïdes aux cellules	25
2.4.3. Détachement des spermatozoïdes des cellules : rôle de la progestérone	26
2.4.4. Progression des spermatozoïdes vers l'ovocyte	27
3. Physiologie de l'éjaculat chez le verroat	30
3.1. Le spermatozoïde	30
3.1.1. Tête.....	30
3.1.2. Flagelle.....	31
3.2. Caractéristique générale de l'éjaculat.....	32
3.3. Caractérisation des fractions de l'éjaculat de verroat	33
3.4. Composition en protéines du plasma séminal et des spermatozoïdes.....	34
3.4.1. Généralités sur le plasma séminal.....	34
3.4.2. Composition protéique du PS et conséquences fonctionnelles pour le spermatozoïde	34
3.5. La régulation du volume spermatique	38
3.6. La résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique	39

II. Hypothèse et objectifs scientifiques	43
III. Matériel et méthodes.....	44
1. Doses de semence de verrats.....	44
2. Préparation du dilueur	44
3. Analyse des mobilités et des concentrations spermatiques au CASA.....	44
4. Synchronisation des cochettes et insémination artificielle.....	47
5. Outils d'analyse d'image et validation des fluorochromes	47
5.1. Outils d'analyse d'image pour la quantification de la migration spermatique	47
5.2. Validation des fluorochromes	48
5.2.1. Stratégie de recherche des fluorochromes	48
5.2.2. Critères de validation des fluorochromes pour le marquage des spermatozoïdes	49
5.2.3. Préparation et marquage des spermatozoïdes	49
5.2.4. Mesure de la diffusion des fluorochromes	51
5.2.5. Analyse des spermatozoïdes en tube au Cellvizio.....	51
5.2.6. Analyse des spermatozoïdes au scanner de lames	52
5.2.7. Analyse des spermatozoïdes à l'IVIS Spectrum	52
6. Quantification de la migration spermatique au scanner de lames et logiciel Qupath.....	53
6.2. Concentration et dépôts des spermatozoïdes	54
6.3 Visualisation des spermatozoïdes au scanner de lames	56
6.4 Détection et comptage des spermatozoïdes avec le logiciel QuPath	56
6.5. Comptages manuels des spermatozoïdes au microscope à épifluorescence	57
7. Validation du marquage différentiel pour la quantification de la migration spermatique.....	57
8. Phénotypage de la migration des spermatozoïdes	58
9. Mesure de la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique.....	59
10. Evaluation de spermatozoïdes de verrats extrêmes pour la résistance au stress hypo-osmotique	60
11. Evaluation de la migration spermatique de spermatozoïdes de verrats extrêmes pour la résistance au stress hypo-osmotique.....	61
IV. Résultats.....	62
1. Validation des fluorochromes et des méthodes d'imagerie pour la quantification spermatique après IA.....	62
1.1. Validation des fluorochromes	62
1.1.1. Evaluation des fluorochromes.....	62
1.1.2 Evaluation de la toxicité des fluorochromes CFSE et R18	64
1.2. Validation de la méthode d'imagerie	64
1.2.1. Analyse des spermatozoïdes à l'IVIS Spectrum	65

1.3. Détection semi-automatisée des spermatozoïdes après analyse au scanner de lames et validation du marquage différentiel après IA	68
1.3.1. Détection semi-automatisée des spermatozoïdes après analyse au scanner de lames .	68
1.3.2. Validation du marquage différentiel des spermatozoïdes marqués au CFSE et R18	71
2. Phénotypage de la migration spermatique 3 h après IA	73
2.1. Comptage des spermatozoïdes dans les régions du tractus femelle	74
2.2. Représentation de la densité spermatique le long du tractus femelle	74
2.3. Gradient de spermatozoïdes dans les cornes utérines	75
2.4. Sélection spermatique par la jonction utéro-tubaire.....	77
2.5. Retenue des spermatozoïdes dans l’isthme caudale	77
2.6. Redistribution des spermatozoïdes au moment de l’ovulation	78
3. Capacité de migration de spermatozoïdes de verrats extrêmes pour la résistance au stress hypo-osmotique.....	79
3.1. Identification de spermatozoïdes de verrats extrêmes pour la résistance au stress hypo-osmotique.....	79
3.2. Comparaison de la migration des spermatozoïdes extrêmes pour la résistance au stress hypo-osmotique	82
V. Discussion et perspectives	84
VI. Bibliographie	89
VII. Annexes	102

Listes des abréviations

BSA : albumine du sérum bovin

BSP : Binder of Sperm Proteins

SBF : Serial block-face

CASA : Computer Assisted Semen Analysis

FIV : Fécondation *in vitro*

IA : Insémination artificielle

Ex : Excitation

Em : Emission

h : heures

HBP : Heparin-binding spermadhesins

j : jours

JUT : Jonction utéro-tubaire

min : minute

mL : millilitre

QSP : Quantité Suffisante Pour

YXIA : Coopérative d'insémination porcine

PS : plasma séminal

SPZ : spermatozoïdes

λ : longueur d'onde

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 Profil des principales hormones dans le sang au cours du cycle œstral chez la truie	13
Figure 2 Représentation du moment optimal de l'IA.....	14
Figure 3 Modèle de la courbe dose-réponse du pourcentage de fertilité en fonction du nombre de spermatozoïdes	15
Figure 4 Photo légendée du tractus et de l'oviducte de cochette	17
Figure 5 Image de microscopie électronique à balayage des spermatozoïdes dans la JUT et l'utérus chez la truie.	22
Figure 6 Modifications de surface rendant les spermatozoïde apte à la fécondation	24
Figure 7 : Illustrations de la muqueuse de l'isthme, de la jonction isthme-ampoule et de l'ampoule d'oviducte de vache	28
Figure 8 Schémas de 3 types de taxis de spermatozoïdes et modèle théorique de guidage des spermatozoïdes vers l'ovocyte.....	29
Figure 9 Schéma d'un spermatozoïde.....	30
Figure 10 Schéma de l'appareil reproducteur de verrat	32
Figure 11 : Séparation du plasma séminal de verrat sur gel d'électrophorèse	35
Figure 12 Dendrogramme des protéines différentielles entre les spermatozoïdes épididymaires et les spermatozoïdes éjaculés provenant des différentes fractions de l'éjaculat.....	37
Figure 13 Courbes de distribution du volume des spermatozoïdes après stress hypo-osmotique.....	39
Figure 14 Evaluation de la viabilité des spermatozoïdes et de la fertilité après stress hypo-osmotique	41
Figure 15 Evaluation de la résistance au stress hypo-osmotique de spermatozoïdes éjaculés et dendrogramme de leur protéomes.....	42
Figure 16 Présentation du CASA.....	46
Figure 17 Schéma de dépôt des spermatozoïdes sur gradient de Percoll 30 % / 90 %	50
Figure 18 Schémas des différentes régions d'intérêts du tractus femelle.....	53
Figure 19 Protocole de la préparation des spermatozoïdes après dissection du tractus.....	55
Figure 20 Protocole pour la validation du marquage différentiel.....	58
Figure 21 Protocole pour le phénotypage de la migration spermatique.....	59
Figure 22 Protocole de mesure de la viabilité spermatique après stress hypo-osmotique	60
Figure 23 Image des spermatozoïdes après un marquage différentiel au CFSE et R18 avant et après IA	63
Figure 24 Effet des fluorochromes CFSE et R18 sur les spermatozoïdes de verrats Landrace	64
Figure 25 Mesure de la fluorescence de différentes quantités de spermatozoïdes déposés en goutte à l'IVIS Spectrum	66
Figure 26 Image des spermatozoïdes quantifiés dans le tractus femelle après analyse à l'IVIS Spectrum	66
Figure 27 Quantification des spermatozoïdes au scanner de lames après analyse à l'IVIS Spectrum .	67
Figure 28 Exemples de formes détectées et conservées pour le comptage de la classe spermatozoïdes	68
Figure 29 Exemples de formes détectées et exclues du comptage	68
Figure 30 Images de rinçage de cornes utérines au scanner de lames et au microscope confocal	69
Figure 31 Image des débris faux positifs dans une tache de poussière	70
Figure 32 Exemples de discrimination difficile des spermatozoïdes R18	70
Figure 33 Image d'un amas de cellules de la JUT	71
Figure 34 Erreur relative en fonction du nombre de spermatozoïdes comptés par région	73
Figure 35 Représentation de la densité spermatique le long du tractus femelle.....	75

Figure 36 Gradient ascendant de spermatozoïde dans la cornes utérines.....	76
Figure 37 : Variabilité des spermatozoïdes dans les cornes utérines entre le côté gauche et le côté droit	76
Figure 38 Sélection des spermatozoïdes par la jonction utéro-tubaire.....	77
Figure 39 Proportion des spermatozoïdes entre les différentes régions de l’oviducte.....	78
Figure 40 Proportion des spermatozoïdes entre les différentes régions de l’oviducte avant et après l’ovulation.....	79
Figure 41 Résistance des spermatozoïdes à un stress hypo-osmotique pour les races Landrace et Large White	81
Figure 42 Identification des verrats pour les IA hétérospermiqes de spermatozoïdes résistants (-). 82	
Figure 43 Quantification après IA hétérospermiqes de spermatozoïdes résistants (-) et (+).....	83

Tableau 1 Volume, nombre de spermatozoïdes et concentration moyenne d’un éjaculat chez les mammifères d’élevage	33
Tableau 2 <i>Caractéristiques des différents appareils d’imagerie</i>	47
Tableau 3 Résumé des résultats de l’évaluation des fluorochromes	62
Tableau 4 Validation du marquage différentiel CFSE et R18	72
Tableau 5 Comptages de spermatozoïdes dans le tractus femelle pour les côtés gauche et droit	74

Liste des documents en annexes

Annexe 1 Evaluation des 23 fluorochromes	102
Annexe 2 Evaluation du stade du cycle et dimensions des cornes utérines et des oviductes	103
Annexe 3 Données individuelles de comptage des spermatozoïdes pour les cornes utérines et la JUT	103
Annexe 4 Données individuelles de comptage des spermatozoïdes pour les oviductes	103
Annexe 5 Quantification des spermatozoïdes après IA hétérospermiqes	103

I. Introduction

1. L'insémination artificielle

L'insémination artificielle (IA) s'est beaucoup développée dans la filière porcine dans les années 80 et elle est actuellement largement utilisée pour contrôler les aspects sanitaires, accélérer le progrès génétique et la productivité.

Cette technique est la plus ancienne des biotechnologies de la reproduction [1], avec une première insémination chez le chien en 1784, suivie par des recherches pour son application chez les animaux de ferme au début du 20^e siècle. C'est durant ces années qu'apparaissent les premières études s'intéressant à la qualité des spermatozoïdes dans le tractus mâle et femelle, avec notamment des études sur la durée de la fertilité et de la mobilité des spermatozoïdes dans le tractus de la lapine [2]. Dans les années 50, il a été découvert que les modifications des spermatozoïdes qui leur permettent de féconder (processus appelé « capacitation ») sont acquises pendant quelques heures après leur dépôt dans l'oviducte de lapine [3]. Quelques années plus tard (1963), un milieu synthétique pour induire la capacitation *in vitro* a été défini, permettant la première fécondation *in vitro* (FIV) chez le hamster [3].

L'IA est également la technique la plus répandue et la plus simple des biotechnologies de la reproduction. Elle participe à la maîtrise de la reproduction et à l'amélioration de la génétique des animaux dans les élevages, grâce à la diffusion de la génétique de mâles provenant des entreprises de sélections porcines. Depuis quelques années, dans l'espèce porcine comme dans d'autres espèces, le but de la sélection n'est plus uniquement d'augmenter la production mais aussi de répondre à d'autres enjeux permettant d'assurer la durabilité des élevages de production [4]. En complément de l'IA, le transfert embryonnaire (surtout pratiqué dans l'espèce bovine), avec des embryons fécondés *in vivo* ou *in vitro*, permet de faire entrer des femelles de haute valeur génétique dans les élevages [5]

1.1. Prélèvement et conservation de la semence porcine

Au cours de 15 dernières années, la proportion d'accouplement par insémination artificielle a culminé à 90 % dans les élevages porcins des dix premiers pays producteurs de porc dans le monde, hormis la Chine (40 % d'IA/nombre total de reproductrices, données de 2018)[6]. Dans les centres d'insémination, les critères de sélection de la qualité de la semence sont relativement homogènes entre pays et consistent en une analyse de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes mesurées grâce à un analyseur automatisé de la trajectoire et de la forme des spermatozoïdes (Système CASA pour Computer Assisted Semen Analysis). Pour être utilisée, la semence doit avoir plus de 70 % de spermatozoïdes mobiles et moins de 20-30 % de formes anormales de spermatozoïdes juste après la collecte et dilution de la semence [6].

Le dépôt transcervical avec 70-100 mL de semence contenant entre 1.5 et 2.5 milliards de spermatozoïdes conservés plusieurs jours sous forme liquide à 17°C continue d'être la méthode d'insémination la plus courante. La semence peut être conservée de 1 à 3 jours dans des milieux de conservation « courte » et au-delà de 4 jours dans des milieux de conservation longue [7]. Après conservation de la semence, le critère seuil de mobilité pour décider d'inséminer est plus variable (50-70 % de spermatozoïdes mobiles).

Des bactéries, provenant principalement du tractus mâle, mais aussi de l'environnement lors de la collecte, sont présentes dans la semence et se multiplient au cours de la conservation, avec des effets négatifs sur la qualité des spermatozoïdes et la fertilité au-delà d'une certaine concentration en bactéries [8]. Ainsi des antibiotiques sont souvent ajoutés dans le dilueur mais cela pose des problèmes de rejet d'antibiotiques dans l'environnement et d'antibiorésistance [6]. Il a été montré que la fertilité, dans les conditions optimales, n'était pas affectée pour une semence conservée à 5 °C sans

antibiotiques (température basse pour limiter la prolifération bactérienne) [9], cependant des effets faibles et subtils dus au choc thermique sur la qualité de spermatozoïdes ont pu être détectés [8]. Cette sensibilité au froid aux spermatozoïdes de mammifères est attribuée en général à une composition lipidique membranaire caractérisée par une forte proportion d'acides gras insaturés [10]. Le verrat est ainsi particulièrement sensible au choc thermique car le ratio cholestérol : phospholipides de sa membrane plasmique est plus faible par rapport aux autres espèces [11-13].

1.2. Réussite de l'insémination

Dans les élevages porcins, les animaux sont conduits en bandes (1 bande = groupe d'animaux de mêmes poids, âges et stades physiologiques). Les inséminations sont réalisées sur des femelles reproductrices qui sont appelées cochettes quand elles n'ont jamais eu de gestation ou truies quand elles en ont eu une (truie primipare) ou plusieurs (truie multipare) gestations. L'efficacité de l'insémination se calcule avec la fertilité et la prolificité. La fertilité est le nombre de femelles qui effectuent une mise bas par rapport au nombre de femelles inséminées. La prolificité est le nombre de nouveau-nés à terme par portée.

En France, la fertilité moyenne à l'IA, 80-90 %, est assez stable mais la prolificité moyenne, de 15 porcelets nés, présente des fluctuations plus importantes (données YXIA en 2020, coopérative d'insémination porcine). Des données plus anciennes (2013) avaient montré une variation importante de la fertilité en fonction de l'élevage, allant de 76,6 % à 94,6 % [14]. Les bons résultats d'inséminations reposent sur un ensemble de bonnes conduites à respecter [15] pour atteindre le plateau optimum pour la fertilité et la prolificité [16].

Sur une campagne d'insémination avec de gros effectifs (2367 verrats, 15 lignées génétiques, 390000 IA), les résultats étaient de 87 % de fertilité et une prolificité de 13,5 porcelets nés totaux (données 2012, Pays-Bas) [17]. Dans cette étude, la part du verrat représentait seulement 6 % de la fertilité et prolificité totale avec des effets significatifs de la lignée génétique et des individus expliquant 50 % de cette variation [17]. Les mesures de trajectoires de spermatozoïdes avec le système CASA n'expliquent pas plus de 10% de cette variabilité [17].

Pour garantir cette bonne réussite de l'insémination, les spermatozoïdes doivent être inséminés au bon moment par rapport au moment de l'ovulation de la truie. De 15 à 30 ovocytes peuvent être ovulés au cours d'un cycle œstral et ce cycle est contrôlé par des processus endocriniens. L'évaluation de la durée des chaleurs, du moment de l'ovulation et de la relation entre le délai insémination-ovulation et la fertilité/prolificité a permis de préciser à quel moment devaient être faite les inséminations une fois que les chaleurs étaient détectées.

1.2.1. Le cycle œstral chez la truie

L'insémination doit être faite autour du moment de l'ovulation avec un nombre suffisant de spermatozoïdes de bonne qualité. Elle est réalisée pendant l'œstrus ou chaleurs, qui est la période au cours de laquelle la truie est réceptive au mâle et les ovocytes fécondables. L'œstrus se produit au cours du cycle œstral qui est sous le contrôle des hormones sécrétées par le cerveau (régions hypothalamiques et hypophysaires), les ovaires et l'utérus.

Le cycle œstral est une période de 18 à 24 j [18]. Il se caractérise par 2 phases distinctes, la phase folliculaire (4-6 j) et la phase lutéale (14-18 j). L'ovulation spontanée qui se produit entre ces deux phases est le jour 0 du cycle (figure 1).

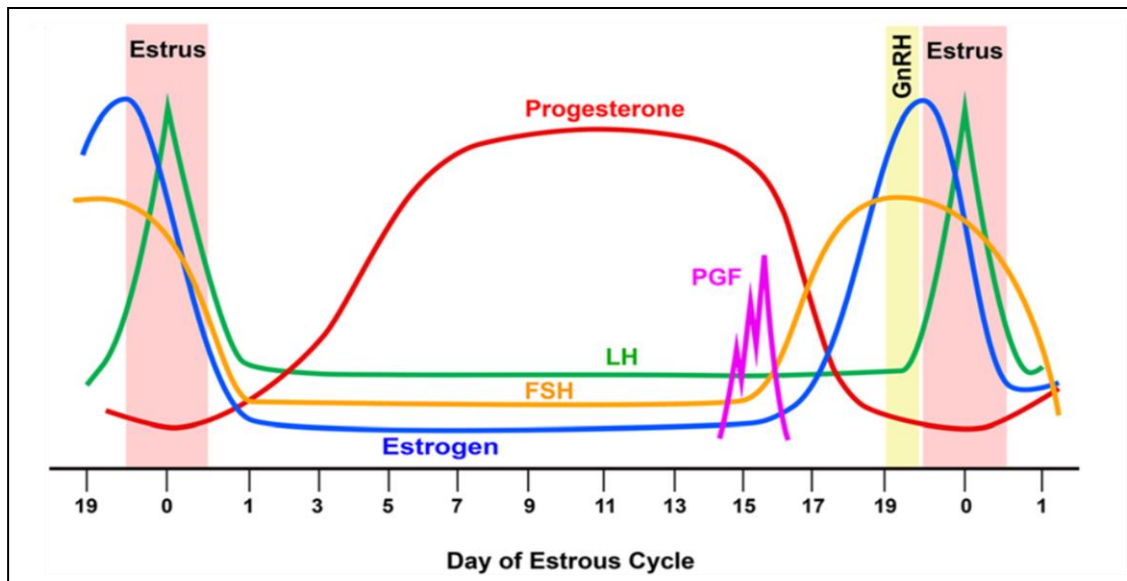


Figure 1 Profil des principales hormones dans le sang au cours du cycle œstral chez la truie
D'après [19]

Le début de la phase folliculaire dure environ 4 j et se caractérise par une élévation de l'expression d'une hormone hypothalamique, le GnRH (hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires) qui stimule la production des hormones hypophysaires FSH (hormone de stimulation folliculaire) et LH (hormone lutéinisante). Des follicules ovariens vont être recrutés et sélectionnés sous l'effet de la FSH et certains follicules vont devenir dominants et sécréter de l'œstradiol jusqu'à un seuil maximal qui produira une décharge de GnRH. Cela déclenchera une libération de LH, conduisant à l'ovulation, c'est-à-dire à la rupture des follicules dominants mesurant environ 8 mm, ainsi qu'à la libération des ovocytes sur une période de 3 à 5 heures [20, 21].

Au début de la phase lutéale, une baisse d'œstradiol induite par l'ovulation lève l'inhibition sur la FSH, qui augmente à 1 j et 2 j après l'ovulation. La cavité formée après l'ovulation va se remplir d'un exsudat séro-fibrineux et de sang formant le corps hémorragique. Celui-ci évolue en corps jaune suite à un fort remodelage tissulaire caractérisé par une angiogenèse importante et la transformation des cellules folliculaires en cellules lutéales [18, 22]. Le corps jaune sécrète progressivement de la progestérone dont la concentration atteint un maximum 8-9 jours après l'ovulation. La taille des corps jaune augmente de manière concomitante à la concentration de progestérone. Les 15-16^e jours après l'ovulation, si aucune implantation embryonnaire n'a eu lieu, des pulses d'ocytocine hypophysaire déclenchent des pulses de prostaglandine F2 α sécrétés par l'endomètre (épithélium de l'utérus) qui vont provoquer la lutéolyse (régression) des corps jaune, entraînant la chute de la concentration en progestérone dans les 24 h. Cette chute s'accompagne d'une augmentation de la concentration GnRH et de l'œstradiol plasmatique signant le début du cycle suivant [20].

1.2.2. Le moment de l'insémination

Le début des chaleurs peut être détecté grâce à un réflexe d'immobilité de la truie en présence d'un verrat. Ce réflexe est aussi évalué par une apposition des mains sur le dos de la truie (« back pressure ») en présence ou en absence (méthode moins sensible) d'un verrat. D'autres signes tels que la vulve rougie et gonflée et la sécrétion de mucus vaginal peuvent se manifester [15].

La bonne fenêtre d'insémination dépend de la durée des chaleurs des femelles. En effet, cette durée varie fortement entre femelles, de 24 à 96 heures [23] et le moment de l'ovulation se situe au cours du dernier tiers de cette période [23, 24] (voir figure 2). L'ovulation dure de 3 à 5 h [25] et la viabilité des ovocytes est d'environ 8 h [26]. L'idéal est de faire l'IA quelques heures avant l'ovulation (8 h) mais pas trop tôt car il a été montré une baisse de fertilité/prolificité pour des IA réalisées 24 h avant

ovulation [27]. Pour inséminer au bon moment, plusieurs inséminations sont souvent réalisées à partir de la détection des chaleurs des cochettes/truies, avec en moyenne 2,4 IA/truies [6]. Plusieurs schémas d'IA peuvent être appliqués, tel que des IA à 12 et 24 h après la détection des chaleurs ou toutes les 24 h à partir de la détection [15, 28].

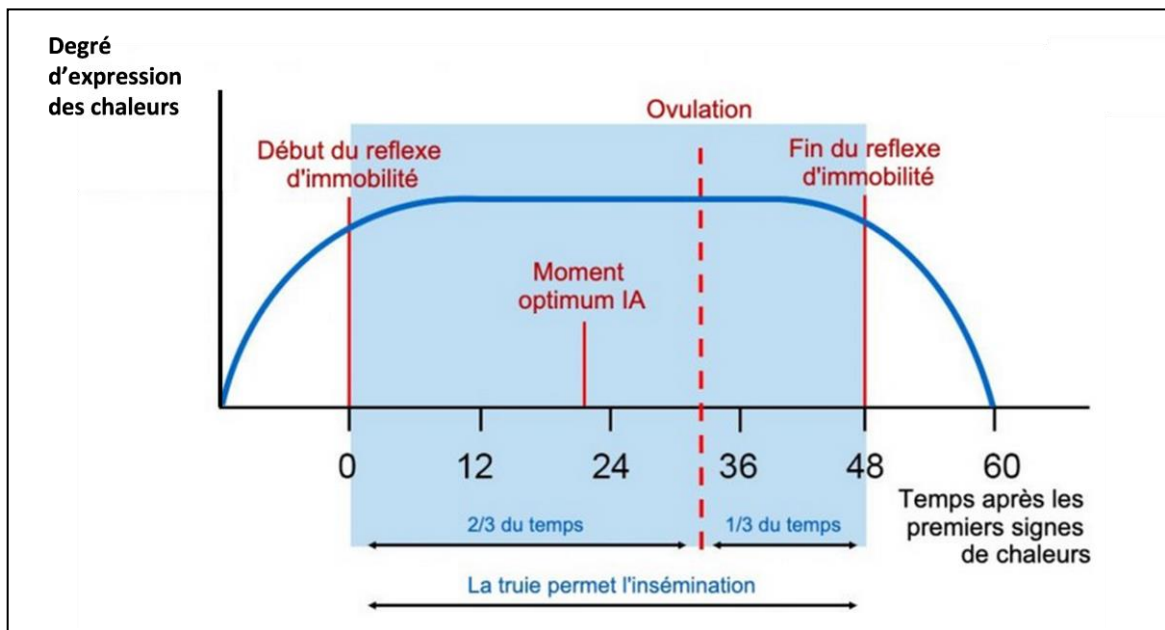


Figure 2 Représentation du moment optimal de l'IA

Représentation du réflexe d'immobilité, de l'ovulation et du moment optimal de l'IA chez la truie avec un œstrus de 60h. Source [29].

1.3. Traits compensables et nombre de spermatozoïdes à l'insémination

Pour que l'embryon se développe, le spermatozoïde doit tout d'abord être capable de rejoindre l'ovocyte et de le féconder. La fertilité après insémination est dépendante du nombre de spermatozoïdes et du volume de la dose d'insémination. Un nombre de 1 milliard de spermatozoïdes [30] et un volume de 20 mL semblent les valeurs minimums pour une fertilité correcte [31]. Par ailleurs, une relation asymptotique entre le nombre de spermatozoïdes inséminés et la prolificité a été mise en évidence [32]. Le nombre minimum de spermatozoïdes nécessaires pour atteindre le plateau de l'asymptote (fertilité maximale) est spécifique pour chaque verrat. Jusqu'à un certain seuil, la fertilité/prolificité peut donc être améliorée en augmentant le nombre de spermatozoïdes [33]. Les dysfonctions des spermatozoïdes pouvant être améliorées par des quantités additionnelles de spermatozoïdes sont appelées traits « compensables ». Ils correspondent aux événements reliés au transit des spermatozoïdes et à la fécondation, comme la mobilité et d'autres fonctions plus ou moins bien connues (la régulation du volume spermatique, la liaison aux cellules de l'oviducte, la capacitation et l'interaction avec l'ovocyte), qui ne sont pas évalués par les méthodes conventionnelles. Ainsi, la proportion de spermatozoïdes dans un éjaculat qui présentent ses propriétés pleinement fonctionnelles va définir la fertilité mâle [34].

Cette relation dose-réponse entre la quantité de spermatozoïdes inséminés et le pourcentage de fertilité, pour deux temps de conservation des spermatozoïdes en milieu liquide, est illustrée dans la figure 3.

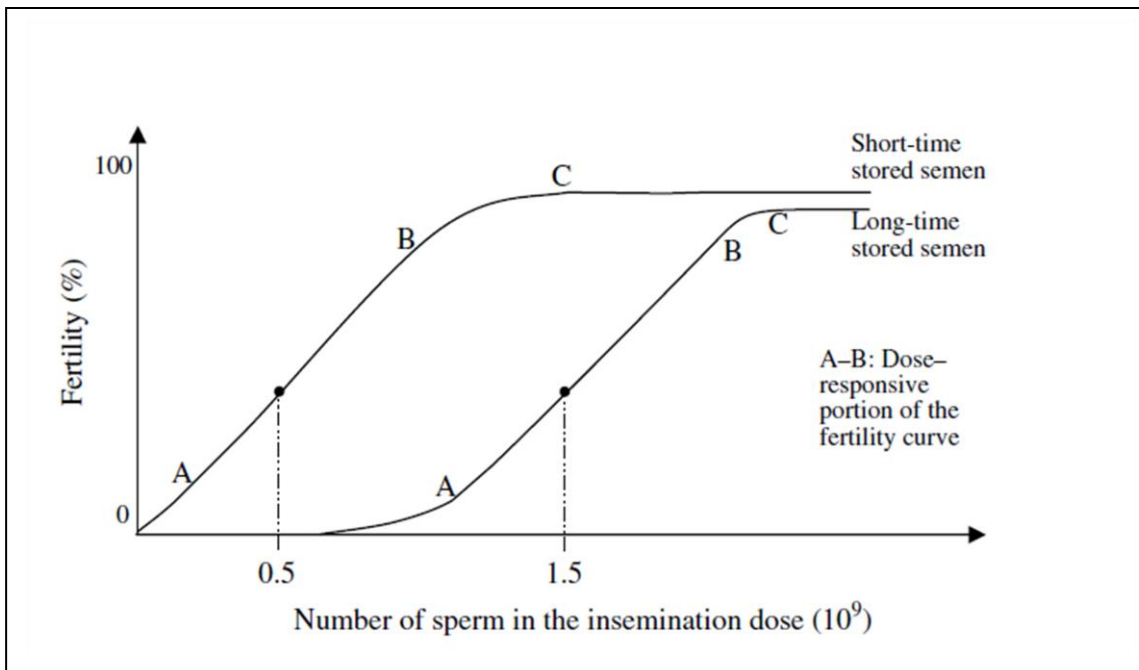


Figure 3 Modèle de la courbe dose-réponse du pourcentage de fertilité en fonction du nombre de spermatozoïdes

Le point C représente la quantité minimale de spermatozoïdes pour laquelle la fertilité est maximale. Au-delà, le plateau de fertilité est atteint. Entre les points A et B, la partie dose-réponse du modèle, l'augmentation du nombre de spermatozoïdes dans la dose se traduit par une augmentation de la fertilité. Si c'est un effet « compensable », un traitement qui impacterait la fertilité pourrait être masqué en augmentant suffisamment la quantité de spermatozoïdes par dose. Les courbes dose-réponse sont présentées pour une durée de conservation courte (1j) et longue (4-5 j). D'après [35]

Les traits dits « non compensables » ne pourront pas être améliorés par une augmentation du nombre de spermatozoïdes et ils concernent les échecs de fertilité qui se déroulent après la liaison des spermatozoïdes aux ovocytes et sont liés à la contribution des spermatozoïdes au potentiel de développement de l'embryon [36, 37].

1.4. Diagnostic de la fertilité des verrats

Dans les centres d'IA, le diagnostic de la fertilité/prolificité des verrats est difficile pour plusieurs raisons : les limitations de l'évaluation CASA et l'utilisation de plusieurs verrats pour constituer les dose d'IA.

L'outil CASA, bien qu'il soit indispensable pour éliminer les mauvais reproducteurs, ne permet pas de rendre compte des différences de fertilité et de prolificité qui existent entre verrats ni de détecter les verrats hypofertiles. En effet, une faible proportion de verrats se révèlent hypofertiles malgré des critères de mobilité spermatique satisfaisants (1 %, source YXIA ; 5-7 %, centre IA Espagne [38]). Cet outil est presque exclusivement utilisé alors qu'il n'explique finalement que 0,6% de la fertilité totale [39]. Hormis les facteurs extrinsèques aux spermatozoïdes qui comptent beaucoup dans la fertilité (effets femelles, élevages, lignées, management, environnement...), il reste d'autres facteurs intrinsèques aux spermatozoïdes qui ne sont pas mesurés [40] et qui restent à identifier [41]. En complément du CASA, d'autres tests de diagnostic de la fertilité dits fonctionnels (réponse à la capacitation, intégrité membranaire, thermorésistance...) et moléculaires (molécules indicatrices de la fertilité dans le plasma séminal et les spermatozoïdes) ont été développés [40, 42-44].

De plus, la dose de semence destinée à l'insémination est souvent préparée en mélange de plusieurs éjaculats de verrats (3 à 5 verrats, source YXIA). Si cette pratique permet de réduire les différences de

fertilité entre mâles [45], elle empêche d'avoir les informations de la fertilité/prolificité individuelle des verrats, car des tests de paternité sur les porcelets ne sont pas réalisés en routine. Les doses constituées d'un mélange de plusieurs verrats sont appelées doses hétérospermiques et les doses constituées d'un seul éjaculat de verrat sont appelées doses homospermiques.

L'impossibilité de bien évaluer la fertilité/prolificité des verrats oblige la filière à faire des IA en doses hétérospermiques avec un nombre important, de 1,5 à 3 milliards, de spermatozoïdes mobiles et de formes normales (évalués au CASA) pour atteindre de bons résultats. Pourtant la réduction du nombre de spermatozoïdes par dose permettrait de produire plus de doses et d'accélérer le progrès génétique, tout en réduisant le nombre de mâles nécessaires aux inséminations [36]. Si l'on compare avec l'IA chez les bovins (insémination avec 20 millions de spermatozoïdes en paillettes congelées), 600 vaches peuvent être inséminées avec un éjaculat de taureau contre seulement une vingtaine de truies avec un éjaculat de verrat [38]. Ainsi, un des challenges de l'IA serait de réduire le nombre de spermatozoïdes par dose sans perte de fertilité/prolificité [6]. La réduction du nombre d'IA par femelle, avec des spermatozoïdes qui se conserveraient plus longtemps dans le tractus ou une réduction de la variabilité femelle, aurait aussi un impact bénéfique sur le plan écologique (réduction du matériel plastique jetable pour l'insémination, réduction du rejet des antibiotiques de la semence).

Cette réduction du nombre de spermatozoïdes est tout de même possible grâce à l'optimisation des cathéters d'insémination utilisés : en effet, lorsque l'insémination est réalisée plus profondément dans le tractus, ceci permet de réduire le nombre de spermatozoïdes/dose et le volume des doses en évitant une partie plus ou moins longue de l'utérus [46]. L'insémination intra-cervicale permet de déposer avec un cathéter dans le milieu du cervix entre 1.5 et 3 milliards de spermatozoïdes dans un volume de 70-100 mL. L'insémination intra-utérine ou post-cervicale permet de déposer, grâce à une canule interne traversant l'intérieur du cathéter d'insémination, 1 à 2 milliards de spermatozoïdes à l'entrée des cornes utérines dans 40-50mL [46]. Classiquement réalisée en intra-cervical, l'insémination dans les élevages commerciaux évolue vers une insémination dans le corps utérin, voire dans la corne utérine (insémination utérine profonde), permettant de réduire d'un facteur 30 la quantité de spermatozoïdes nécessaire [47]. Cependant, l'insémination utérine est peu utilisée chez les cochettes (20 %) à cause de la structure et de la morphologie du cervix de la cochette qui rend difficile l'insertion correcte du cathéter [48]. Cependant, l'insémination utérine profonde se réalise avec un endoscope à fibre optique couteux et fragile qui n'est pas utilisable sur le terrain [49].

2. La migration des spermatozoïdes dans les voies génitales de la truie

2.1. Anatomie du tractus femelle de la cochette/truie

L'appareil génital de la cochette/truie comprend les voies génitales à savoir la vulve, le vagin, le cervix, l'utérus (constitué du corps utérin et des deux cornes utérines) et les oviductes et deux ovaires ([figure 4](#), à gauche). Les mesures précisées ci-dessous ont été obtenues au laboratoire chez des cochettes Large White.

L'orientation du tractus est indiquée [figure 4](#) avec la direction vers le vagin = côté caudal et la direction vers les ovaires =côté crânial.

Le vagin mesure une vingtaine de centimètres et il débouche sur le cervix ou col de l'utérus (15 cm). Le cervix précède l'utérus, l'organe de la gestation, constitué du corps utérin (5 cm) qui se prolonge par deux cornes utérines longues et repliées (120 cm quand elles sont dépliées). La jonction utéro-tubaire, visible chez la cochette et la truie par un rétrécissement du diamètre de la lumière, relie l'extrémité crâniale de la corne utérine à l'oviducte. L'oviducte (26 cm) peut être séparé en 3 parties : 1) l'isthme qui relie la jonction utéro-tubaire à 2) l'ampoule, le lieu de la fécondation et qui se prolonge par 3) l'infundibulum qui entoure l'ovaire et capte les ovocytes [50, 51] ([figure 4](#) à droite).

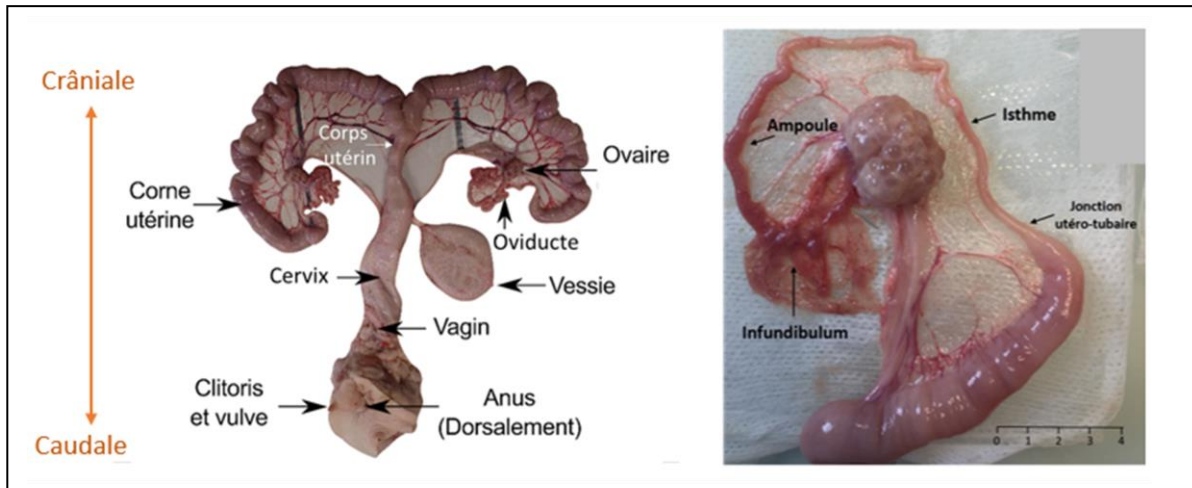


Figure 4 Photo légendée du tractus et de l'oviducte de cochette

A gauche, photo du tractus de cochette (source : Hervé Kempf, lycée de l'Elorn). A droite, photo de l'oviducte (source Karine Reynaud, équipe Interactions Cellulaires et Fertilité).

2.2. Barrières physiologiques du tractus femelle

Le processus de sélection des spermatozoïdes dans le tractus femelle est complexe et implique une perte importante de spermatozoïdes à travers les barrières physiologiques du tractus femelle qui sont le cervix et/ou la jonction utéro-tubaire (JUT) [52]. Les espèces ont été classées en deux groupes, selon le rôle de barrière du cervix. Pour la truie et la jument, le volume, la pression et le temps d'émission de l'éjaculat (> 10 min chez le verrat) entraînent un dépôt des spermatozoïdes après le cervix, dans l'utérus [53, 54]. Chez certains rongeurs (souris, rat, hamster) et la chienne, le passage du cervix semble relativement rapide [55-57]. En revanche chez la brebis, la chèvre, la vache et la femme, le cervix joue un rôle important de sélection des spermatozoïdes, de par sa structure complexe (surtout chez la brebis et la chèvre) et par la production d'un mucus visqueux, dont l'hydratation et la pénétrabilité sont régulées par les hormones stéroïdes ovariennes [55, 58-60]. Chez la vache, le passage complet du cervix lors de l'insémination a permis de réduire drastiquement le nombre de spermatozoïdes inséminés et offre la possibilité d'utiliser de la semence sexée avec succès [61].

2.3. Contractions utérines et mobilité des spermatozoïdes

Après une IA avec 1,5-3 milliards de spermatozoïdes déposés dans l'utérus [62], environ 100 000 (soit 3 à 7%) sont retrouvés dans la JUT et quelques centaines dans l'oviducte [63, 64]. Si cette sélection permet probablement d'éviter la polyspermie (pénétration de plusieurs spermatozoïdes dans l'ovocyte pouvant conduire à une infertilité), le tractus femelle doit néanmoins assurer le transport d'un nombre suffisant de spermatozoïdes jusqu'aux ovocytes [65, 66]. Il semblerait que ce nombre élevé de spermatozoïdes dans l'éjaculat permette à un nombre suffisant de spermatozoïdes d'atteindre la jonction utéro-tubaire afin qu'ils entrent dans l'isthme de l'oviducte [67].

La mobilité des spermatozoïdes et les contractions utérines sont impliquées dans la migration des spermatozoïdes jusqu'à l'oviducte. Le transport des spermatozoïdes dans l'utérus est considéré comme passif [62] alors que leur mobilité semble importante pour passer la jonction utéro-tubaire et pour leur progression dans l'oviducte [68].

2.3.1. Migration dans les cornes utérines

Le rôle des contractions utérines dans la remontée des spermatozoïdes a pu être établi par de nombreux travaux. Chez la brebis en œstrus, sous anesthésie, les spermatozoïdes même morts

déposés dans le corps utérin par laparotomie vont migrer depuis le corps utérin jusqu'en haut des cornes utérines et cette remontée est beaucoup plus faible en phase lutéale [69]. Ces expérimentations suggèrent un rôle des contractions utérines pendant l'œstrus pour que les spermatozoïdes remontent. Chez le porc, les spermatozoïdes peuvent atteindre les oviductes en 15 min et cette rapidité ne peut pas être expliquée par leur seule mobilité [62, 70].

Les contractions utérines vont varier au cours du cycle œstral, essentiellement sous la dépendance des taux plasmatiques et tissulaires d'œstrogènes et de progestérone. Les œstrogènes augmentent les contractions en stimulant les cellules musculaires lisses du myomètre et la progestérone les inhibe [62, 71, 72]. Faibles avant l'œstrus, la fréquence et l'amplitude des contractions augmentent pendant l'œstrus puis diminuent à nouveau en phase lutéale [62].

Les contractions peuvent également être affectées par l'accouplement [62]. Elles sont très variables entre femelles et même les truies ayant une faible activité utérine peuvent être stimulées par la présence d'un mâle au moment de l'IA [62]. Des œstrogènes apportés par les spermatozoïdes (liés à leur surface) et par le plasma séminal vont aussi augmenter les contractions en induisant le relargage de la prostaglandine F_{2α} [73]. Chez la femme, des billes placées à l'entrée du cervix sont transportées passivement par les contractions utérines jusqu'à l'isthme de l'oviducte, dans la minute après leur dépôt et avec une efficacité supérieure de transport à l'approche de l'ovulation [74]. Des traceurs radioactifs sont aussi retrouvés dans les oviductes de truies dans les cinq minutes après l'IA [75]. Plusieurs travaux des années 50-70, qui s'intéressaient au temps minimum requis pour que les spermatozoïdes atteignent le site de fécondation, ont décrit un transport très rapide (5-30 min) des spermatozoïdes chez la lapine et la brebis. Cependant, plusieurs autres études chez la brebis n'ont pas retrouvé ce résultat [76, 77]. Plus tard, Hunter *et al* ont établi qu'un temps 1-2 h pour la truie et 6-8 h pour la vache et la brebis était requis après l'insémination pour l'établissement d'une population fonctionnelle de spermatozoïdes capable de féconder tous les ovocytes dans l'oviducte [78].

L'origine et la direction des contractions sont plus difficiles à déterminer. Chez la truie, elles pourraient débiter aux deux extrémités de la corne utérine avec des directions cervico-tubaire (cervix vers oviducte) ou tubo-cervicale (oviducte vers cervix) ou les deux. Une étude des contractions par électromyographie n'a révélé aucune différence au niveau de l'orientation de ces contractions, tubo-cervicales et cervico-tubaires, entre œstrus et début de la phase lutéale [79]. Chez la vache et la brebis, la direction des contractions a été mesurée comme allant vers l'oviducte au moment de l'œstrus et dans le sens inverse à la fin de l'œstrus [71]. Il a été observé des fécondations bilatérales alors que les spermatozoïdes avaient été inséminés dans une seule corne utérine. Bien que ces fécondations puissent être dues à une migration trans-utérine des spermatozoïdes, des fécondations avec une migration trans-péritonéale ont aussi été décrites [80].

Chez la truie, le nombre de spermatozoïdes dans les cornes utérines va décroître dans le temps (15 min à 24 h après IA) [81-83] ainsi que leur mobilité, à partir de 2 h après IA [70, 81]. Les spermatozoïdes vont se diriger vers l'oviducte ou être éliminés vers le vagin assez rapidement mais il existe des différences évidentes de cinétique chez les espèces étudiées [84]. Un reflux des spermatozoïdes vers le cervix et le vagin, dû aux contractions utérines, a été observé chez la vache et la truie. Chez la vache, ce reflux est important et correspond à au moins 75 % du nombre de spermatozoïdes pour des IA intra-utérines réalisées avec 420 millions de spermatozoïdes [85]. Cependant chez la vache, ce reflux n'a pas été mesuré après une insémination avec 20 millions de spermatozoïdes (nombre qui est inséminé actuellement) mais il a été supposé qu'un nombre important de spermatozoïdes seraient aussi évacués vers l'extérieur dans cette condition [71]. Un transport rapide des spermatozoïdes vers la JUT et leur élimination dans la direction opposée par le vagin a été décrit dans l'heure après IA [86]. Chez la truie, ce flux rétrograde a été mesuré en récupérant les spermatozoïdes qui sortent du tractus

pendant et après l'insémination (jusqu'à 2,5 h après IA). La concentration en spermatozoïdes et le volume de ce reflux décroît avec le temps, il est fortement variable entre truies et représente en moyenne 45 % du volume et 45 % des spermatozoïdes de la dose inséminée (moyennes respectivement de 3 et 2 études) [87].

Ce reflux peut varier en fonction du lieu de dépôt (insémination cervicale ou post-cervicale), du volume et du nombre de spermatozoïdes inséminés [88]. Cependant, dans une autre étude, il ne varie pas entre une insémination cervicale et post-cervicale profonde [89]. Quand le reflux est important, un effet négatif sur les résultats de fécondation (% embryons normaux/embryons totaux) a été montré après une IA avec 1 milliard de spermatozoïdes mais il est sans effet après des IA avec 3 et 6 milliards de spermatozoïdes [90].

Toujours chez la truie, l'impact des contractions utérines sur la fécondation a été évalué en les diminuant artificiellement avec le composé beta agoniste clenbuterol, ou en les augmentant, avec la PG2 α synthétique cloprosténol. Cette diminution entraîne un nombre plus élevé de spermatozoïdes dans les cornes utérines crâiales (20 cm côté JUT) et la JUT par rapport au contrôle (solution saline). Au contraire, leur augmentation entraîne une diminution du nombre des spermatozoïdes dans ces mêmes régions. La même tendance (non significative) est observée dans les oviductes. Cependant, si les nombres de spermatozoïdes sont exprimés par rapport à la corne utérine crâniale, la diminution des contractions réduit le nombre de spermatozoïdes dans la JUT et les oviductes par rapport au contrôle et au cloprosténol. Le reflux spermatique a aussi été mesuré et il est plus important quand les contractions sont augmentées. Les auteurs ont montré que les deux traitements clenbuterol et cloprosténol réduisaient le taux de fécondation (avec des conditions d'IA choisies pour atteindre un taux de fécondation intermédiaire). Les conclusions de cette étude soulignent que peu de temps après l'IA, des contractions minimums semblent nécessaires pour transporter rapidement les spermatozoïdes vers l'extrémité de la corne utérine et dans le cas contraire, la capacité des spermatozoïdes à passer dans la JUT et l'oviducte et à féconder serait affectée. Au-delà d'un certain niveau, la forte intensité des contractions utérines va augmenter le reflux des spermatozoïdes, ce qui va diminuer leur nombre dans l'extrémité de la corne utérine [91].

Si les contractions utérines contribuent fortement aux mouvements des spermatozoïdes dans les cornes utérines, la mobilité ainsi que d'autres caractéristiques spermatiques semblent aussi jouer un rôle dans la sélection des spermatozoïdes. D'après les résultats de l'étude de Hernandez-Caravaca *et al*, la mobilité initiale des spermatozoïdes ne semble pas influencer la proportion de femelles refluant les spermatozoïdes, ni le nombre et le volume de spermatozoïdes reflusés [92]. Cependant, les spermatozoïdes peu mobiles sont spécifiquement plus reflusés à partir de 15 minutes après le début du reflux [92]. Chez la cochette, en comparant le nombre de spermatozoïdes vivants et morts dans l'utérus 45 min et 8 h après IA, les auteurs ont compté une proportion de spermatozoïdes vivants plus importante dans la partie crâniale de la corne utérine (côté oviducte) que dans la partie caudale (côté cervix) [93]. Il semblerait donc y avoir une sélection des spermatozoïdes mobiles au cours de leur migration dans les cornes utérines. De plus, une augmentation du nombre de spermatozoïdes morphologiquement normaux dans la JUT et anormaux dans le reflux a été observée après IA par rapport aux morphologies initiales dans la dose [94].

Chez la brebis anesthésiée, un gradient de concentration croissant des spermatozoïdes, du bas de la corne utérine vers le haut de corne, a été quantifié *in vivo* par microscopie confocale fibrée 4 h après IA intra-utérine [95]. Un reflux des spermatozoïdes vers le cervix a été suggéré, au vu du faible nombre de spermatozoïdes retrouvés sur le lieu de dépôt.

2.3.2. Interactions des spermatozoïdes dans l'utérus

Chez la truie, 3 à 4 heures après insémination, des cellules leucocytaires colonisent la lumière utérine sous l'effet des constituants de la dose d'insémination (spermatozoïdes, plasma séminal et dilueur) [96]. Il en résulte une diminution importante du nombre de spermatozoïdes par phagocytose, qui s'ajoute à ceux déjà éliminés par le reflux [97]. En particulier, il est observé un influx massif de polynucléaires neutrophiles qui piègent les spermatozoïdes, y compris les vivants et mobiles, par un processus de nérose (NETs *Neutrophil extracellular traps*) [54, 98, 99]. Le transport rapide des spermatozoïdes à proximité de la JUT, avant l'influx massif de polynucléaires neutrophiles, pourrait contribuer à améliorer les taux de fécondation [84].

Le faible nombre de spermatozoïdes dans les oviductes par rapport à l'utérus font de la jonction utéro-tubaire la zone de sélection du tractus mais il a été émise l'hypothèse d'un rôle de l'utérus dans le stockage et la sélection des spermatozoïdes [100]. Les spermatozoïdes mobiles ont tendance à nager le long de la paroi interne du tractus, qui est constituée de nombreux replis primaires et secondaires, surtout au niveau du cervix, de la JUT et de l'oviducte [101-103]. Dans l'utérus, les spermatozoïdes semblent pouvoir glisser sur la couche de mucus de la surface de l'endomètre [84]. Il a été montré que les spermatozoïdes étaient retenus au niveau des glandes utérines [84] de l'endomètre (figure 5C et 5D ci-dessous) et que ces interactions avec les cellules épithéliales déclenchaient la réponse immunitaire [104]. Cette liaison s'effectue préférentiellement avec des spermatozoïdes viables, normaux et présentant un haut potentiel mitochondrial alors que ceux étant dans la lumière utérine sont anormaux [96, 105, 106]. La liaison est médiée par l'interaction entre des résidus sucrés à la surface du spermatozoïde (N-Acetylglucosamine/acide sialique et N-Acetylglucosamine) et les lectines des cellules épithéliales utérines [87]. Il a été proposé que la sialidase libérée par le fluide folliculaire au moment de l'ovulation rejoigne l'utérus et régule cette interaction [59]. Chez l'humain et la souris, des travaux indiquent que les interactions entre les acides sialiques du glycocalix spermatiques et les Siglec (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin) présents sur les cellules endométriales pourraient faciliter la survie des spermatozoïdes face à l'immunité femelle [107].

Les spermatozoïdes vont aussi interagir avec le fluide utérin au cours de leur migration, mais les études menées sont peu nombreuses et exclusivement *in vitro*. Chez le porc, des spermatozoïdes epididymaires et des spermatozoïdes éjaculés puis lavés présentent une diminution de la mobilité totale et progressive, de la viabilité et une augmentation de la réaction acrosomique après 2 h d'incubation dans 20% de fluide utérin, par rapport au contrôle. La présence de 20 % de plasma séminal a permis de réduire ces effets négatifs [108]. Cependant, chez l'humain, l'incubation de spermatozoïdes (sans plasma séminal car préparés par la méthode Swim-up) dans des rinçages utérins n'a pas affecté leur viabilité [109].

Des protéines de liaison aux spermatozoïdes ont pu être identifiées dans le fluide utérin. SPAM1, une hyaluronidase présente sur les spermatozoïdes testiculaires chez la souris, est sécrétée dans le fluide épидидymaire et son absorption par les spermatozoïdes au cours de maturation épидидymaire augmente leur pénétration dans le cumulus de l'ovocyte. Elle est aussi sécrétée dans le fluide utérin et oviductal. Après incubation des spermatozoïdes dans du fluide utérin, leur capacité à se lier à l'acide hyaluronique et à disperser le cumulus est réduite en présence d'un anticorps anti-SPAM1. Les auteurs ont suggéré que cette absorption progressive de SPAM1 par les spermatozoïdes, au cours de la maturation épидидymaire puis du transit dans l'utérus et l'oviducte, aboutit à un niveau adéquat de SPAM1 au moment où les spermatozoïdes arrivent dans l'ampoule, lieu de la fécondation [110].

Chez l'humain, CST3, un inhibiteur de protéase identifié dans le plasma séminal et le fluide de l'utérus, a un rôle *in vitro* de facteur décapacitant (voir la définition au chapitre I.2.5.1), ce qui suggère un rôle

de stabilisation de la membrane du spermatozoïde par une protéine exprimée dans le tractus mâle et femelle [111].

2.3.3. Migration dans la jonction utéro-tubaire

Pour étudier le rôle de la mobilité des spermatozoïdes dans leur progression à travers la JUT, des inséminations avec des spermatozoïdes vivants ou morts ont été réalisées chez la truie. Dans l'étude de First *et al*, aucune différence significative entre le nombre de spermatozoïdes vivants et morts n'a été trouvée dans les oviductes 30 min après IA [81]. Cependant, Baker *et al* ont montré un enrichissement en spermatozoïdes vivants dans les oviductes 8 h après IA [93]. L'étude de Viring *et al* a montré une plus grande proportion de spermatozoïdes vivants dans l'oviducte, pour les 4 régions qu'il avait définies (2 pour l'isthme, 2 pour l'ampoule) à tous les temps testés après IA (1, 2, 6 et 12 h) [82]. Collectivement, ces résultats suggèrent que la mobilité est importante pour le passage de la JUT mais que les spermatozoïdes non mobiles peuvent aussi la traverser, au moins chez la truie. Chez la brebis anesthésiée, les spermatozoïdes morts déposés au bout de la corne utérine ne franchissent pas la jonction utéro-tubaire [69].

Ce passage de la JUT peut être observé directement *ex vivo* chez les rongeurs par transillumination car l'oviducte est transparent. Dans ces modèles, les spermatozoïdes ayant subi la capacitation avec un mouvement hyperactif passent moins bien la JUT que les spermatozoïdes contrôles avec un mouvement plus linéaire [112]. De plus, les spermatozoïdes non mobiles (de même qu'une solution colorée) ne la franchissent pas du tout [113]. La totalité des spermatozoïdes ayant franchi la JUT ont un acrosome intact par rapport à 75 % des spermatozoïdes avant insémination [114]. Chez la souris transgénique avec un acrosome et des mitochondries fluorescentes, un regroupement de spermatozoïdes au niveau des glandes utérines et de la JUT a pu être observé après accouplement. La formation de ces clusters ou amas est liée à la concentration en spermatozoïdes. En effet, la réduction de la concentration à un niveau de 50 % du contrôle réduit la taille des amas dans la JUT et le taux de fécondation. De plus, dans le cas d'une réduction plus forte équivalent à 6-18 % du contrôle, les spermatozoïdes qui atteignent quand même la JUT forment pas ou peu d'amas et ne passent pas dans l'oviducte. Partis d'autres études et des données d'accouplement obtenues dans cette étude, les auteurs suggèrent que le nombre minimal de spermatozoïdes correspondant à 20 % du nombre initial de spermatozoïdes constitue un seuil de fécondité chez la souris [115]. L'hypothèse qui a été donnée par les auteurs de l'article est que ce groupement de spermatozoïdes pourrait générer une force accrue (interaction spz/spz + synchronisation du battement de flagelle) qui permettrait à ces spermatozoïdes de rentrer dans l'oviducte, notamment car leur progression pourrait être freinée par des sécrétions visqueuses s'écoulant de l'oviducte vers la JUT.

De plus, l'invalidation de 15 gènes codant pour des protéines spermatiques, dont ADAM3 (sperm membrane protein A disintegrin and metallopeptidase domain 3), a permis de mettre en évidence une infertilité de ces souris mutante à cause d'un blocage du passage des spermatozoïdes à travers la JUT. Les spermatozoïdes de ces souris mutantes présentaient une mobilité et une morphologie normales. Pour 11 de ces gènes knockout, un lien avec ADAM3 a été constaté, car ces knockout entraînaient tous une disparition ou une mauvaise localisation (pour 1KO) de ADAM3 à la surface des spermatozoïdes, faisant de cette protéine un acteur important pour le passage de la JUT par les spermatozoïdes. Les 3 autres KO de gène n'étant pas liés à ADAM3 impliquent qu'un autre mécanisme que celui aboutissant à la distribution correcte d'ADAM3 est mis en jeu pour le passage de la JUT [104].

La physiologie de la JUT explique en partie la faible progression des spermatozoïdes peu mobiles. Dans l'espèce porcine, cette région, avec celle de l'isthme caudal de l'oviducte, est considérée comme le réservoir des spermatozoïdes (région où les spermatozoïdes se fixent dans l'attente de l'ovulation) (figure 5A et 5B ci-dessous) [116].

Elle est caractérisée par une lumière étroite, de nombreux replis muqueux plus ou moins complexes selon les espèces, avec peut-être l'existence d'un mécanisme s'apparentant à un sphincter dont le diamètre s'ouvrirait plus ou moins. De plus, la présence d'un mucus visqueux dans la lumière de la JUT, mais également dans l'isthme caudal, pourrait gêner la progression des spermatozoïdes [55, 117]. Un mouvement péristaltique, qui peut aussi participer à la progression des spermatozoïdes, a été décrit au niveau de la JUT [118]. Chez l'humain, des changements de concentration en œstrogènes et progestérone induisent respectivement des spasmes ou un relâchement musculaire de la jonction utéro-tubaire [119]. Une étude chez le porc avait pu observer plus de spermatozoïdes endommagés dans la lumière de la JUT par rapport au fond des replis [105]. Il est possible que les spermatozoïdes mobiles progressent mieux dans ces zones profondes par rapport au centre de la lumière, comme cela a été suggéré dans le cas de la traversée du cervix [101].

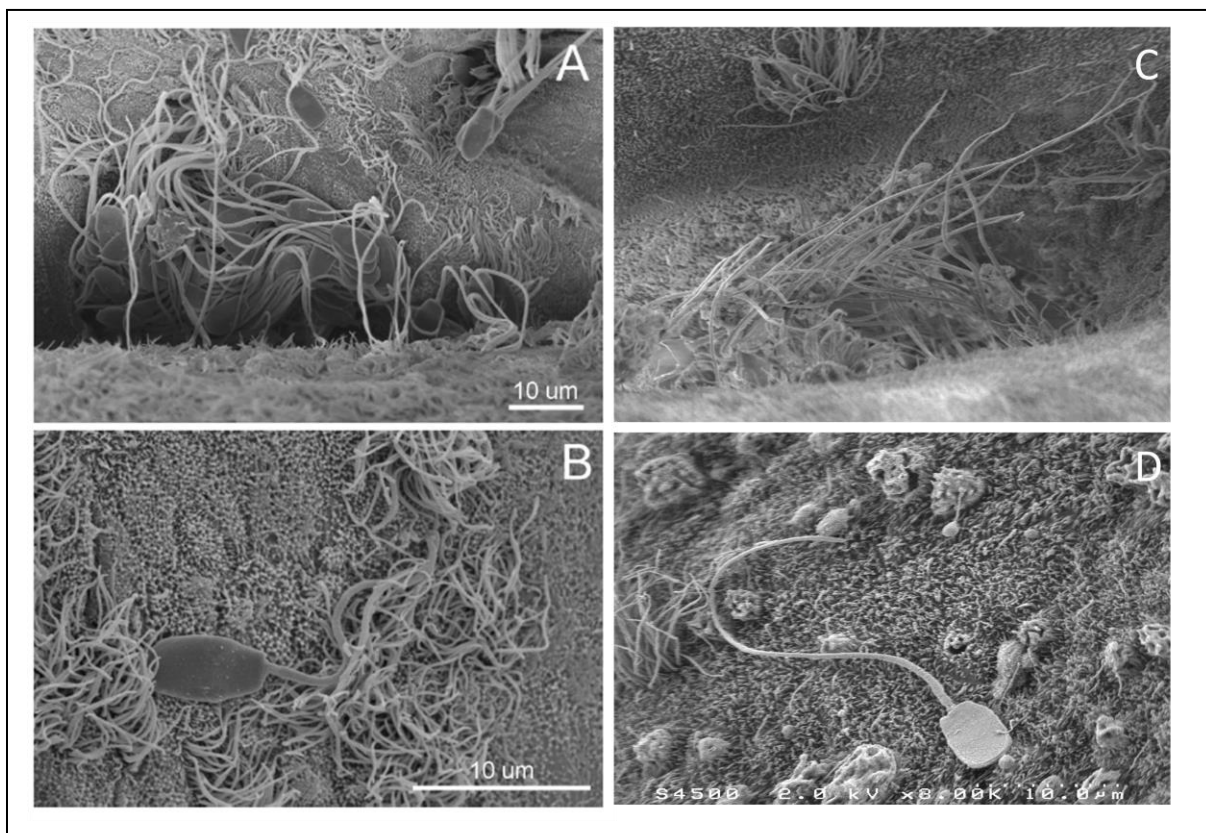


Figure 5 Image de microscopie électronique à balayage des spermatozoïdes dans la JUT et l'utérus chez la truie. Spermatozoïdes dans les replis de la JUT (A) et de l'utérus (C) et sur les microvillosités/cils de la JUT (B) et de l'utérus (D) chez le porc. D'après [116] et Karine Reynaud et Thierry Meylheuc (équipe Interactions Cellulaires et Fertilité et plateforme PROPHYLE)

2.4. Migration et interaction des spermatozoïdes dans l'oviducte

Comme décrit précédemment, il a été montré qu'un nombre suffisant de spermatozoïdes aptes à féconder est présent dans l'oviducte dans les 1 à 2 h après accouplement chez la truie et 6 à 8 h chez le bovin et l'ovine [78]. Après avoir traversé la JUT, les spermatozoïdes arrivent au niveau du début de l'isthme de l'oviducte (isthme caudal) et ils ont la capacité de se fixer aux cellules de cette région appelée le réservoir spermatique. Ensuite, ils pourront se détacher et aller féconder le/les ovocytes dans la région de l'ampoule dans l'oviducte [120]. C'est donc pendant leur transit dans l'oviducte que les spermatozoïdes vont accomplir la fécondation. Pour cela, ils doivent avoir acquis leur pouvoir fécondant et subir deux processus importants que sont la capacitation et l'hyperactivation. Le pouvoir

fécondant des spermatozoïdes, notamment la capacité à se lier à l'ovocyte, s'acquiert dans l'épididyme. Ainsi les modifications de la surface du spermatozoïde qui s'opèrent de l'épididyme jusqu'au lieu de fécondation sont susceptibles de moduler son pouvoir fécondant et sont à considérer dans le mécanisme global de la fertilité mâle.

2.4.1. Capacitation et hyperactivation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes épидидymaires stockés dans la partie caudale de l'épididyme sont fertiles, car c'est au cours de leur transit dans l'épididyme qu'ils acquièrent leur mobilité et leur pouvoir fécondant (cf. [chapitre 1.3.2](#)), avec notamment l'adsorption de protéines impliquées dans la liaison avec la zone pellucide de l'ovocyte et des facteurs qui stabilisent leur membrane plasmique. Une forte adsorption de glycoprotéines séminales sur les spermatozoïdes épидидymaires, stabilisant aussi leur membrane, s'opère ensuite pendant l'éjaculation [121]. Bien qu'ils soient fertiles, les spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés ne pourront pas féconder un ovocyte tant qu'ils n'auront pas subi la maturation fonctionnelle appelée la capacitation. La [figure 6](#) résume les modifications de surface du spermatozoïde au cours de son transit dans le tractus mâle et femelle puis le processus de capacitation lui permettant d'être apte à la fécondation.

Cette capacitation s'effectue naturellement dans l'oviducte et est induite par le milieu de culture lors de la fécondation *in vitro* [122]. Ce processus semble être induit et régulé dans l'oviducte par un ensemble de molécules organiques (ligands du cholestérol, hormones stéroïdes sexuelles femelles) et ioniques (calcium, bicarbonate) [123].

A l'issue de la capacitation, le spermatozoïde va pouvoir libérer les enzymes contenues dans son acrosome (réaction acrosomique) qui vont ainsi dégrader la zone pellucide de l'ovocyte [124]. Ensuite, grâce à l'ouverture créée et sa mobilité hyperactive, le spermatozoïde va progresser jusqu'à la membrane plasmique de l'ovocyte avec laquelle il fusionne [125].

Cette capacitation est un processus dynamique qui se traduit par plusieurs mécanismes : élévation intracellulaire de la concentration de bicarbonate, du pH et du calcium, efflux de zinc, efflux de cholestérol, activation de plusieurs voies métaboliques et production d'espèces réactives de l'oxygène, phosphorylation des tyrosines, augmentation de la fluidité membranaire et déstabilisations/remaniements membranaires [126-128]. Certaines de ces modifications se produisent rapidement (augmentation de la fluidité membranaire) et d'autres sont plus lentes (phosphorylation des tyrosines) [129]. Ces remaniements se traduisent notamment par la perte ou la modification de protéines provenant de l'épididyme et des glandes annexes mâles, qui s'étaient adsorbées à la surface des spermatozoïdes, faiblement au cours du transit épидидymaire et fortement au cours de l'éjaculation. La famille de protéines BSP (Binder of Sperm) et les spermadhésines (cf. [chapitre 1.3.4](#)), qui ont fait l'objet de nombreuses études, semblent jouer un rôle crucial dans l'induction de la capacitation (processus au cours duquel elles sont désorbées de la surface du spermatozoïde) mais avec des effets et des mécanismes qui peuvent varier selon les espèces [130, 131]. Chez le taureau, BSP1, BSP3 et BSP5 et chez le porc BSP1 (appelé aussi DQH et pB1) et la spermadhésine AQN1, pourraient aussi être des récepteurs spermatiques importants impliqués dans la liaison des spermatozoïdes aux cellules de l'isthme de l'oviducte pour former le réservoir spermatique ([chapitre suivant 1.2.5.2](#)) [132-134].

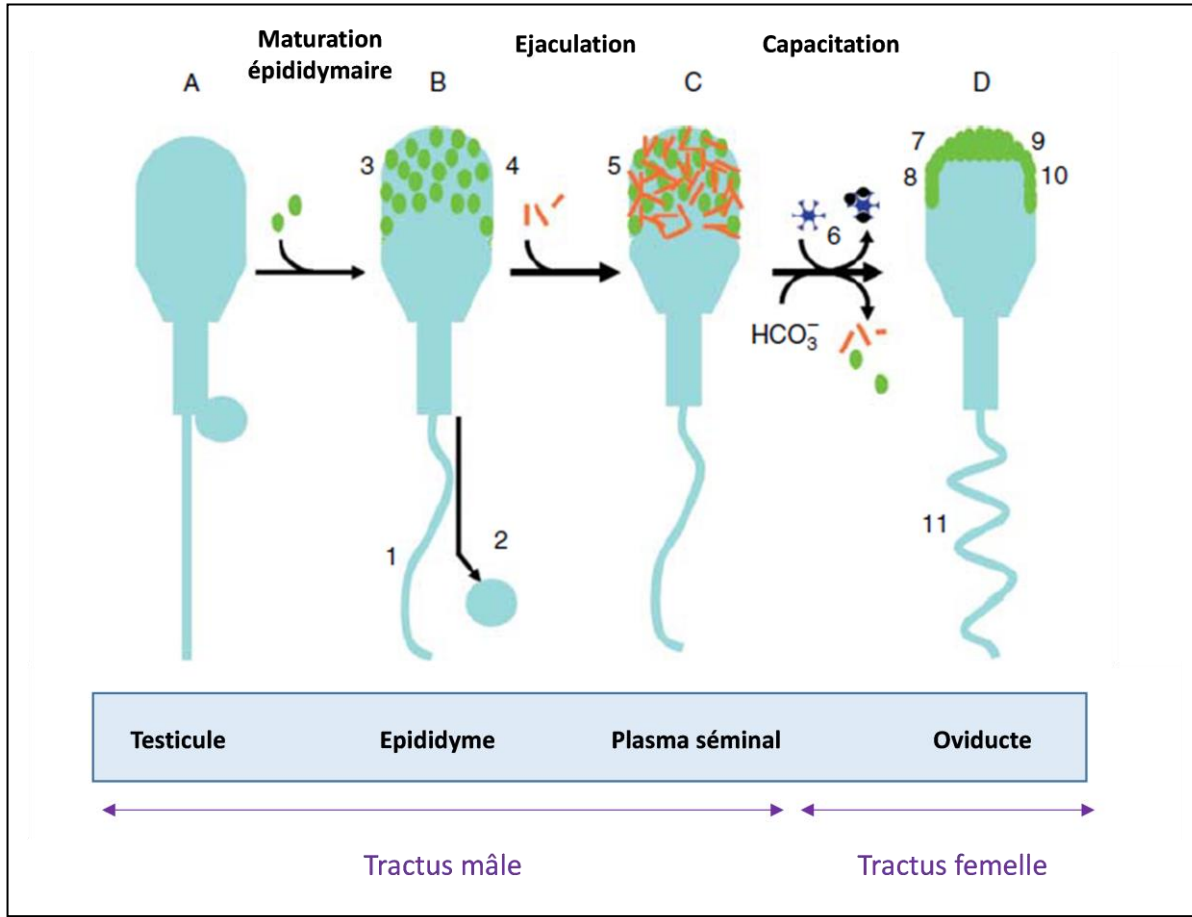


Figure 6 Modifications de surface rendant les spermatozoïde apte à la fécondation

(A) A la sortie du testicule, le spermatozoïde est immobile et non fécondant. (B) Au cours de sa maturation dans l'épididyme, le spermatozoïde : (1) acquiert sa mobilité, (2) perd sa gouttelette cytoplasmique, (3) subit une condensation finale de sa chromatine et (4) acquiert son pouvoir fécondant, notamment par l'adsorption de nouvelles protéines (4, en vert) impliquées dans la liaison spermatozoïdes/zone pellucide. (C) Pendant l'éjaculation, des glycoprotéines (5, en orange) se fixent fortement sur la membrane du spermatozoïde et la stabilise. (D) Le transit des spermatozoïdes dans le tractus femelle (utérus, JUT) pourrait entraîner la perte de facteurs décapacitants et préparer le spermatozoïde à faire sa capacitation dans l'oviducte, en réponse à des facteurs stimulants oviductaux. Plusieurs modifications de la surface du spermatozoïde vont s'effectuer : un efflux de cholestérol (noir) par l'albumine (bleu), des réarrangements de protéines épididymaires et de lipides qui rendent la crête apicale de la tête (partie la plus antérieure du spermatozoïde) fonctionnel pour la fécondation (7-10). D'après [121].

Ces protéines font partie des facteurs décapacitants [135], terme qui désigne des facteurs dont le relargage de la surface du spermatozoïde s'effectue avant/pendant la capacitation et dont la supplémentation va retarder/inhiber la capacitation des spermatozoïdes non capités et la capacité fécondante de spermatozoïdes capités [136]. Ces fonctions capacitantes sont variables entre individus et éjaculats. Une variabilité est aussi constatée entre spermatozoïdes au sein d'un éjaculat et cette différence, pour les spermatozoïdes qui répondent correctement aux signaux oviductaux, pourrait permettre un apport régulier de spermatozoïdes capités à proximité des ovocytes (pour les espèces polyovulantes) pendant toute la durée de l'ovulation [40]. Pour mesurer la réponse à la capacitation des spermatozoïdes, ils sont incubés *in vitro* dans un milieu capacitant (i.e. milieu pour la FIV) et les différentes modifications observées pendant la capacitation sont mesurées [126]. *In vitro*, le processus de capacitation peut durer quelques heures, mais la viabilité des spermatozoïdes est très courte une fois la capacitation pleinement terminée (quelques minutes) [137]. Même si ces conditions

in vitro ne sont pas équivalentes à celles *in vivo*, il peut être supposé que les spermatozoïdes qui sont capités trop prématurément au cours du transit dans les voies génitales femelles ne seront pas aptes à féconder les ovocytes. Les spermatozoïdes doivent aussi répondre correctement aux signaux de capacitation le moment venu, peu avant ou au moment de leur rencontre avec l'ovocyte pour le féconder. Petrunkina et al ont évalué la réponse à la capacitation (cinétique) de verrats fertiles et subfertiles. Ils ont montré un lien entre les individus fertiles, la proportion de spermatozoïdes viables à forte teneur en calcium intracellulaire et le maintien de la viabilité (modèle de régression multiple), ce qui suggère que la perte d'intégrité membranaire chez les subfertiles était due à une déstabilisation trop rapide des spermatozoïdes [138]. Ces chercheurs ont proposé une méthodologie pour évaluer la fertilité avec des tests de capacitation en prenant en compte la grande dynamique de ce processus [139].

Les procédures de conservation (congélation) et de tri (tri cellulaire par cytométrie pour isoler des spermatozoïdes mâles ou femelles) sont susceptibles d'induire un ensemble de stress qui vont endommager les organites du spermatozoïde (ADN, mitochondries...) et déstabiliser et altérer sa membrane plasmique, avec en conséquence un impact qui peut être négatif sur la qualité et la fertilité du spermatozoïde. Les processus caractérisant ces dommages ressemblent à ceux de la capacitation. Pour le préserver des dommages dus à ces procédures, plusieurs stratégies ont été utilisées : le protéger et stabiliser sa membrane plasmique (ajout d'antioxydants, de lipides, de cholestérol, de plasma séminal et de protéines séminales...) ou le stresser (pression hydrostatique). Néanmoins, ces stratégies doivent être utilisées avec précaution pour ne pas induire un effet de non/faible réponse des spermatozoïdes à la capacitation [121].

En parallèle à la capacitation, l'hyperactivation est un type de mobilité particulière. Ce mouvement désordonné des spermatozoïdes est caractérisé par un battement vigoureux et asymétrique du flagelle et il permet aux spermatozoïdes de progresser dans des mucus de forte viscosité et à travers la zone pellucide de l'ovocyte [140].

La capacitation et l'hyperactivation sont deux processus concomitants qui participent au détachement des spermatozoïdes des cellules de l'oviducte, la capacitation pouvant induire une perte d'affinité pour les cellules (la perte de récepteurs spermatiques) et le mouvement hyperactif entraînant un décrochage des spermatozoïdes par une force mécanique [123]. Ces processus ont en commun d'être caractérisés par un influx calcique dans le cytoplasme des spermatozoïdes, via le canal CatSper, mais les voies de signalisation qui déclenchent l'hyperactivation peuvent opérer indépendamment de celles de la capacitation [141].

2.4.2. Réservoir spermatique et liaison des spermatozoïdes aux cellules

Chez la truie et la lapine, une augmentation de la polyspermie (pénétration de plusieurs spermatozoïdes dans l'ovocyte pouvant conduire à de l'infertilité) a été observée suite à la résection de l'isthme caudal de l'oviducte, mettant en évidence son rôle pour retenir/stocker les spermatozoïdes en empêchant qu'un trop grand nombre de spermatozoïdes n'arrive autour des ovocytes [65, 66]. Ainsi, et même si l'ovocyte a ses propres mécanismes de blocage de la polyspermie [67], l'isthme de l'oviducte participerait à réguler le nombre de spermatozoïdes allant vers l'ampoule. Chez le bovin, l'ovin et le porc, le taux de fécondation a été déterminé *in vivo* après que l'isthme ait été sectionné (entre deux ligatures, sous anesthésie) à différents intervalles de temps après l'insémination (période de l'œstrus à post-ovulatoire). Ceci a permis de confirmer que les spermatozoïdes sont retenus dans l'isthme caudal plusieurs heures après l'accouplement jusqu'à l'ovulation, moment où une partie des spermatozoïdes se déplacent vers l'ampoule [68, 71].

Une bonne fonctionnalité des spermatozoïdes (intégrité membranaire et acrosomique, non capacité) est requise *in vitro* pour la liaison des spermatozoïdes aux cellules oviductales. Cette liaison augmente la durée de vie des spermatozoïdes en préservant leur viabilité, leur mobilité, l'intégrité de l'acrosome et de l'ADN puis retarde la capacitation [123]. Elle s'effectue préférentiellement sur les cellules oviductales ciliées grâce à des interactions ligand-récepteur. Plusieurs protéines candidates chez plusieurs espèces ont été identifiées pour cette liaison, sur les spermatozoïdes et sur les cellules épithéliales de l'oviducte [123]. En plus d'être présentes à la surface de ces cellules, certaines de ces protéines comme les annexines A1 et A2 ont été aussi identifiées dans le fluide de l'oviducte. Ces annexines du fluide avaient aussi la propriété de se fixer aux spermatozoïdes *in vitro*, ce qui les rend susceptibles de rentrer en compétition avec les protéines de l'épithélium de l'oviducte pour l'établissement de la liaison des spermatozoïdes sur les cellules [123, 142].

Ces protéines peuvent être des lectines, qui vont reconnaître des motifs glycosylés portés par des glycoprotéines [143]. Il a été montré que les spermatozoïdes porcins reconnaissent deux motifs très spécifiques, l'un étant présent au niveau de l'isthme et de l'ampoule (N-acétylactosamine biantennaire 6-sialylée) alors que l'autre est présent uniquement au niveau de l'isthme (trisaccharide de Lewis X). [142, 144, 145]. Cette répartition du sucre N-acétylactosamine biantennaire 6-sialylée dans les deux régions de l'oviducte est cohérente avec les résultats d'un attachement *in vitro* équivalent des spermatozoïdes sur les cellules de l'isthme comme celle de l'ampoule chez le porc [123]. Des protéines candidates de l'oviducte pour cette liaison aux spermatozoïdes ont été identifiées et sont ANXA2 (Annexin A2), HSPA8 (Heat Shock Protein family A member 8) et DMBT1 (Malignant Brain Tumor 1) [128].

2.4.3. Détachement des spermatozoïdes des cellules : rôle de la progestérone

La régulation du mouvement des spermatozoïdes semble dépendante de leur retenue dans le réservoir spermatique et de leur libération par des signaux provenant de l'oviducte autour de l'ovulation [61].

Le détachement des spermatozoïdes aux cellules de l'oviducte a été moins étudié que leur liaison et la façon dont les spermatozoïdes sont libérés (progressivement de façon constante ou de manière synchronisée) n'est pas connue. Il est possible que le détachement soit la résultante de plusieurs modifications se produisant dans les spermatozoïdes (capacitation, hyperactivation), les cellules oviductales et le fluide d'oviducte [101]. Le détachement des spermatozoïdes aux cellules de l'oviducte est associé aux variations hormonales qui se produisent autour de l'ovulation.

Ainsi, la progression des spermatozoïdes vers l'ampoule au moment de l'ovulation semble fortement liée aux concentrations des hormones stéroïdes ovariennes (principalement l'œstradiol et la progestérone) qui peuvent varier dans le fluide de l'oviducte selon de stade du cycle œstral et le côté de l'ovulation. L'œstradiol est significativement plus concentré au stade pré-ovulatoire par rapport aux autres stades du cycle alors que la concentration de la progestérone, basse au stade préovulatoire, augmente au stade post-ovulation pour atteindre un pic au milieu de la phase lutéale. Ces variations mesurées dans le plasma sanguin sont retrouvées dans le fluide de l'oviducte [123]. Par rapport au plasma sanguin, des concentrations supérieures d'œstradiol et de progestérone sont retrouvées dans l'oviducte de vache (facteur X10-50), truie (facteur X10-20), jument et hamster [146, 147]. Concernant le côté de l'ovulation chez les espèces mono-ovulantes bovine et équine, le fluide de l'oviducte du côté ipsilatéral (côté de l'ovulation) présente des concentrations plus importantes de progestérone au stade post-ovulation que l'oviducte controlatéral. En revanche, l'œstradiol ne semble pas être plus concentré dans le côté ipsilatéral par rapport au controlatéral [146].

La hausse de concentration de progestérone est un des signaux qui va déclencher le détachement des spermatozoïdes aux cellules de l'oviducte. Chez le porc, l'injection *in vivo* de microgouttelettes de

progestérone (1 mg) dans la paroi de l'oviducte, au niveau du réservoir spermatique [148] et de fluide folliculaire riche en progestérone (12 ng) directement dans le réservoir [149] va augmenter la polyspermie, reflet d'un relargage des spermatozoïdes par la progestérone.

A des concentrations non physiologiques (1-10 μ M), la progestérone est un des principaux acteurs d'activation du canal calcique CatSper (sauf chez la souris) et des voies de signalisation de la capacitation [150], ainsi le détachement des spermatozoïdes des cellules de l'oviducte via la capacitation est envisageable. Il n'est pas sûr que l'activation de CatSper par la progestérone soit impliquée dans l'hyperactivation des spermatozoïdes. En effet, les travaux montrant un effet n'ont pas été confirmés ou l'effet était faible. Cette incohérence peut être due à l'effet transitoire de la progestérone sur l'hyperactivation. Des travaux *in vitro* plus récents ont rapporté des effets de la progestérone à des concentrations physiologiques du stade post-ovulatoire : la progestérone stimule le détachement des spermatozoïdes chez le porc à 80 nM via CatSper [151]. De plus chez le bovin, à 100 ng/mL (310 nM), ce détachement s'accompagne d'un relargage des protéines BSP.

Quelques études se sont intéressées au nombre de spermatozoïdes dans le tractus selon le stade du cycle œstral, notamment entre phase folliculaire et phase lutéale où les différences de concentrations en progestérone sont fortes entre les deux stades. Après IA chez la truie, aucune différence de nombre de spermatozoïdes n'a été trouvée dans l'oviducte entre la phase folliculaire et la phase lutéale [70]. Un nombre plus élevé dans la JUT et les oviductes en phase lutéale a été rapporté, mais ces spermatozoïdes présentaient des anomalies morphologiques [152]. En comparant différentes conditions péri-ovulatoires, plus de spermatozoïdes ont été comptés dans l'isthme crânial au moment et après l'ovulation (6-8 h après) en comparaison à 6-8 h avant ovulation [153], ce qui est cohérent avec une redistribution des spermatozoïdes vers l'ampoule au moment de l'ovulation.

2.4.4. Progression des spermatozoïdes vers l'ovocyte

La progression des spermatozoïdes vers les ovocytes, situés dans l'ampoule, semble médiée par des mouvements de fluide dus à une combinaison des contractions de l'oviducte, du battement ciliaire des cellules épithéliales et de la sécrétion de fluide oviductal [101]. La mobilité des spermatozoïdes et les interactions spermatozoïdes/cellules épithéliales semblent aussi jouer un rôle dans cette migration.

Chez la souris, plusieurs groupes ont montré que les spermatozoïdes étaient beaucoup plus abondants dans l'isthme que dans l'ampoule, quel que soit le moment examiné (0,25 à 8 h après le coït chez la souris) [101]. Les spermatozoïdes sont visualisés (par vidéomicroscopie) attachés aux cellules, en groupe au niveau de l'isthme ou libres dans le fluide, avec des détachements et rattachements successifs pour les spermatozoïdes hyperactifs [101, 154, 155]. Malgré un flux global dirigé vers les ovaires après infusion d'encre, les spermatozoïdes font un mouvement de va-et-vient dans l'isthme correspondant aux flux de fluide. Ce mouvement est plus lent dans l'ampoule et des différences de motilité (nage plus lente, amplitude de battement plus faible) ont été observées dans l'ampoule [101, 156]. Dans l'étude de Chang *et al*, une liaison constante dans l'ampoule a été observée pendant plusieurs minutes et les contractions péristaltiques permettaient de détacher certains de ces spermatozoïdes de l'épithélium. Au moment des fortes contractions, certains spermatozoïdes se sont détachés à la fois dans l'ampoule et dans l'isthme [154]. Dans cette étude, l'inhibition des contractions n'empêchait pas la formation du réservoir spermatique et la migration des spermatozoïdes jusqu'à l'ampoule qui s'effectuait probablement grâce à leur mobilité [154]. Cependant, suite au blocage des contractions, d'autres études ont montré un nombre réduit de spermatozoïdes dans l'isthme chez la lapine [157] et dans le modèle souris [155], avec une diminution du taux de fécondation de 27 % pour le modèle souris.

La migration des spermatozoïdes peut aussi être différente entre l'isthme et l'ampoule en lien avec les différences anatomiques qui ont été décrites entre ces deux régions. L'oviducte présente plusieurs régions fonctionnelles et morphologiques avec une complexité anatomique caractérisée par des plis muqueux. Ces plis primaires et secondaires varient entre ces régions (nombre, forme et hauteur des plis, ramifications entre plis...) [158] et l'espace entre les plis est plus restreint dans l'ampoule que dans l'isthme[101] (figure 7). De plus, chez la souris, des régions morphologiquement spécialisées correspondent à une différenciation spécifique des cellules épithéliales [159].

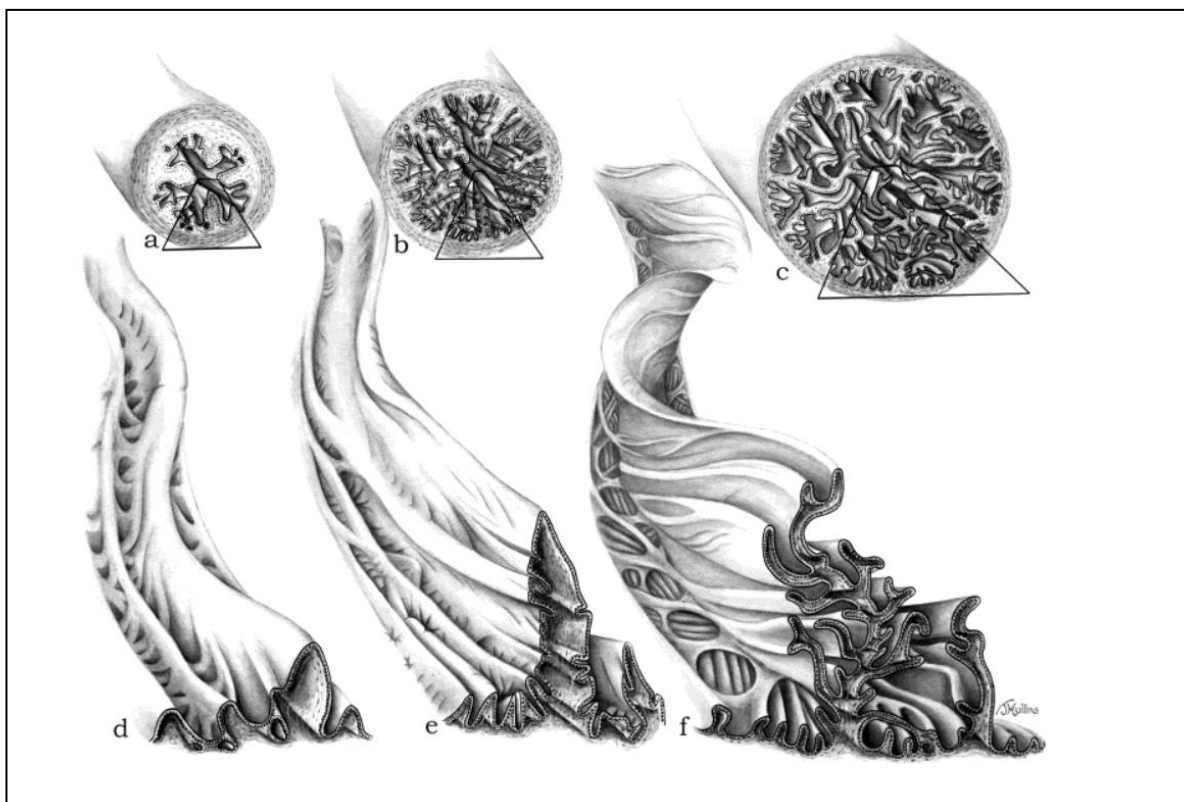


Figure 7 : Illustrations de la muqueuse de l'isthme, de la jonction isthme-ampoule et de l'ampoule d'oviducte de vache
 Illustrations basées sur la reconstruction de modèle à partir de coupes sériées d'isthme, jonction isthme-ampoule et d'ampoule et d'image de la surface de l'oviducte avec un stéréo microscope. Les coupes transversales de l'isthme (a), de la jonction isthme-ampoule (b) et de l'ampoule (c) montrent l'augmentation du diamètre de l'isthme à l'ampoule ainsi que l'augmentation de la hauteur relative des plis. Un segment longitudinal d'un pli primaire représentatif, de l'isthme (d), de la jonction isthme-ampoule (e) et de l'ampoule (f) montre les différences des plis secondaires directionnels le long des parois latérales. D'après [160].

Les spermatozoïdes semblent donc se déplacer et être déplacés dans le liquide dans lequel ils sont en suspension mais plusieurs mécanismes de guidage décrits *in vitro* pourraient les attirer vers l'ovocyte. Même si des questionnements subsistent quant à leur réelle implication *in vivo* [101], trois types de taxies ont pu être décrits *in vitro* (figure 8). La rhéotaxie positive est une nage des spermatozoïdes dans le sens inverse du flux de fluide, à contre-courant. La thermotaxie décrit un mouvement des spermatozoïdes qui s'oriente grâce à des différences graduelles de température et qui est dirigé vers

la température la plus haute. Enfin la chimiotaxie positive est le déplacement des spermatozoïdes vers une substance attractive (médié par un gradient de concentration) et la négative, l'éloignement des spermatozoïdes de la substance.

Pour la rhéotaxie, on ne sait pas si elle est importante pour le guidage des spermatozoïdes mais il est possible que des flux et des microcourants dans l'oviducte déclenchent des mécanismes de rhéotaxie [101]. Concernant la thermotaxie, *in vivo* chez la truie et la lapine, une différence de température plus chaude de 1 à 2 °C mesurée près des ovaires par rapport à la JUT a conduit à proposer un mécanisme de thermotaxie qui faciliterait le déplacement des spermatozoïdes vers l'ampoule [161]. Les spermatozoïdes sont attirés par diverses cibles par chimiotaxie, dont de nombreuses molécules du fluide folliculaire [162]. Seule une petite sous-population des spermatozoïdes capacités mais avec un acrosome intègre se dirige vers les molécules attractives à travers le gradient de concentration [163]. Chez plusieurs espèces, un gradient de faible concentration en progestérone (pM) attire les spermatozoïdes [158]. La progestérone est sécrétée par les cellules du cumulus entourant l'ovocyte au moment de l'ovulation, cependant l'existence d'un gradient n'a pas été démontrée dans l'oviducte *in vivo*. Aucune étude n'a pu mettre en évidence l'implication du récepteur spermatique à la progestérone dans cette chimiotaxie.

Un modèle théorique du guidage des spermatozoïdes avec les 3 types de taxies et les mouvements de fluide est présenté dans la [figure 8](#).

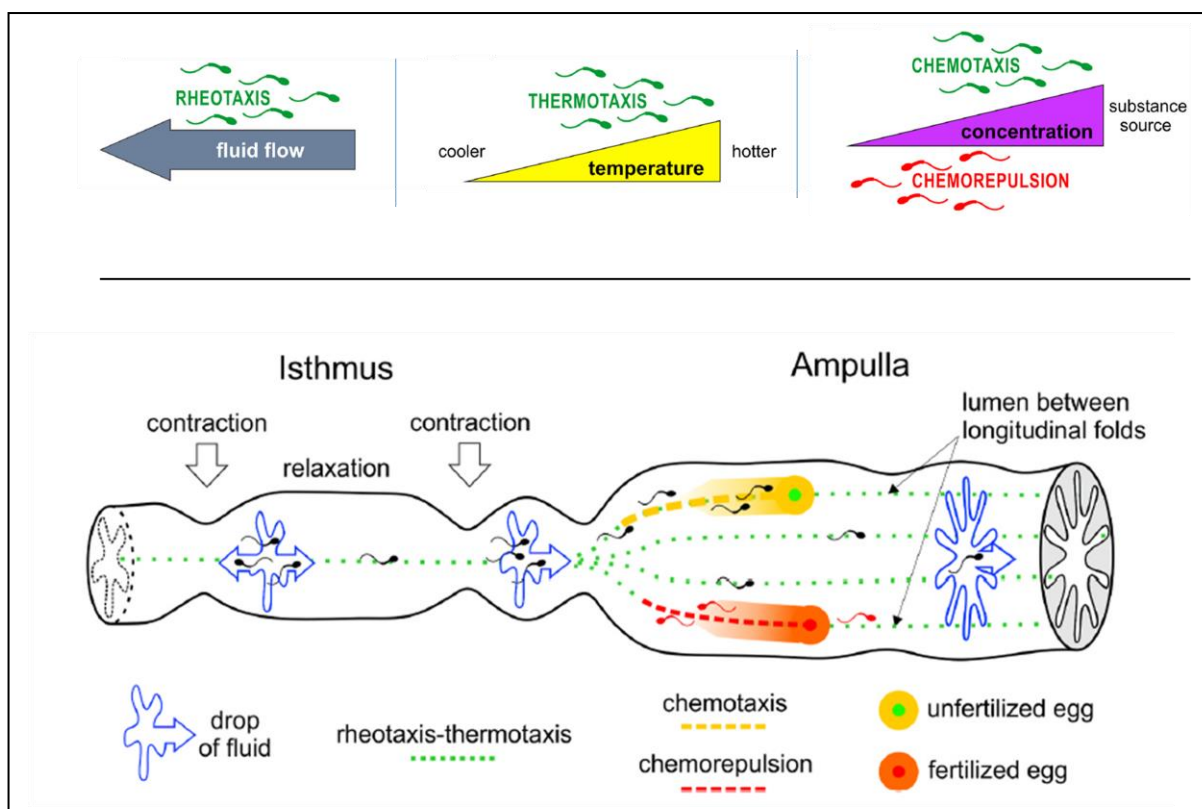


Figure 8 Schémas de 3 types de taxies de spermatozoïdes et modèle théorique de guidage des spermatozoïdes vers l'ovocyte.

D'après [158].

3. Physiologie de l'éjaculat chez le ver rat

3.1. Le spermatozoïde

Le spermatozoïde est constitué de deux parties distinctes, la tête et le flagelle (figure 9). Chez le ver rat, la tête ovale mesure $7,1 \mu\text{m} \times 3,8 \mu\text{m}$ et le flagelle $45 \mu\text{m}$ de long. En comparaison, la tête du spermatozoïde humain est plus petite ($3,8 \mu\text{m} \times 2,2 \mu\text{m}$) et celle de la souris a une forme de faucille [164].

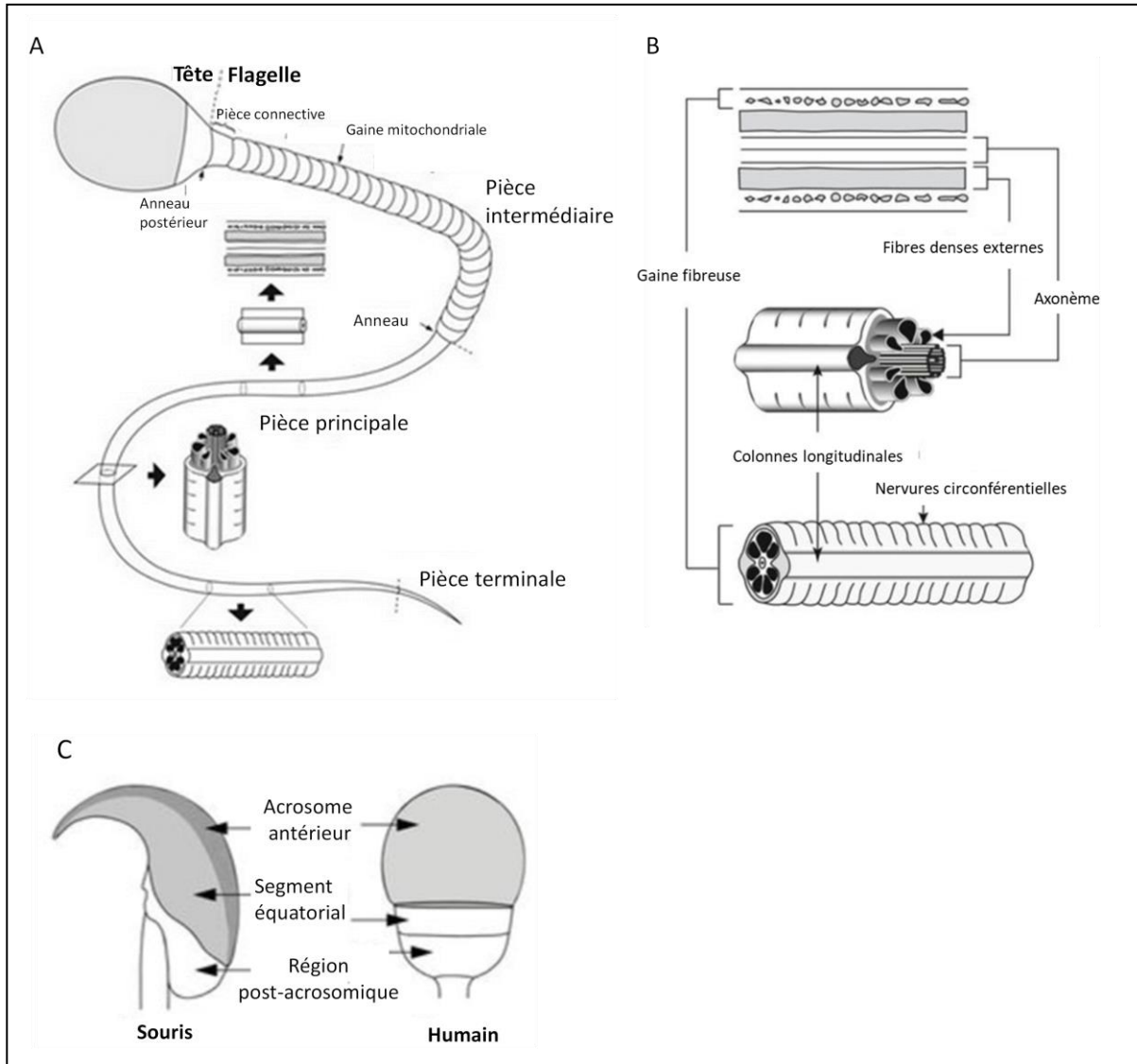


Figure 9 Schéma d'un spermatozoïde

A) Vue générale du spermatozoïde. Des sections transversales et longitudinales de la pièce principale et de la gaine fibreuse sont indiquées par des flèches et détaillées en (B). (B) Composant interne du flagelle. (C) Tête falciforme de spermatozoïde de souris et tête spatulée de spermatozoïde humain (Adapté de [165]).

3.1.1. Tête

La tête du spermatozoïde contient deux structures principales, le noyau et l'acrosome. Le noyau, petit, comparé à celui d'une cellule somatique, contient un ADN de forme toroïde (succession de boucles distinctes le long d'un segment d'ADN surenroulé) extrêmement condensé, dû au remplacement des histones par des protamines pendant son élongation dans le testicule [166]. L'acrosome est une vésicule d'exocytose, délimitée par une membrane continue, contenant des enzymes hydrolytiques et protéolytiques [167].

La tête du spermatozoïde contient différentes régions spécialisées au niveau de sa membrane plasmique, dont les fonctions vont être liées à la reconnaissance, la pénétration et la fusion avec l'ovocyte.

La crête apicale de la membrane plasmique est impliquée dans la reconnaissance de la zone pellucide (matrice extracellulaire spécifique enveloppant l'ovocyte) et cette liaison primaire amorce la réaction acrosomique (exocytose des enzymes de l'acrosome) : tout d'abord une grande partie de la membrane externe de l'acrosome fusionne avec la membrane plasmique (formation de vésicules) puis les protéines intra acrosomales sont exposées et interagissent avec la zone pellucide (liaison secondaire). Cette exposition va aussi engendrer un clivage du réseau de protéines de la zone pellucide [168]. La réaction acrosomique et le mouvement hyperactif du spermatozoïde vont participer à sa progression à travers la zone pellucide vers l'espace périvitellin de l'ovocyte (espace entre la zone pellucide et la membrane plasmique de l'ovocyte) [63].

La région du segment équatorial de la tête du spermatozoïde, accessible et remodelée après la réaction acrosomique, est impliquée dans la fusion des spermatozoïdes avec la membrane de l'ovocyte [169]. Chez la souris, la relocalisation d'IZUMO, protéine essentielle à la fusion gamétique, avec son partenaire ovocytaire JUNO, s'effectue dans cette région [170].

La région post-acrosomique contient la gaine post-acrosomique, une partie de thèque périnucléaire (la structure cytosquelettique entourant le noyau), qui est la première structure interne exposée dans le cytoplasme de l'ovocyte. Il a été proposé, chez certaines espèces, que son exposition participe à la fusion, à l'activation ovocytaire et aux premiers événements post-fécondation [171].

3.1.2. Flagelle

Le flagelle, connecté à la tête du spermatozoïde par un élément de liaison, la pièce connective, est constitué de 3 segments : le premier, proche du noyau, est la pièce intermédiaire et les deux suivants sont la pièce principale et la pièce terminale (figure 9).

Ces trois segments ont en commun l'axonème, une structure centrale typique des flagelles, constituée de 9 doublets de microtubules en périphérie de deux microtubules centraux. Des ponts de nexines et des complexes protéiques permettent le maintien structurel de l'axonème et des dynéines ATPase. Ces dynéines sont des moteurs moléculaires qui assurent le glissement de l'un des microtubules du doublet par rapport à l'autre, mouvement qui va induire un battement du flagelle.

La pièce intermédiaire contient une gaine mitochondriale (50-100 mitochondries) enroulée autour de l'axonème tandis que la pièce principale présente une gaine fibreuse. La pièce terminale du flagelle est uniquement constituée de l'axonème.

Neuf fibres denses, constituées de protéines de la famille des Outer Dense Fibers (ODFs) [172], de longueurs différentes, sont reliées à la pièce connective et disposées le long de la pièce intermédiaire et principale en regard des 9 doublets de microtubules périphériques. Ces fibres, avec la gaine fibreuse, rigidifient le flagelle ce qui augmente sa courbure [173].

L'énergie, sous forme d'ATP nécessaire au fonctionnement des dynéines, est produite par les mitochondries de la pièce intermédiaire et par la glycolyse au niveau de la pièce principale [174].

Le flagelle du spermatozoïde lui permet d'être motile et cette fonction est primordiale au cours de sa migration dans le tractus femelle jusqu'au moment de la fécondation. Cette mobilité peut être totalement inhibée chez certaines espèces au moment du stockage des spermatozoïdes dans l'épididyme (état quiescent) [175, 176] ou hyperactivé dans le tractus femelle, ce qui peut faciliter la progression du spermatozoïde et permet sa pénétration dans la zone pellucide de l'ovocyte [141].

3.2. Caractéristique générale de l'éjaculat

Le spermatozoïde est structurellement formé dans les testicules au cours de la spermatogenèse qui dure 40 jours chez le porc [177] mais il ne va devenir mobile et fécondant qu'au cours de son transit dans l'épididyme [178].

Chez le verrat, l'épididyme, organe d'environ 15 centimètres de long, est un long tubule pelotonné de 70 mètres. Le transit des spermatozoïdes, depuis la sortie du testicule jusqu'à l'extrémité caudale de l'épididyme, dure 10 à 15 jours et s'accompagne d'une maturation au cours de laquelle sont acquises la mobilité et l'aptitude à se lier à la zone pellucide de l'ovocyte. Cette maturation fonctionnelle s'accompagne d'une maturation biochimique sous forme d'un remodelage du protéome membranaire du spermatozoïde avec la perte de protéines testiculaires et l'acquisition de nouvelles protéines épididymaires [20]. En raison de la condensation extrême de son ADN à la sortie du testicule, le spermatozoïde ne peut pas produire de nouvelles protéines [178]. Cette maturation est donc acquise exclusivement par des interactions avec le milieu environnant (fluide et cellules épididymaires).

Au cours de l'éjaculation, les spermatozoïdes stockés dans l'épididyme sont expulsés et ils interagissent avec les sécrétions des glandes annexes (glandes bulbo-urétrales, prostate, vésicules séminales) qui remodelent à nouveau la membrane plasmique du spermatozoïde.

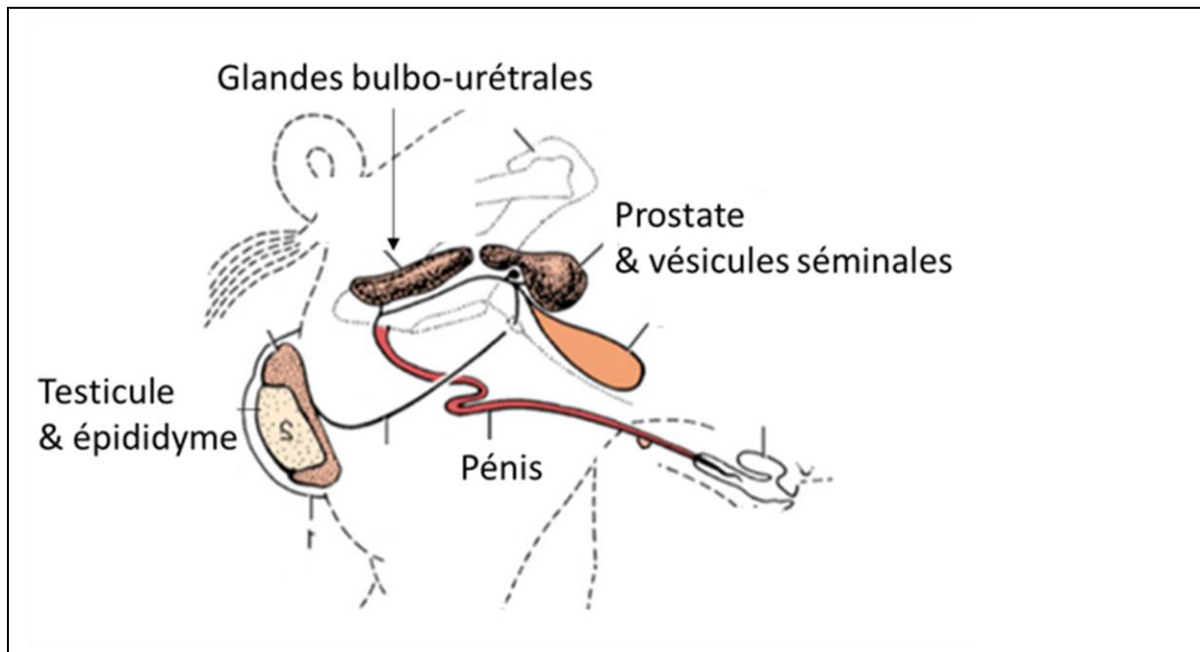


Figure 10 Schéma de l'appareil reproducteur de verrat

D'après [179]

L'éjaculat est donc constitué des spermatozoïdes en suspension dans un milieu appelé plasma séminal (PS), lui-même composé des sécrétions épididymaires et des glandes annexes (figure 10). Le verrat est l'espèce dont le volume de l'éjaculat et la quantité totale de spermatozoïdes par éjaculat sont les plus importants parmi les mammifères d'élevage (tableau 1). Cet éjaculat est, comme celui de l'étalon, peu concentré par rapport à celui des ruminants. Ceci est peut-être en lien avec le site de dépôt de la semence qui est vaginal pour le bovin et l'ovine et utérin pour l'équin et le porc [179].

Espèce	Volume (mL)	Nombre de spermatozoïdes (milliards)	Concentration de spermatozoïdes (1.10^6 /mL)	Ref.
Porcin	280	88	315	[180, 181]
Equin	84	18	215	[182]
Bovin	5	7	1400	[183]
Ovin	4	3,2	900	[184]

Tableau 1 Volume, nombre de spermatozoïdes et concentration moyenne d'un éjaculat chez les mammifères d'élevage

3.3. Caractérisation des fractions de l'éjaculat de verrat

Chez le verrat, la composition en volume du plasma séminal provient principalement des sécrétions des glandes annexes, en particulier les vésicules séminales qui sont les plus volumineuses parmi les animaux domestiques [185]. Ceci se traduit au niveau de la composition protéique du PS par une faible contribution des fluides testiculaires et épидидymaires (3 à 5% des protéines totales) [179].

Le verrat, comme l'étalon, le chien et l'humain, va émettre l'éjaculat de façon séquentielle et les différentes fractions qui en résultent sont reconnaissables à leur couleur lors de la collecte des mâles [179, 186].

Le début et la fin de l'éjaculat ne sont pas conservés lors de la collecte. En effet, la fraction pré-spermatique, est claire, sans spermatozoïdes, constituée d'un mélange de sécrétion urétrale, bulbo-urétrale et prostatique et contient des débris cellulaires et de l'urine. De même, les sécrétions visqueuses (mucines) des glandes bulbo-urétrales de la fin de l'éjaculat sont éliminées. Le rôle de ces sécrétions *in vivo* est de limiter le reflux des spermatozoïdes du cervix vers le vagin après l'accouplement [187].

Les fractions conservées sont la fraction « sperm rich » de couleur blanc crème, riche en spermatozoïdes, qui contient principalement un mélange de fluides épидидymaires et prostatiques. Après la fraction « sperm rich », la fraction « post-rich », moins riche en spermatozoïdes, est un mélange majoritairement composé de sécrétions de la prostate et des vésicules séminales.

Des auteurs ont subdivisé la fraction « sperm rich » en deux sous-fractions, les 10 premiers mL (P1), contenant 25 % des spermatozoïdes totaux et le reste (P2) ([188]). La sous fraction P1 a été comparée au mélange P2+ « post-rich », 3 h après IA, en comptant les spermatozoïdes présents dans une région allant de la jonction utéro-tubaire au début de l'isthme de l'oviducte (2 cm d'isthme). Cette comparaison a été effectuée en inséminant en même temps P1 et P2+ « post-rich » ou en inséminant en premier P1 puis P2+ « post-rich » et inversement. Les résultats ont montré que les spermatozoïdes de la sous fraction P1 représentaient 59,8 % du total quand P1 était inséminé en premier. Quand P2+ « post-rich » est inséminée en premier, les spermatozoïdes issus de cette fraction représentent 84% du total [188]. Ces résultats pointent le fait que les premiers spermatozoïdes déposés dans le tractus sont surreprésentés au niveau de cette région JUT+isthme lors de cette expérience.

Les spermatozoïdes de la fraction « sperm rich » étaient traditionnellement utilisés, car considérés comme de meilleure qualité. Cependant, les systèmes semi-automatisés de collecte de la semence développés dans les années 2000 dans les centres d'IA permettaient uniquement la collecte de l'éjaculat entier [186].

Plusieurs études ont comparé la qualité des fractions riches, « post-rich » et de l'éjaculat entier. La fraction « sperm rich » avait une meilleure congélabilité (plus de spermatozoïdes mobiles à la décongélation) par rapport à l'éjaculat entier [189]. De plus, il a été relevé une meilleure capacité de fécondation pour la fraction « sperm rich » par rapport à la « post-rich » lors de la FIV [190, 191].

Cependant, les performances de l'IA (fertilité et prolificité sur de petits effectifs) [186], la conservation en milieu liquide et les dommages induits par le stress thermique et le fluide utérin [192] étaient identiques entre la fraction « sperm rich » et l'éjaculat entier.

3.4. Composition en protéines du plasma séminal et des spermatozoïdes

3.4.1. Généralités sur le plasma séminal

En conditions naturelles, l'éjaculation est un phénomène assez court (minutes). Ceci implique un temps de contact rapide entre les spermatozoïdes qui sortent de l'épididyme et les sécrétions des glandes annexes. Une fois dans les voies génitales femelles, les spermatozoïdes sont rapidement lavés du plasma séminal [193]. De plus, une fois éjaculés, la survie des spermatozoïdes *in vitro* dans le PS pur est limitée et l'éjaculat doit être rapidement dilué, mais une trop forte dilution est néfaste car elle retire des facteurs séminaux protecteurs des spermatozoïdes [194].

Après accouplement, le PS va servir à transporter les spermatozoïdes, en leur fournissant une source d'énergie dès leur entrée dans le tractus femelle. Il va aussi protéger les spermatozoïdes contre des changements de pH, comme le pH vaginal acide chez la femme [195]. Chez l'ovin, il a été montré que le PS contribue à un meilleur passage du cervix [196] et chez l'humain permet également une meilleure pénétration dans le mucus cervical [197].

Les spermatozoïdes épидидymaires étant fertiles, l'impact du PS dans la fertilité des spermatozoïdes est régulièrement questionné [179, 193]. Cependant, le remodelage de la surface des spermatozoïdes au cours de l'éjaculation, avec une adsorption importante des protéines majeures du plasma séminal, va potentiellement avoir un impact sur son transport, sa survie et sa capacité de fécondation dans le tractus femelle [193, 198]. Ceci implique que les conséquences fonctionnelles de ces interactions peuvent être décalées dans le temps et dans l'espace [193]. Depuis plusieurs années, des marqueurs de fertilité (protéines en suspension dans le plasma séminal ou fixées sur les spermatozoïdes) sont recherchés [193, 199] et le rôle des protéines du PS dans la réussite des biotechnologies de la reproduction est examiné [200, 201].

Au-delà de l'effet du plasma séminal sur les spermatozoïdes, certains de ces composés vont interagir directement avec le tractus femelle, moduler sa réponse immunitaire et en conséquence les interactions spermatozoïdes/tractus femelle. Cette modulation de l'environnement maternel peut aussi promouvoir le succès de la gestation [179, 198, 202].

3.4.2. Composition protéique du PS et conséquences fonctionnelles pour le spermatozoïde

Le plasma séminal est composé d'ions, de glucides, d'hormones stéroïdiennes et peptidiques, de composés organiques divers et de protéines, dont des enzymes [203]. Les protéines sont un des constituants les plus abondants du plasma séminal avec des concentrations allant de 30 à 60 mg/mL chez le verrat [203].

La nature des glandes annexes peut varier selon les espèces avec par exemple l'absence de vésicules séminales chez le chien et les camélidés, des tailles diverses (grosse vésicule séminale et petite prostate chez le taureau), des capacités de volume de sécrétion et des variations inter-individuelles plus ou moins importantes [185]. Ces différences marquées expliquent la composition unique des plasmas séminaux selon l'espèce [204]. Les rôles des protéines majeures dans les principaux événements qui conduisent à la fécondation seraient essentiellement conservés [198] et ces protéines ont été classées dans trois grandes familles : les spermadhésines, les BSPs (Binder of Sperm Protein) et les CRISP (Cysteine-Rich Secretory Proteins) [198]. Ces 3 familles de protéines se retrouvent plus ou moins prédominantes dans le plasma séminal selon les espèces. Le PS de verrat contient une majorité de protéines de la famille des spermadhésines et une autre protéine majeure qui est la fibronectine.

Le PS de taureau a une majorité de BSPs, celui de bélier des spermadhésines, des BSPs et TIMP1 (metallopeptidase inhibitor 1) et celui d'étalon des CRIPS et des kallikreines et des BSPs [204].

Pour le PS de verrat, après séparation sur un gel d'électrophorèse, les cinq membres de la famille des spermadhésines ont toutes ayant un poids moléculaire inférieur à 25 kilodalton et représentant 85,3 % des protéines totales. La fibronectine, grosse protéine de 230-270 kDa, est la plus visible des protéines après les spermadhésines (figure 11) [204].

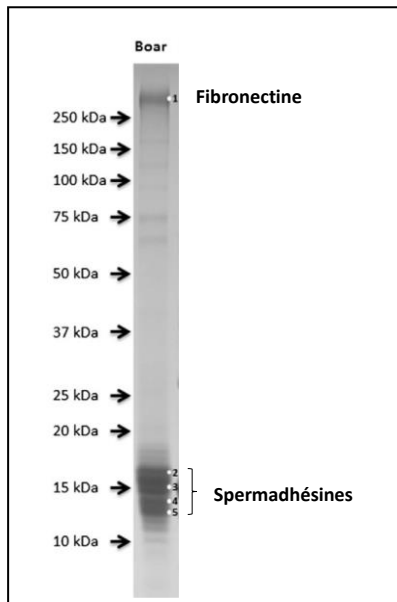


Figure 11 : Séparation du plasma séminal de verrat sur gel d'électrophorèse

Les protéines majeures du plasma séminal de verrat séparées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (« Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide GEL ») sont visibles après coloration du gel au bleu de Coomassie. D'après [204]

Les spermadhésines sont des protéines multifonctionnelles qui possèdent une large gamme de ligands (glucides, glycosaminoglycanes sulfatés, phospholipides, cholestérol) et elles ont été classées en deux groupes : le premier groupe nommé HBPs (Heparin Binding Proteins spermadhesins) comprend 3 membres, AQN-1, AQN-3 et AWN et il a la propriété de se lier à l'héparine alors que le second groupe, l'hétérodimère PSP-I/ PSP-II ne s'y lie pas [198, 205]. Comme leur nom l'indique, ces spermadhésines sont liées à la surface des spermatozoïdes. Elles s'y fixent abondamment au moment de l'éjaculation [206, 207] sur les phospholipides membranaires, formant un revêtement de spermadhésines [198, 208, 209].

Des méthodes chromatographiques et immunologiques ont permis de purifier et de quantifier les spermadhésines dans le PS de verrat, sur les spermatozoïdes épидидymaire, éjaculé et capacité [210, 211]. Sur les spermatozoïdes épидидymaires, elles ont été récemment détectées dans les études protéomiques [206] sauf AWN qui avait déjà été détectée et quantifiée en quantité modérée (7 fois moins que sur les spermatozoïdes éjaculés) [207]. Leurs propriétés de liaison sur des ligands et sur les spermatozoïdes ont été étudiées, et il est retrouvé des spermadhésines isolées (formes monomériques, formes dimériques pour AQN1, AQN3, AWN et hétérodimérique pour PSPI et PSPII) et sous forme d'agrégat, retrouvées préférentiellement dans le PS en condition physiologique [210].

La fixation de ces spermadhésines sur des ligands et les spermatozoïdes varie selon leur forme monomérique ou agrégée, avec parfois des contradictions entre les études [210-213]. Pendant la capacitation *in vitro*, une grande quantité de ces spermadhésines est relarguée. Les spermadhésines AQN-3 et AWN restent en petite quantité sur les spermatozoïdes après la capacitation et sont des récepteurs primaires pour la zone pellucide de l'ovocyte [205, 214].

La spermadhésine AQN1 est la principale candidate pour la liaison spermatozoïdes/cellules oviductales et elle reconnaît des motifs sucrés de mannose et de galactose à la surface des cellules épithéliales de l'oviducte. En effet, l'ajout de AQN-1 inhibe de manière dose dépendante la liaison *in vitro* des spermatozoïdes aux explants d'oviducte [134]. D'autres candidats ont aussi été proposés pour la liaison des spermatozoïdes sur les cellules de l'oviducte : BSP1 (Binder of Sperm 1), qui reconnaît du mannose [215] et MFGE8 (Milk Fat Globule glycoprotein) qui reconnaît un des deux motifs sucrés (motif Lewis X) particuliers que reconnaît spécifiquement le spermatozoïde porcin [216].

Les spermadhésines PSPI et PSPII forment un hétérodimère glycosylé qui représente 50 % des protéines totales [198]. *In vitro*, la mobilité et l'activité mitochondriale des spermatozoïdes sont maintenues en présence de PSPI/PSPII alors qu'elles sont stoppées après 5 h d'incubation avec les HBPs, montrant un effet antagoniste des spermadhésines se liant à l'héparine [194]. Elles ont aussi un rôle décapacitant sur les spermatozoïdes, en retardant l'influx de calcium intracellulaire pendant la capacitation *in vitro*. Les spermadhésines ont aussi un effet sur le tractus femelle en induisant le recrutement de cellules immunitaires. L'hétérodimère PSPI/PSPII mais pas les HBPs induisent le recrutement des polynucléaires neutrophiles. Des lymphocytes T sont aussi recrutés, les CD2+ et CD8+ pour PSPI/PSPII et les CD4+ pour les HBPs [198, 217].

La fibronectine, bien qu'elle fasse partie des protéines majeures, a été peu étudiée jusqu'à présent dans l'espèce porcine. Sa quantité dans le plasma séminal est associée positivement à une meilleure congélation des spermatozoïdes; cependant elle n'est pas différentielle entre deux groupes de verrats dont la qualité des spermatozoïdes frais est contrastée [218-221].

Elle a été mieux caractérisée dans le plasma séminal humain où elle est abondante et clivée 1 à 2 h après la liquéfaction de la semence humaine [222-224]. Sur les spermatozoïdes humains, le pourcentage de spermatozoïdes ayant un signal positif après incubation avec un anticorps anti-fibronectine en présence de plasma séminal est significativement augmenté quand les spermatozoïdes ont subi un dommage par le froid (congélation/décongélation). De plus, ce pourcentage d'immunoréactivité est inversement corrélé à la viabilité, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes [225]. Une autre étude a aussi montré une corrélation inverse entre la mobilité et la quantité de fibronectine dans le plasma séminal chez des patients présentant une oligo-asthénospermie. L'ajout de fibronectine plasmatique inhibe aussi de manière dose dépendante la mobilité des spermatozoïdes [226]. Ces données suggèrent un effet délétère lié à une forte abondance de fibronectine sur le spermatozoïde et dans le plasma séminal chez l'humain.

Un moyen simple pour identifier les protéines du plasma séminal qui se fixent aux spermatozoïdes consiste à comparer les protéomes des spermatozoïdes épididymaires avec ceux des spermatozoïdes éjaculés au niveau qualitatif (apparition de nouvelles protéines) et quantitatif (ajout de protéines existantes). Dans leurs travaux, Patino *et al* ont comparé les protéomes épididymaires/éjaculés provenant des différentes fractions d'éjaculat (cf. chapitre 1.3.3.) chez le verrot [206]. Le dendrogramme des protéines différentielles identifiées est présenté [figure 12](#).

Le contenu protéique des spermatozoïdes de la fraction « post-rich » montre clairement un enrichissement pour la majorité des protéines différentiellement détectées (20 protéines sur 32 totales avec un ratio > 1,5) par rapport aux deux autres fractions et aux spermatozoïdes épididymaires. Les cinq spermadhésines et la fibronectine font partie de ces protéines enrichies, ce qui représente environ 1/3 des protéines (qualitativement). Ces résultats montrent un remodelage protéique spécifique des spermatozoïdes au cours de l'éjaculation qui pourrait expliquer les différences de fonctionnalité des spermatozoïdes issus des différentes fractions.

D'autres études ont pu observer un lien négatif entre la fertilité et la surexpression des spermadhésines. En particulier, la surexpression de AQN-3 après la capacitation est associée à une plus

faible prolificité [227] et celle de AWN et PSP-I dans le plasma séminal à une plus faible fertilité [228, 229].

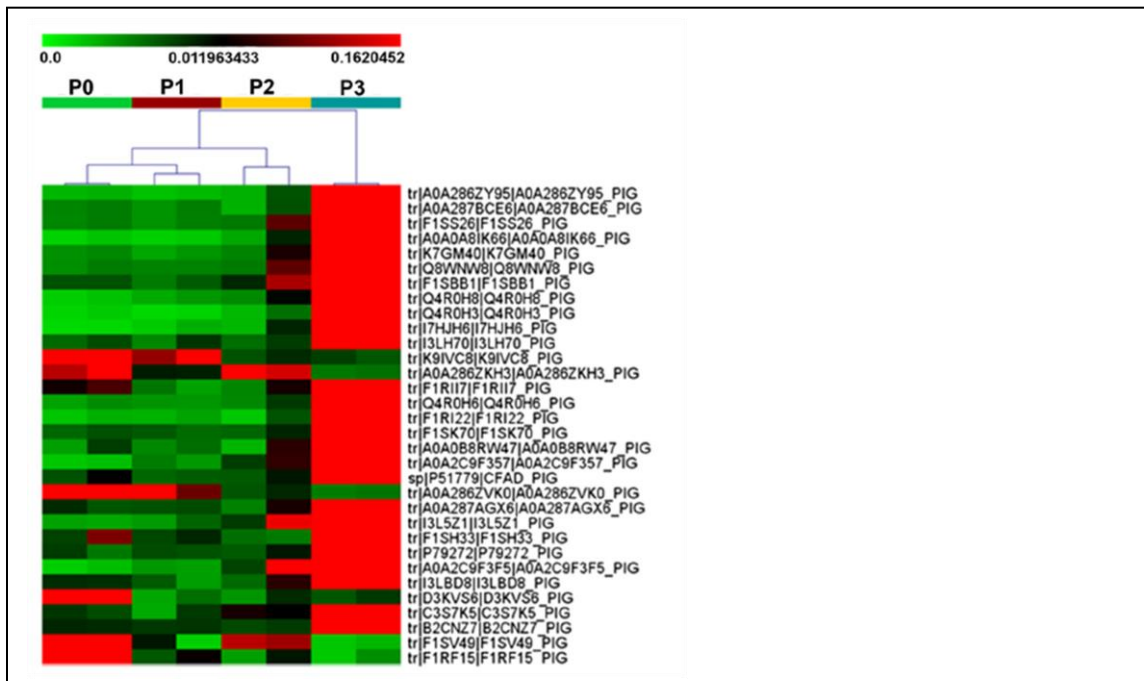


Figure 12 Dendrogramme des protéines différentielles entre les spermatozoïdes épидидymaires et les spermatozoïdes éjaculés provenant des différentes fractions de l'éjaculat

P0 = spermatozoïdes épидидymaires, P1 = 10 premiers mL de la fraction « sperm ric h »), P2 = reste de la fraction « sperm rich » et P3 = fraction « post-rich ». D'après [206].

Les protéines séminales BSPs sont prédominantes dans le PS de taureau et de bœuf, avec des effets décrits sur la mobilité (pour BSP1), la formation du réservoir spermatique et la capacitation. Cette superfamille de protéines est présente chez au moins 15 espèces de mammifères [230].

Après leur fixation sur les phospholipides de la membrane des spermatozoïdes, un premier efflux de cholestérol et de phospholipides s'opère juste après l'éjaculation, en raison de la forte concentration en BSPs. Une fois l'excès de BSPs éliminé, naturellement après un accouplement ou par l'action du lait et du jaune d'œuf contenu dans les dilueurs qui les piègent [231], les BSPs restées à la surface du spermatozoïde stabilisent leur membrane. Cette élimination est importante car un contact prolongé avec les BSP en forte concentration induit la capacitation et est néfaste pour le spermatozoïde [231]. Dans l'oviducte, la liaison des BSPs aux HDL (High Density Lipoproteins) va induire un second efflux de cholestérol qui va promouvoir la capacitation. La capacitation est aussi promue par une liaison des BSP aux GAGs (Sulfated GlycosAminoGlycans), peut-être par l'activation d'une cascade de signalisation impliquant la phosphorylation des tyrosines [232]. L'effet *in vitro* des BSPs sur les spermatozoïdes peut être différent selon les isoformes, par exemple BSP1 induit dans les spermatozoïdes de taureau un efflux de cholestérol suivi d'une réaction acrosomique alors que cet effet est minime pour BSP5 [233]. Les procédures de manipulation et de conservation de la semence induisent des mécanismes similaires à la capacitation, néfastes pour le spermatozoïde (car prématurés) et les protéines du plasma séminal, dont les BSPs, sont des candidats intéressants pour empêcher/inverser ces effets. En particulier des effets opposés, protecteurs pour le spermatozoïde de bœuf et néfastes chez le taureau, ont été décrits chez ces deux espèces [234]. Produite par les vésicules séminales chez le ver, BSP1 se fixe aux spermatozoïdes et peut former un complexe protéique avec AQN1 [235, 236]. Les agrégats BSP1, AQN

et AWN, en se fixant aux GAGs de l'oviducte, pourraient participer à l'efflux de cholestérol lors de la capacitation [128].

3.5. La régulation du volume spermatique

Une osmole est une mole d'une substance entièrement dissoute dans l'eau. L'osmolarité est donc la concentration en osmole dans un volume de liquide. Dans les systèmes biologiques, elle est souvent exprimée en milliosmole par litre (mOsm/L) ou en milliosmole par Kg (mOsm/Kg). Une osmole osmotiquement active, c'est-à-dire qui ne peut pas traverser la membrane cellulaire et peut être contenue aussi bien dans le milieu intracellulaire (cytoplasme) qu'extracellulaire, va exercer une pression osmotique sur la membrane. En cas de déséquilibre entre le milieu intra et extracellulaire, de l'eau va entrer ou sortir de la cellule pour rétablir l'équilibre [237] : si le milieu extérieur est hypotonique (concentration en soluté inférieure à celle du cytoplasme), l'eau qui rentre dans la cellule provoque son gonflement et à l'inverse, un milieu extérieur hypertonique provoque un rétrécissement de la cellule [238].

Les spermatozoïdes, comme les autres types cellulaires, se comportent plus ou moins comme des osmomètres « parfaits » avec leur volume qui varie de façon linéaire sur une large plage d'osmolarité pour toutes les espèces étudiées [34]. Cette modification de volume entraîne des mécanismes de régulation par lesquels le spermatozoïde va retrouver un volume proche de son volume initial en diminuant (RVD pour « Regulatory Volume Decrease ») ou en augmentant son volume (RVI pour « Regulatory Volume Increase »).

Des canaux hydriques (aquaporines) et des canaux ioniques (efflux de potassium et de chlore) d'origine testiculaire, responsables de la perméabilité membranaire des spermatozoïdes, ont pu être identifiés comme des effecteurs de cette régulation [34, 139, 239]. Selon les espèces, cette régulation est meilleure ou acquise à la fin de la maturation épидидymaire (partie caudale de l'épididyme) grâce à une accumulation d'osmolytes dans les spermatozoïdes épидидymaires matures [240, 241]. La capacité à bien réguler son volume est importante pour que le spermatozoïde soit en mesure de s'adapter aux variations physiologiques d'osmolarité des fluides du tractus mâle et femelle.

Ces stress hypo/hyper-osmotiques vont impacter la mobilité et l'intégrité membranaire des spermatozoïdes d'autant plus intensément que les pressions sur la membrane sont fortes, mais la mobilité commencera à être impactée bien avant la viabilité [242]. Après un stress hypo- et hyper-osmotique, il a été montré que les spermatozoïdes de verrats avaient une tolérance relativement faible par rapport aux autres espèces concernant les volumes cellulaires que pouvaient atteindre les spermatozoïdes avant une baisse visible de mobilité. En effet, une variation de volume cellulaire de -1 %/+1 % de volume initial (respectivement dans des solutions hyper et hypotoniques) des spermatozoïdes de verrats commence à induire une diminution de leur mobilité alors que pour les spermatozoïdes humains, cette variation est de -25 %/+10 % [243].

Les mesures de l'osmolarité du fluide épидидymaire, pour les espèces étudiées, montrent une hypertonicité de ce fluide par rapport au plasma séminal et au fluide du tractus femelle qui sont isotoniques, comme le plasma sanguin, à environ 290 ± 5 mOsm/L [244, 245]. Ainsi, au contact du plasma séminal et dans les voies génitales femelles, les spermatozoïdes subissent un stress hypotonique physiologique, qui varie de 30 à 120 mOsm/L selon les espèces, dans les minutes suivant l'éjaculation [244, 246]. Le ver rat semble subir un stress hypotonique physiologique très modéré de 30-50 mOsm d'après les données disponibles de mesure de l'osmolarité des fluides du tractus génital de truie [247-251].

Pour mimer et mesurer ce stress hypo-osmotique, le groupe de Töpfer-Petersen a mesuré le volume cellulaire des spermatozoïdes (cinétiques, volumes de gonflement puis de rétrécissement) lors d'un stress hypo-osmotique à 180 mOsm/L, non physiologique chez les animaux d'élevage (bovin, porc, canin) [40, 252] (figure 13). La population de spermatozoïdes n'ayant pas pu réduire suffisamment son volume est considérée comme moins fonctionnelle [253]. Des différences inter- et intra-espèces ont pu être mises en évidence, avec des distributions homogènes (unimodale) ou hétérogènes (bimodale) pour le chien et le bovin, montrant l'existence de sous-population spermatiques. Chez le taureau et le verrat, les spermatozoïdes des mâles sous-fertiles présentaient un gonflement significativement supérieur aux mâles fertiles après stress hypo-osmotique [40].

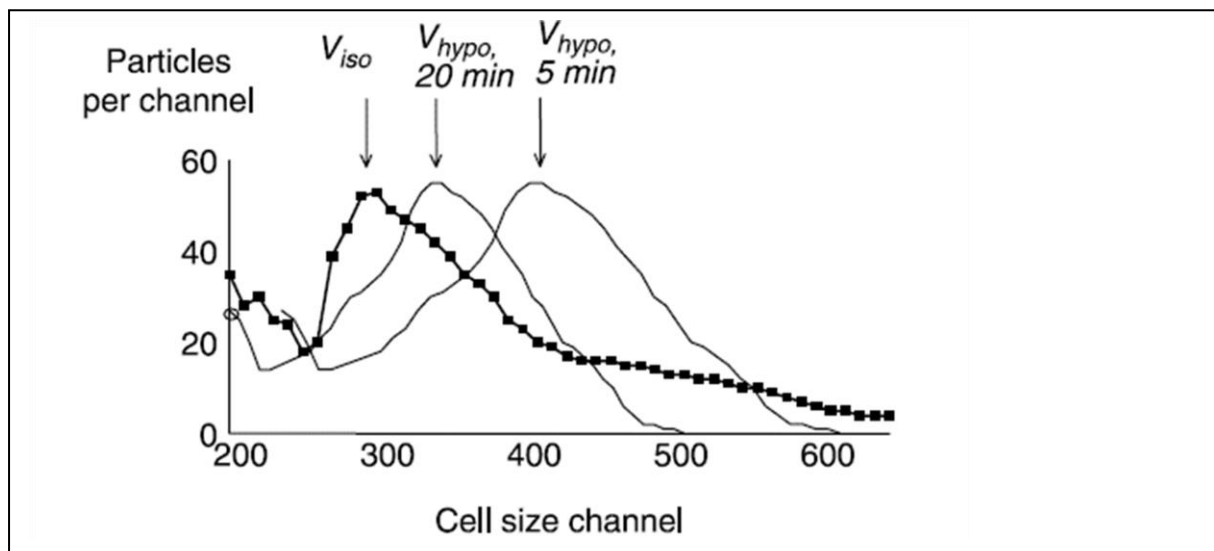


Figure 13 Courbes de distribution du volume des spermatozoïdes après stress hypo-osmotique.

Courbes représentatives du test de régulation du volume spermatique (selon les espèces étudiées par ce groupe : bovin, verrat et chien). Les courbes à 5 et 20 minutes dans un milieu hypotonique sont décalées vers la droite par rapport au milieu isotonique, indiquant que le volume cellulaire augmente. La courbe à 20 minutes est à gauche de celle de 5 min, traduisant une réduction du gonflement par le mécanisme RDV. Les mesures de volume absolu sont effectuées avec un analyseur de cellules (CASY 1 cell counter). D'après [40].

3.6. La résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique

La fluidité membranaire est une propriété qui participe peut-être à la régulation du stress hypo-osmotique [254] et elle semble importante pour la capacitation car elle augmente pendant ce processus [126].

La composition lipidique est un élément essentiel déterminant la fluidité [255] mais les protéines membranaires peuvent aussi participer à sa modulation [256]. Au cours de leur maturation épидидymaire, les spermatozoïdes vont avoir des modifications de leur contenu en lipides, protéines et sucres. En particulier, il a été mesuré une diminution du ratio cholestérol : phospholipides au cours du transit épидидymaire, en lien avec une augmentation de la fluidité membranaire [257]. Cependant, une augmentation du cholestérol est observée chez le bouc et aucune modification significative n'a été mesurée chez le verrat [257]. Comme nous l'avons vu précédemment, des quantités importantes de protéines se fixent sur les spermatozoïdes pendant l'éjaculation et cela pourrait modifier les propriétés mécaniques de la membrane et sa fluidité [193].

La fluidité et l'intégrité membranaire sont particulièrement affectées lors des procédures de refroidissement et de congélation nécessaires à la cryoconservation des spermatozoïdes [255]. En

effet, la descente en température et l'utilisation de cryoprotecteurs vont induire des changements osmotiques importants [258], qui peuvent entraîner la rupture de la membrane plasmique quand la limite de résistance osmotique des spermatozoïdes est dépassée [259]. Dans ce cadre, des différences de sensibilité entre espèces, races et individus ont pu être observées en relation avec la congélabilité de la semence [243, 260]. La fluidité/viscosité membranaire, qui dépend en partie de la composition en lipides, a été impliquée pour expliquer les différences de résistance contre les dommages dus au froid, avec notamment un ratio cholestérol : phospholipides faible qui serait défavorable, mais qui n'explique pas entièrement les effets néfastes de la cryopréservation [11, 260].

Chez le verrat, la viabilité des spermatozoïdes après un stress hypo-osmotique graduel a pu être évaluée sur une large gamme de solutions hypotoniques de 3 à 330 mOsm/L avec des sondes de viabilité cellulaire par cytométrie de flux [261]. La proportion de spermatozoïdes vivants correspondante ne varie pas de façon linéaire et elle peut être modélisée par une courbe sigmoïde. Cette courbe a permis de déterminer l'osmolarité critique qui est la valeur de l'osmolarité pour laquelle 50 % des spermatozoïdes ont perdu leur intégrité membranaire (figure 14A). Cette valeur comprise entre 150 et 200 mOsm/L correspond à un stress osmotique fort et non physiologique. Une corrélation positive de la résistance des spermatozoïdes à ce stress (déterminée par l'osmolarité critique) avec la fertilité a pu être établie (figure 14B). Une autre étude a aussi pu établir une corrélation positive entre la résistance au stress hypo-osmotique et la fertilité ainsi que la prolificité [262].

L'augmentation de la température a pour effet d'augmenter la résistance osmotique et au contraire, l'augmentation de l'oxydation (doses croissantes de peroxyde d'hydrogène) la diminue [263], suggérant un lien entre fluidité membranaire et résistance au stress hypo-osmotique. Si la température a un effet clair sur la diffusion des lipides du spermatozoïde [264], l'effet de plusieurs oxydants sur cette diffusion mesuré par la méthode FRAP (« fluorescence recovery after photobleaching ») est négatif ou faible pour l'un d'entre eux [265]. Cependant, de nombreuses études utilisant d'autres modèles cellulaires et méthodes ont pu relier la peroxydation des lipides et la fluidité membranaire [265].

Nous avons pu montrer que la résistance au stress hypo-osmotique diminue graduellement au cours de la maturation épидидymaire. En comparant des spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés, nous avons établi que la résistance des spermatozoïdes épидидymaires diminuait très fortement après éjaculation et que c'était la fraction protéique du PS qui en était responsable [263]. Chez le verrat, la contribution des protéines provenant des vésicules séminales dans la composition du PS est très importante et nous avons comparé le verrat à deux autres espèces dont la contribution est modérée (le bélier) ou nulle (le chien). En effet le chien ne possède pas de vésicules séminales. La chute importante de résistance observée pour le verrat à l'éjaculation était beaucoup plus modérée chez le bélier et absente chez le chien, chez qui les spermatozoïdes épидидymaires étaient quasiment aussi résistants que les spermatozoïdes éjaculés [266]. Ces effets ont pu être partiellement reproduit *in vitro* chez le verrat et le bélier après incubation des spermatozoïdes épидидymaires avec du PS.

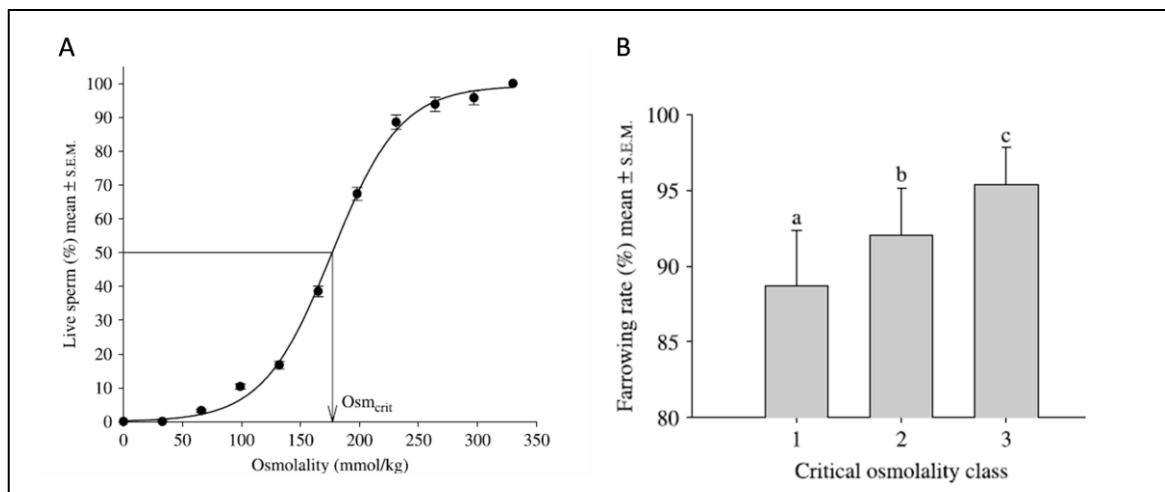


Figure 14 Evaluation de la viabilité des spermatozoïdes et de la fertilité après stress hypo-osmotique

(A) Le % de spermatozoïdes vivants en fonction des 10 points de gamme d'une solution de BTS (voir chapitre III.1) de 3 à 330 mOsm/L est modélisé par une courbe sigmoïde ($n = 12$ verrats de race Pietrain). Le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans les solutions hypotoniques est exprimé en proportion du pourcentage initial de spermatozoïdes vivants à 330 mOsm/L. L'osmolarité critique Osm_{crit} est calculée avec le modèle et définie comme la valeur de l'osmolarité pour laquelle 50 % des spermatozoïdes ont perdu leur intégrité membranaire. D'après [263].

(B) Fertilité en fonction de l'osmolarité critique des spermatozoïdes de verrot Piétrain (un total de 133 éjaculats, provenant de 11 verrats, ont été collectés pour la réalisation de 922 inséminations). Le % de « Farrowing rate » est le % de truie effectuant une mise bas par rapport au total des truies inséminées. D'après [263].

Pour préciser le rôle des protéines dans cette résistance, 8 verrats, dont les spermatozoïdes présentaient une résistance au stress hypo-osmotique contrastée, ont été sélectionnés pour étudier le lien entre la résistance osmotique et les protéomes des spermatozoïdes et du PS. La figure 15 représente la comparaison des protéomes des spermatozoïdes issus de ces verrats.

L'analyse des protéomes de spermatozoïdes de verrats permet de refléter leurs résistances au stress hypo-osmotique et il se traduit par des différences d'abondance de certaines protéines. En effet, l'ordre dans lequel sont classés les verrats avec le regroupement hiérarchique des profils protéiques des spermatozoïdes correspond presque parfaitement à celui du classement selon leur résistance au stress hypo-osmotique.

Les protéines négativement corrélées à la résistance osmotique comprennent majoritairement des protéines originaires du plasma séminal telles que la fibronectine, certaines spermadhésines (AQN1, PSPI, PSP II) et WGA16. L'analyse en parallèle du plasma séminal ne montre aucune corrélation entre quantité de ces protéines et leur degré de fixation sur les spermatozoïdes. Ajoutée *in vitro* aux spermatozoïdes épидидymaires, nous avons confirmé que la fibronectine diminuait leur résistance au stress hypo-osmotique. Plusieurs protéines positivement corrélées à la résistance, originaires de l'épididyme et du testicule, ont des fonctions associées à la mobilité et à la résistance au stress oxydatif (Tsikis *et al*, en préparation).

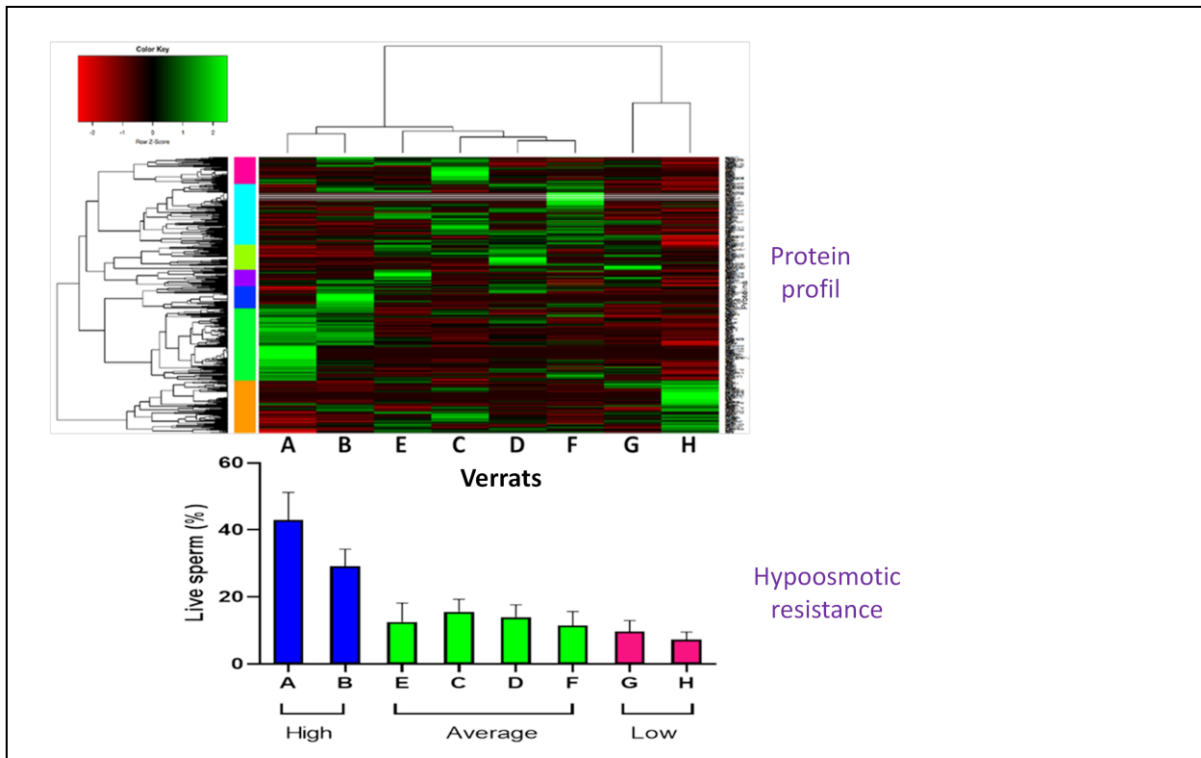


Figure 15 Evaluation de la résistance au stress hypo-osmotique de spermatozoïdes éjaculés et dendrogramme de leur protéomes

Huit verrats (A à H) ont été évalués pour la résistance de leurs spermatozoïdes au stress hypo-osmotique (en bas). Le classement des verrats selon leur protéome suit quasiment leur classement selon le critère de la résistance au stress hypo-osmotique. D'après Tsikis et al, en préparation.

II. Hypothèse et objectifs scientifiques

Au cours de leur migration dans le tractus femelle, les spermatozoïdes sont soumis à différents stress, notamment un stress osmotique. Seule une sous-population spermatique arrivera à franchir les barrières physiologiques du tractus pour arriver jusqu'au site de fécondation.

Au sein de notre équipe de recherche, nous avons montré que la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique est corrélée positivement à la fertilité. Une diminution importante de cette résistance est associée à une forte abondance des protéines séminales majeures sur la surface des spermatozoïdes, les spermadhésines et la fibronectine. L'hypothèse qui peut être posée sur la base de ces résultats est qu'il y a un lien entre l'abondance de ces protéines, en particulier la fibronectine, à la surface des spermatozoïdes et leur migration dans les voies génitales femelle. Un moyen pour tenter de répondre à cette question serait de quantifier la migration spermatique dans le tractus femelle de la semence de verrats de faible et de forte résistance au stress hypo-osmotique.

Dans ce but, trois objectifs principaux ont été définis :

- 1) Mettre en place les outils de la quantification de la migration spermatique chez la truie. Des outils basés sur l'imagerie de fluorescence ont déjà été développés dans notre équipe sur les espèces ovines (Cellvizio, Scanner de lame et Ivis Spectrum) et équines (Cellvizio) pour quantifier la migration spermatique. L'adaptation de ces méthodes dans l'espèce porcine consistera à définir la concentration et la méthode de marquage pour le fluorochrome (R18) déjà employé avec ces outils. De plus, nous évaluerons de nouveaux fluorochromes pour développer des marquages différentiels qui seront utilisés pour comparer deux situations physiologiques différentes : des spermatozoïdes faiblement ou fortement résistants au stress hypo-osmotique (3^e partie du projet),
- 2) Réaliser le phénotypage de la migration spermatique chez la truie et évaluer la variabilité entre femelles,
- 3) Mesurer l'impact de la résistance osmotique des spermatozoïdes sur leur transit dans le tractus génital de truie.

III. Matériel et méthodes

1. Doses de semence de verrats

Les doses de semence de verrats ont été fournies par la coopérative française YXIA (centres d'inséminations, sites de Mésanger (44) et Molac (56)). Elles contenaient des spermatozoïdes à la concentration de 19-25 millions/mL dans le dilueur commercial Kobidil+, soit 1.5 à 2 milliards de spermatozoïdes dans 80 mL de Kobidil+. Ce milieu est basé sur la composition du milieu BTS (*Beltsville Thawing Semen extender [13]*) : (en g/L) 37 glucose ; 1,25 EDTA; 6 citrate de sodium ; 1,25 bicarbonate de sodium et 0,75 chlorure de potassium ; gentamycine 200 mg/mL ; pH 7,3 ; 330 mOsm/L).

Les semences ont été collectées entre le dimanche après-midi et le lundi matin puis expédiées pour être reçues le lundi en fin d'après-midi. Elles peuvent être conservées à 17 °C pendant trois jours après la collecte sans perte de pouvoir fécondant.

Dans nos expériences, nous avons utilisé des doses hétérospermiqes (3 à 5 verrats en mélange dans la dose) ou homospermiqes (1 verroat). Les avantages des doses hétérospermiqes mis en avant par la coopérative d'IA YXIA sont une amélioration de la qualité globale de la dose qui permet de maximiser les résultats de reproduction (augmentation de la fertilité et prolificité). Il a été démontré qu'au sein d'un mélange de spermatozoïdes de verrats, certains spermatozoïdes d'un verroat du mélange fécondaient préférentiellement les ovocytes [67]. Ainsi, en mélangeant plusieurs semences de verrats, il est possible qu'un verroat moins fertile soit compensé par les spermatozoïdes des autres verrats du mélange. Pour le 1^e objectif, nous voulions avoir une première réponse globale sur l'effet des fluorochromes sur la mobilité et leur détection. Nous avons donc utilisé des doses hétérospermiqes pour limiter l'effet verroat . Pour les fluorochromes intéressants , l'effet du verroat a ensuite été évalué avec des doses homospermiqes. Pour le phénotypage de la migration spermatique, nous nous intéressions à la variabilité femelle, mais nous avons utilisé plusieurs lots de semence hétérospermiqes différentes (pas les mêmes mâles en mélange entre doses hétérospermiqes) pour prendre en compte aussi des effets verrats dans ce phénotypage ». Pour le 3^e objectif, au cours duquel nous avons identifié des spermatozoïdes de mâles individuels dont la résistance au stress hypo-osmotique était contrastée, nous avons évalué la capacité de migration spermatique de ces verrats de manière individuelle.

2. Préparation du dilueur

Deux concentrations de dilueur ont été préparées, une concentration 1X pour la dilution et les lavages des spermatozoïdes et une concentration de 10X uniquement pour la préparation du milieu de lavage Percoll.

Kobidil+ 1X

Un sachet de milieu Kobidil+ (YXIA, ref 501) a été dilué dans de l'eau désionisée puis ajusté au volume final de 1L pour obtenir une solution à 330 mOsm/L, pH 7-7,3. La solution a été conservée à 4 °C pendant 15 jours.

Kobidil+ 10X

Un sachet de milieu Kobidil+ a été dilué dans de l'eau désionisée puis ajusté au volume final de 100mL. Une dilution au 1/10 est effectuée sur un prélèvement de cette solution pour vérifier l'osmolarité à 330 mOsm/L et le pH à 7-7,3. Des aliquotes de 10 mL et 1 mL ont été congelés à -20 °C.

3. Analyse des mobilités et des concentrations spermatiques au CASA

Le CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) est un appareil combinant la capture et l'analyse d'images dédié à la mesure de la mobilité des spermatozoïdes.

L'évaluation de l'impact de l'incubation des fluorochromes sur la mobilité des spermatozoïdes a été réalisée avec un CASA ancienne génération (HTMIVOS v. 12; Hamilton–Thorne, Beverly MA, Etats-Unis) et une cellule de Makler (Sefi Médical Instrument, Haifa, Israël) de profondeur de 10µm pour le dépôt des spermatozoïdes pour 11 fluorochromes (de mars à octobre 2021). Cette évaluation a été poursuivie avec un CASA nouvelle génération (IVOS II, Hamilton–Thorne, Beverly MA, Etats-Unis) et une chambre jetable Cellvision (réf. CV 1020-4cv, CellVision technologie, Heerhugowaard, Pays-Bas) de profondeur de 20µm pour le dépôt des spermatozoïdes pour les 13 fluorochromes suivants. Le principe de l'outil CASA, applicable aux deux CASA ancien et récent, et les protocoles plus spécifiquement établis pour chacun des deux systèmes sont explicités ci-dessous.

Le CASA est un outil semi-automatique pour l'analyse du sperme. Il permet de mesurer la concentration, plusieurs paramètres de la motilité et de la morphologie des spermatozoïdes. Le système est composé d'une platine thermostatée et motorisée sur laquelle est déposée une chambre de verre de profondeur fixe (20 µm).

Les spermatozoïdes sont observés grâce à un microscope à contraste de phase négatif (grossissement X100) qui permet de voir les spermatozoïdes, grâce à leur réfringence, en blanc sur fond noir. L'image des spermatozoïdes est numérisée par l'intermédiaire d'une caméra numérique couplée à un logiciel d'analyse d'image.

L'identification du spermatozoïde est réalisée par le logiciel selon trois critères morphologiques dont les paramètres sont spécifiques de l'espèce : la surface, l'élongation (rapport longueur/largeur) et la réfringence de la tête du spermatozoïde. La position d'un spermatozoïde est définie par le centre de sa tête et la trajectoire d'un spermatozoïde est alors reconstruite à partir de la succession de ses différentes positions sur 30 images successives. La proportion de spermatozoïdes mobiles est déterminée grâce à l'analyse des 10 premières images uniquement (pour limiter l'effet de la collision des spermatozoïdes entre eux) tandis que les paramètres cinétiques sont déterminés à partir de la totalité des 30 images.

Parmi les spermatozoïdes mobiles, une catégorie nommée mobilité progressive correspond aux spermatozoïdes ayant une linéarité de trajectoire = critère STR > 45 % et une vitesse sur le parcours lissé VAP > 45 µm/s pour les spermatozoïdes porcins (figure 16). Les paramètres de morphologie (angulation et courbure du flagelle, position proximale ou distale de la gouttelette cytoplasmique) permettent la détection de certaines anomalies spermatiques (figure 16).

Les spermatozoïdes ont été analysés à une concentration d'environ 20 millions/mL car la gamme de concentration en spermatozoïdes compatible avec l'analyse CASA est comprise entre 10 et 30 millions/mL.

CASA ancienne génération + cellule de Makler

Pour l'analyse, trois dépôts ont été réalisés par échantillon. Un quatrième dépôt a été parfois nécessaire si l'un des dépôts n'est pas analysable (présence de bulle). Pour chaque dépôt, 3 champs ont été acquis séquentiellement, la moyenne des 3 champs a été calculée puis l'opération a été répétée deux fois ; au final 9 valeurs par échantillon ont été obtenues. Des analyses statistiques non paramétriques de Kruskal-Wallis et Mann Whitney ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, Boston, MA, Etats-Unis) pour comparer deux échantillons différents.

CASA nouvelle génération (Ivos II) + lame CellVision

Comme les dépôts en lames Cellvision généraient moins de champs non analysables par rapport au système Makler, où des bulles étaient présentes, seulement 2 dépôts ont été réalisés par échantillon. Pour chaque dépôt, 6 champs ont été analysés puis la moyenne des 6 champs est calculée : au final 2 valeurs par échantillon ont été obtenues. Il n'y avait pas d'analyse statistique réalisable pour deux valeurs, mais ces valeurs moyennes provenaient bien d'une analyse individuelle pour chaque

spermatozoïde et le nombre requis, soit au moins 200 spermatozoïdes analysés, a été respecté (recommandations OMS 2010).

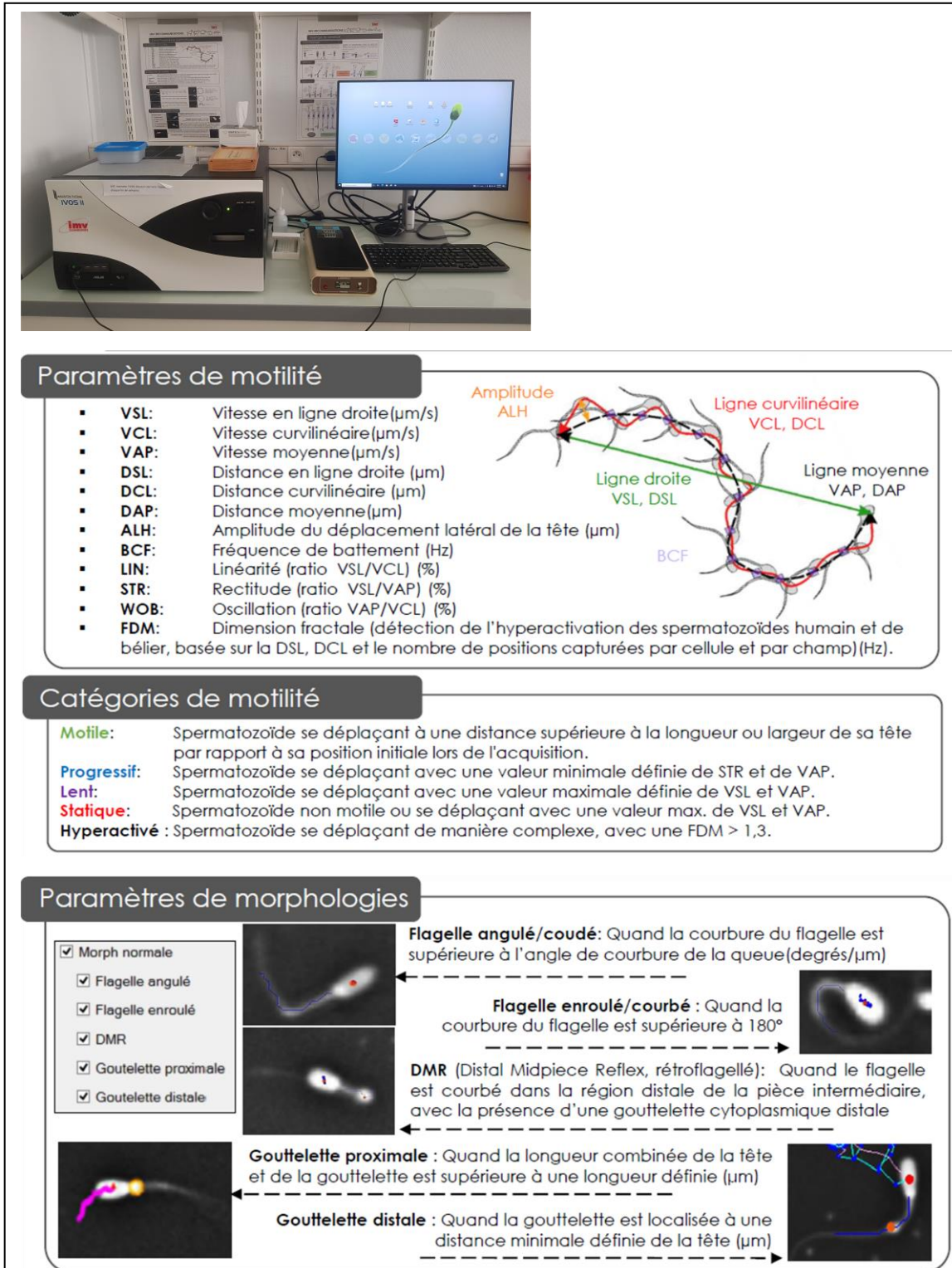


Figure 16 Présentation du CASA

En haut : photo de l'IVOS II du laboratoire. Définition des paramètres de motilité, catégories de motilité et paramètres de morphologies des spermatozoïdes évalués par CASA.

4. Synchronisation des cochettes et insémination artificielle

La préparation des cochettes a été réalisée au sein de l'unité UEPAO porcine (*Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière porcine*). Le protocole mis en place pour la réalisation d'une seule IA est repris de la publication de Driancourt *et al*, 2013 [267].

Les chaleurs des cochettes ont été synchronisées avec un analogue de la progestérone (altrénogest) administré par voie orale à raison de 20 mg d'ALTRESYN (CEVA SANTE ANIMALE, France) / animal pendant 18 jours. Ensuite, la synchronisation des ovulations a été effectuée avec une injection sous-cutanée d'un analogue du GnRH (buséréline), à raison de 10 µg de RECEPTAL (MSD, santé animal, France) / animal 120 h après arrêt du traitement ALTRESYN. Trente-trois heures après arrêt du traitement Buséréline, 1,5 à 2 milliards de spermatozoïdes préalablement marqués avec les fluorochromes puis resuspendus dans 80 mL de milieu Kobidil+ ont été inséminés.

5. Outils d'analyse d'image et validation des fluorochromes

5.1. Outils d'analyse d'image pour la quantification de la migration spermatique

Le premier objectif de mon projet de recherche consistait à développer des méthodes de quantification de la migration spermatique dans le modèle porcin. Ensuite les méthodes les plus adaptées ont été mises en œuvre pour mesurer l'effet de la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique sur cette migration.

Trois outils d'imagerie de fluorescence, disponibles sur le centre INRAE-Val-de-Loire à Nouzilly (37), ont été envisagés pour réaliser cette quantification (tableau 2). Ces outils, qui nécessitaient tous un marquage des spermatozoïdes en amont avec des composés fluorescents, différaient au niveau de leur utilisation et de leurs sensibilités pour la détection des spermatozoïdes.

	Longueur d'onde Emission (nm)	Résolution (µm)	Type d'analyse
Cellvizio dual band	2 bandes λ = 502-633 nm λ = 673-800 nm	1,4 µm à 3,3 µm (selon la fibre optique)	Lumière du tractus <i>in vivo</i>
IVIS-Spectrum	28 filtres λ = 430 à 850 nm	20 à 1000 µm (selon le champ de vision)	Tractus <i>ex vivo</i>
Scanner de lame AxioScan	7 cubes λ = 365 à 740 nm	0,3 à 1,2 µm (selon l'objectif)	Lumière ou cellule du tractus <i>ex vivo</i> après rinçage

Tableau 2 Caractéristiques des différents appareils d'imagerie

Longueurs d'ondes d'émission, résolution et type d'analyse pour les outils Cellvizio, IVIS Spectrum et scanner de lames.

L'imagerie CellVizio (Mauna Kea Technologies, Paris, France) a permis de visualiser individuellement les spermatozoïdes *in vivo* en insérant une fibre optique dans le tractus femelle. Cette technologie a été utilisée chez la brebis [95, 268] et la jument (en cours de publication) et elle a constitué le seul outil permettant de visualiser *in vivo* les spermatozoïdes avec une résolution microscopique chez les gros mammifères d'élevage. Chez la truie/cochette anesthésiée, les cornes utérines et la jonction utéro-tubaire devraient pouvoir être imagées avec une fibre optique de 1,5 mm comme cela a été réalisé

chez la brebis. Pour l'oviducte, dont la lumière est plus étroite, une fibre optique de 0,6 mm de diamètre pourrait être utilisée. Les séquences vidéo (12 images / sec) obtenues permettent d'identifier les spermatozoïdes et également de réaliser une analyse de type CASA (mobilité) *in vivo*.

L'imagerie IVIS Spectrum (Perkin Elmer, Wellesley, Etats-Unis) et scanner de lames AxioScan Z₁ (ZEISS, Oberkochen; Allemagne) peuvent être mises en œuvre exclusivement *ex vivo* et nécessitent l'abattage des animaux. L'IVIS Spectrum ne permet pas de voir les spermatozoïdes individuellement, en revanche la fluorescence des spermatozoïdes présents à l'intérieur d'un ou plusieurs organes, si le tissu n'est pas trop épais, peut être quantifiée avec un large champ de vision (23 cm) à la résolution minimale. Avec le scanner de lames, les spermatozoïdes doivent être sortis de l'organe puis déposés entre lame et lamelle pour être comptés individuellement. Ces outils d'imagerie permettent de visualiser au moins deux fluorochromes à des longueurs d'onde distinctes, offrant ainsi la possibilité de faire des marquages différentiels et de comparer deux populations spermatisées (deux verrats ou deux traitements) après insémination chez la même femelle.

5.2. Validation des fluorochromes

5.2.1. Stratégie de recherche des fluorochromes

Les fluorochromes ont été recherchés en fonction des caractéristiques des outils envisagés pour faire la quantification des spermatozoïdes dans le tractus femelle et selon leur toxicité éventuelle, si elle avait été décrite dans les articles scientifiques ou dans les fiches des fournisseurs. Le Cellvizio dual band permettait de différencier 2 plages de longueur d'onde, la première allant du vert au rouge (500 à 620 nm) et la seconde étant dans le proche infrarouge (680 à 800 nm). Le fluorochrome R18 avait déjà été validé avec le Cellvizio, utilisant la première plage de longueur d'onde (500 à 620 nm), chez la brebis et la jument, avec le scanner de lames [269] et l'IVIS Spectrum chez la brebis. Ce fluorochrome a donc été le premier candidat choisi pour être validé sur le modèle porcin. Pour comparer deux populations de spermatozoïdes, chacune marquée avec un fluorochrome différent (marquage différentiel), un second fluorochrome a été recherché, en particulier dans une longueur d'onde détectable dans la seconde plage de longueur d'onde du Cellvizio (680 à 800nm, proche infrarouge), pour le différencier du R18. Le scanner de lames et l'IVIS Spectrum permettaient utilisation d'une large gamme de fluorochromes et pourraient aussi être utilisés avec un fluorochrome infrarouge, dans la limite de 740 nm pour le scanner de lames. Il a été évalué au laboratoire que le Cellvizio est environ 10 fois moins sensible que le scanner de lames. Ainsi la majorité des fluorochromes ont été évalués tout d'abord avec le Cellvizio quand ils étaient compatibles, pour s'assurer d'une détection possible avec les deux outils qui étaient complémentaires. Comme l'intensité de la fluorescence des spermatozoïdes marqués était susceptible de diminuer pendant les heures qui suivaient l'insémination, la détection des spermatozoïdes *in vitro* avec le Cellvizio signifiait un marquage intense du spermatozoïde, qui pourrait être probablement détecté après insémination au moins avec le scanner de lames. De plus, la détection au Cellvizio est immédiate (fibre optique plongée directement dans le tube).

La détection avec l'IVIS Spectrum sera réalisée ultérieurement avec les fluorochromes candidats car la détection du fluorochrome au travers un tissu biologique devra être validée avec l'appareil.

En première approche, une large gamme de concentration du ou des fluorochromes (cas de double marquage) est testée puis la concentration est affinée en fonction des résultats de toxicité. Une fois validé *in vitro*, une insémination est réalisée avec le fluorochrome candidat. La diffusion des fluorochromes a été aussi évaluée.

5.2.2. Critères de validation des fluorochromes pour le marquage des spermatozoïdes

La validation des fluorochromes a nécessité le respect de plusieurs critères:

- La non-toxicité et donc l'absence d'effet négatif sur la mobilité des spermatozoïdes ;

L'effet du fluorochrome sur la mobilité a été déterminé en évaluant plusieurs concentrations par rapport à un contrôle (spermatozoïdes non marqués lavés) traité dans les mêmes conditions. La mobilité a été évaluée à J0 (le jour de l'ouverture de la dose de semence) et à J1 (le lendemain de l'ouverture de la dose) pour certains fluorochromes. Cette mesure à J1 n'a pas été prise en compte comme critère de validation mais elle donnait une indication de la toxicité à plus long terme des fluorochromes.

- La détection avec les outils d'imagerie et la stabilité des fluorochromes ;

Cette détection a tout d'abord été réalisée en tube (*in vitro*) avant d'envisager une détection après insémination artificielle. La fluorescence devait durer au minimum 3 à 24 h *in vivo*, le temps entre l'IA et l'abattage en tenant aussi compte du temps d'analyse des échantillons, soit plusieurs jours.

- La localisation et l'homogénéité du marquage au niveau de la tête et du flagelle ;

Le marquage devait idéalement être réparti sur la tête et tout ou partie du flagelle (pièce intermédiaire) pour permettre la détection de la forme du spermatozoïde. Si besoin, des combinaisons de plusieurs marquages pourraient être mises en œuvre pour obtenir à un marquage satisfaisant.

- L'absence de diffusion importante du fluorochrome ;

L'absence de diffusion du fluorochrome dans le milieu était importante pour les expérimentations avec des marquages différentiels car ils devraient utiliser deux fluorochromes que l'on pourrait distinguer. Si les fluorochromes diffusaient, ils pourraient alors aller marquer les spermatozoïdes non marqués initialement avec ce fluorochrome, ce qui gênerait ou empêcherait la distinction des deux marquages. Des tests *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés pour apprécier cette diffusion.

Au total, 23 fluorochromes, dont 17 en monomarquage et 6 en double marquage (tableau 3 partie Résultat IV.1 et annexe 1 partie Annexes), ont été évalués à plusieurs concentrations avec des spermatozoïdes issus d'un lot de doses hétérospermiqes (mélange de 3 à 5 mâles) dans les 1 à 3 jours après réception des doses. Pour certains fluorochromes, deux lots de semence hétérospermiqes ont été utilisés pour leur évaluation (voir tableau en annexe).

5.2.3. Préparation et marquage des spermatozoïdes

Le jour des expérimentations, les doses de semence de verrats conservées à 17°C ont été sorties à température ambiante puis le fluorochrome a été ajouté directement dans le volume prélevé de la dose. Le marquage des spermatozoïdes a été effectué pendant 15 min à 37 °C (sauf indication contraire). Ensuite, deux types de lavages par centrifugation ont été réalisés pour retirer le fluorochrome du milieu : un lavage simple avec du Kobidil+ ou bien un lavage Percoll, plus efficace mais plus long et plus compliqué à réaliser. Le lavage simple a été utilisé dans le cadre de l'évaluation des fluorochromes *in vitro*, sans marquage différentiel, car il suffisait pour avoir une réponse sur la détection ou non de la fluorescence au Cellvizio. Pour les IA, le lavage Percoll a été utilisé pour s'assurer qu'il ne restait pas de fluorochrome dans le milieu qui aurait pu colorer les cellules utérines après l'insémination. Le lavage Percoll a aussi été utilisé pour les marquages différentiels pour s'assurer qu'il ne restait pas de fluorochrome dans le milieu qui aurait pu colorer les spermatozoïdes non marqués initialement lors du mélange des deux conditions.

5.2.3.1. Lavage au Kobidil+

Ce lavage va permettre le retrait du fluorochrome en excès par centrifugation. Après marquage, les spermatozoïdes ont été centrifugés à 2400 g pendant 3 min à 20 °C, le surnageant a été retiré puis le culot a été resuspendu dans un volume de Kobidil+ équivalent au volume initial, avec une supplémentation de BSA (concentration finale = 0,3 %) dans le cas des analyses CASA (pour empêcher les spermatozoïdes d'adhérer à la surface des lames Cellvision).

5.2.3.2. Lavage sur Percoll

Le Percoll est composé de particule de silicates colloïdales recouvertes de polyvinylpyrrolidone en suspension dans de l'eau et il permet de réaliser un milieu à gradient de densité. Le gradient de Percoll en deux couches 45 % / 90 % (1 volume / 1 volume) a été généralement utilisé pour enrichir l'échantillon en une sous population de spermatozoïdes hautement mobiles [270] mais dans nos expérimentations, nous voulions seulement obtenir un lavage plus efficace que le lavage simple au Kobidil+, sans enrichissement, pour un lavage optimal des fluorochromes. Il a donc été réalisé un Percoll 30 % (9 vol), laissant passer a priori tous les spermatozoïdes, puis une seconde couche de Percoll 90% (1 vol) de faible volume a été déposée au fond du tube pour éviter la compaction des spermatozoïdes et faciliter leur resuspension [271]. Ensuite un même volume de spermatozoïdes que celui du gradient a été déposé au-dessus du Percoll 30%. Après la centrifugation, le milieu qui contenait les spermatozoïdes va rester au-dessus du milieu Percoll 30% par différence de densité alors que les spermatozoïdes vont descendre dans le fond du tube (figure 17).

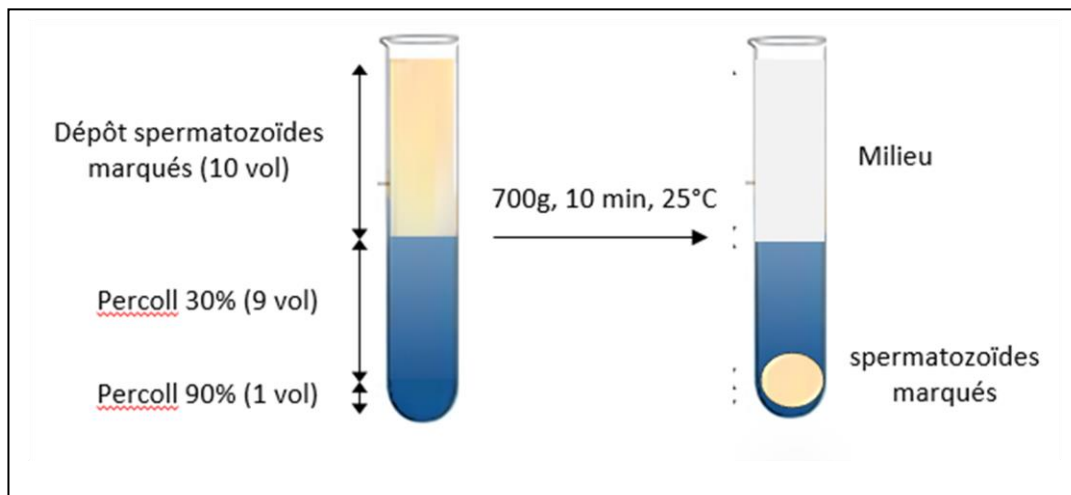


Figure 17 Schéma de dépôt des spermatozoïdes sur gradient de Percoll 30 % / 90 %

Le Percoll ayant une faible osmolarité (15 mOsm/L), une solution de Kobidil+ 10X a été utilisée pour préparer un Percoll isotonique en diluant cette solution 10X avec le Percoll. Le volume pris par les particules de silicates dans le Percoll entraînait un volume réel de liquide inférieur au volume mesuré, une dilution avec un rapport 1 pour 11 a donc été effectuée pour compenser ce volume en moins [272]. Toutes les solutions ont été préalablement ramenées à une température de 20-25°C

Préparation du Percoll 100% isotonique :

1 volume de Kobidil+ 10 X a été ajouté à 11 volumes de Percoll pur. L'osmolatité de cette solution est à 300-315 mOsm/L et le pH = 8-8,5,

Préparation du Percoll 30%

3 vol de percoll 100% est mélangé à 7 vol de Kobidil+ 1X

Préparation du Percoll 30%

9 vol de percoll 100% est mélangé à 1 vol de Kobidil+ 1X

Réalisation du gradient 30/90 % (9 vol/1 vol)

La solution à 30 % de Percoll a été déposée dans un tube puis la solution à 90 % a été déposée dans le fond du tube en passant à travers la solution de 30 % Percoll.

Dépôt et lavage des spermatozoïdes

Le même volume de spermatozoïdes que celui du gradient a été doucement déposé sur le gradient puis il a été centrifugé pendant 10 minutes à 700 g à 25 °C. Ensuite, le surnageant a été retiré puis le culot de spermatozoïdes a été resuspendu dans un volume de Kobidil+ égal à 75 % du volume initial pour retrouver la concentration initialement déposée (environ 25 % de perte de spermatozoïdes), avec une supplémentation de BSA (concentration finale = 0,3 %) dans le cas des analyses CASA.

5.2.4. Mesure de la diffusion des fluorochromes

Afin de comparer deux populations de spermatozoïdes marqués avec des fluorochromes différents, il était nécessaire de s'assurer que les fluorochromes étaient correctement lavés et qu'ils ne diffusaient pas entre les spermatozoïdes après le lavage.

Pour évaluer l'efficacité du lavage, le surnageant de spermatozoïdes marqués avec le fluorochrome à évaluer a été récupéré après lavage puis incubé avec des spermatozoïdes non marqués pendant 30 min à 37°C. Ces spermatozoïdes ont été analysés au scanner de lames pour voir si une fluorescence était détectée.

Pour évaluer la diffusion des fluorochromes, des essais *in vitro* et après insémination ont été réalisés. Cette diffusion des fluorochromes peut s'effectuer à partir du moment où l'on mélange les spermatozoïdes différentiellement marqués, dans le tractus femelle et après la collecte des spermatozoïdes récupérés après l'IA. Les spermatozoïdes après insémination n'étant pas forcément proches les uns des autres dans le tractus femelle, probablement moins proches que quand ils sont culotés au fond d'un tube, les incubations *in vitro* ont été réalisées non pas à 37°C mais à 17°C ou à 4°C avec un temps assez long (24h). Ces essais *in vitro* ont été réalisés en première intention avant les inséminations.

Un mélange a été constitué avec 50% de spermatozoïdes doublement marqués (R18 + le fluorochrome à évaluer) et 50% de spermatozoïdes monomarqués au R18 puis ce mélange a été incubé à 4 °C ou à 17 °C ou inséminé. La température de 4°C a été choisie pour évaluer si la diffusion qui avait été observée pour certains fluorochromes à 37°C et à température ambiante pouvait être stoppée à 4°C. Comme les spermatozoïdes récupérés après insémination sont conservés à 4°C, cela permettrait de limiter cette diffusion et éventuellement d'utiliser ces fluorochromes pour le marquage différentiel. Au bout de 24 h après les incubations et 3 h après les inséminations, les fluorescences ont été détectées au scanner de lames. La fluorescence du R18 a servi à dénombrer tous les spermatozoïdes et l'histogramme de distribution de l'intensité du fluorochrome à évaluer a servi à observer sa répartition dans toute la population des spermatozoïdes pour déterminer si plus de 50% de cette population était marqué par ce fluorochrome.

5.2.5. Analyse des spermatozoïdes en tube au Cellvizio

Le Cellvizio Dual Band est un endomicroscope confocal à fluorescence, un outil d'imagerie par fibre optique. Chaque fibre optique est en fait un assemblage de plus de 10 000 filaments de verre. C'est un endomicroscope car il réalise des images de résolution spatiale de l'ordre du micron (entre 1 et 3 µm), et il est équipé de deux sources d'excitation laser ($\lambda = 488$ et 660 nm) et de deux modules de détection de fluorescence sur des plages de longueurs d'onde de $\lambda_1 = 502-633$ et $\lambda_2 = 673-800$ nm. Différentes fibres optiques peuvent être utilisées selon le diamètre, la résolution et la section optique désirés.

Dans notre étude, une fibre de 1,5 mm de diamètre et de résolution spatiale de 3 μm , compatibles avec la taille des spermatozoïdes et le diamètre de la cavité de l'utérus de truie a été utilisée. Les analyses avec le Cellvizio ont été réalisées au sein de la plateforme INRAE PIXANIM.

Les spermatozoïdes sont marqués avec les fluorochromes, lavés au Kobidil+ puis imagés *in vitro* dans un tube. Le Cellvizio a d'abord été calibré à $\lambda = 488$ et 647 nm avec des solutions étalon de fluorochromes. La visualisation des spermatozoïdes a été réalisée en plongeant la fibre optique dans le tube placé dans un bain-marie à 37 °C. Une acquisition vidéo de 1 minute a été enregistrée pour chaque fluorochrome. L'absence d'émission de fluorescence a été vérifiée dans l'autre module de détection du Cellvizio.

5.2.6. Analyse des spermatozoïdes au scanner de lames

Les analyses avec le scanner de lames sont réalisées au sein de la plateforme INRAE PIC (Plateau d'Imagerie Cellulaire).

Le scanner de lames AxioScan Z1 est un microscope à épifluorescence qui permet de visualiser et de numériser automatiquement des lames avec des échantillons biologiques. C'est un système composé d'un microscope droit équipé d'objectifs 5 X à 40 X et d'un chargeur de 100 lames standard. Il est relié à un ordinateur équipé du logiciel de pilotage et de visualisation Zen Blue. Il est doté de 7 cubes de filtres de fluorescence permettant un large choix de fluorochromes dans des longueurs d'onde d'excitation/émission allant de l'ultraviolet (350 nm) au rouge lointain (740 nm).

Les spermatozoïdes marqués avec les fluorochromes puis lavés au Kobidil+ ont été déposés dans des chambres de verre calibrées ou entre lame et lamelle. Une acquisition avec le scanner de lames a été effectuée avec l'objectif 10X.

5.2.7. Analyse des spermatozoïdes à l'IVIS Spectrum

L'IVIS Spectrum est un système d'imagerie à haute résolution pour petit animal qui permet de suivre *in vivo* des traceurs fluorescents et bioluminescents et de les quantifier (technique semi-quantitative car le signal dépend fortement de la profondeur, donc de l'épaisseur du tissu). L'instrument est équipé de 10 filtres d'excitation et de 18 filtres d'émission (longueurs d'onde s'étendant de 430 nm à 850 nm). Grâce à des acquisitions séquentielles avec des combinaisons de filtres d'émission et d'excitation, l'algorithme du logiciel effectue un « démixage » spectral qui permet de réattribuer le signal spécifique à chaque fluorochrome et de retirer le bruit de fond dû aux tissus en cas de colorations multiples. Les analyses avec l'IVIS Spectrum ont été réalisées par Isabelle Lantier, ingénieur de la plateforme INRAE Image'in, qui a effectué l'acquisition et le traitement des images.

Analyse de spermatozoïdes déposés en goutte

Les spermatozoïdes contrôles (non marqués) et marqués ont été incubés 15 min à 37 °C puis lavés sur Percoll. Dix dilutions successives, de 586 à $6 \cdot 10^5$ spermatozoïdes ont été déposés en goutte de 20 μL sur une surface plane hydrophobe puis la fluorescence a été mesurée à différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

Analyse de spermatozoïdes après injection dans le tractus *ex vivo*

Pour les expérimentations *ex vivo*, les spermatozoïdes contrôles (non marqués) et marqués puis lavés ont été injectés et répartis (en massant / bougeant le tractus) *ex vivo* dans un tractus femelle de cochette (récupérée à l'abattoir de l'unité UEPAO). Deux à 3 heures après une incubation du tractus à 37°C dans étuve sèche, le tractus étant humidifié par des compresses imbibées de Kobidil+, les organes ont été déposés sur le plateau de IVIS Spectrum pour faire l'acquisition.

Analyse des spermatozoïdes après IA

Les spermatozoïdes marqués et lavés, soit $1,2 \cdot 10^9$, ont été inséminés chez une cochette. Puis 1,5 h après la cochette est euthanasiée et le tractus génital a été disséqué puis déposé sur le plateau de IVIS

Spectrum pour faire l'acquisition. Les spermatozoïdes marqués et les fluorochromes ont été déposés en même temps en goutte comme témoins positifs. A l'issue de l'analyse, le tractus est disséqué pour rincer les cornes utérines. Le comptage du nombre de spermatozoïdes par région a été réalisé au scanner de lames par la détection des spermatozoïdes fluorescents.

6. Quantification de la migration spermatique au scanner de lames et logiciel Qupath

Ce protocole a été établi suite aux résultats de validation des fluorochromes (cf. [chapitre IV.1](#)). Un fluorochrome émettant dans le proche infrarouge était nécessaire pour mettre en œuvre un marquage différentiel avec le Cellvizio, mais malgré l'évaluation de 11 fluorochromes, aucun n'a été validé comme étant à la fois stable après insémination et sans diffusion. Une méthode de quantification par scanner de lames avec les fluorochromes CFSE (fluorescence verte) et R18 (fluorescence orangée) qui pouvaient bien être distingués par le scanner a donc été développée.

6.1. Dissection du tractus et collecte des spermatozoïdes

Trois heures après l'IA, la cochette a été euthanasiée dans l'abattoir de l'unité et le tractus a été transporté dans le laboratoire pour la dissection. Une photo du tractus et des ovaires a été effectuée ainsi que le comptage du nombre de follicules et/ou d'ovulations. Du Kobidil+ froid (4 °C) a été utilisé pour les rinçages de la lumière des organes. La partie du tractus situé au flanc gauche de la cochette a été désignée comme le côté gauche et celle sur le flanc droit comme le côté droit. Les 7 régions disséquées sont identifiées dans la [figure 18](#).

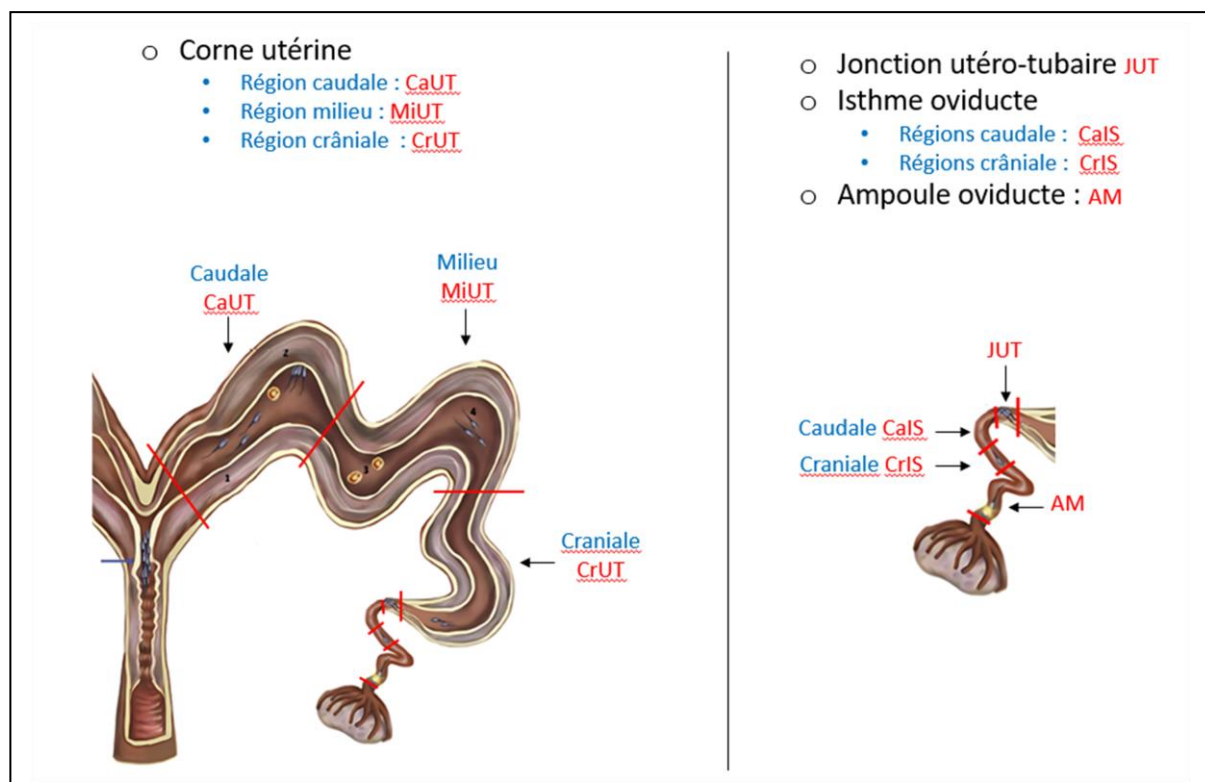


Figure 18 Schémas des différentes régions d'intérêt du tractus femelle

Le terme caudal désigne la partie de l'organe orientée du côté du vagin et le terme crânial la partie de l'organe orientée du côté de l'ovaire. Le milieu désigne le segment entre la partie caudale et crâniale. Modifié d'après [54].

Le cervix et le corps utérin ont été disséqués puis rincés avec 50 mL de Kobidil+ pour récupérer les spermatozoïdes.

La corne utérine a été linéarisée en retirant le ligament large puis elle est mesurée. Trois régions de longueurs égales ont ensuite été séparées puis la lumière a été rincée avec 40-50mL de Kobidil+ pour récupérer les spermatozoïdes.

La jonction utéro-tubaire (JUT) a été découpée de part et d'autre de la délimitation visible entre l'utérus et l'oviducte, en prenant 1 cm de chaque côté (longueur totale = 2 cm) puis la séreuse et une partie de la musculuse ont été retirées. La lumière de la JUT a été rincée avec 1 mL de Kobidil+ dans un tube pour récupérer les spermatozoïdes. Ensuite, l'entièreté de la JUT a été découpée très finement au-dessus d'un filtre de 70 μ M tout en étant rincée avec 40-50 mL de Kobidil+ pour sortir les spermatozoïdes non récupérés par la méthode du rinçage.

L'oviducte a été linéarisé en retirant le ligament mésosalpinx puis il a été mesuré. Deux régions de longueurs égales ont été découpées pour la partie « isthme » de l'oviducte et une seule pour la partie « ampoule » de l'oviducte. Pour la délimitation entre l'isthme et l'ampoule, elle correspond à la moitié de la longueur totale de l'oviducte moins 1,5 cm du côté de l'isthme. Chacune de ces régions a été rincée avec 1 mL de Kobidil+ pour récupérer les spermatozoïdes libres dans la lumière. Ensuite, comme certains spermatozoïdes pouvaient être fixés à l'épithélium, les cellules ont été extraites des régions de l'oviducte en appuyant sur le tissu avec une lame de verre puis elles ont été récupérées à la pipette avec du milieu. Tous les échantillons ont été placés à 4°C en attendant la poursuite des analyses.

6.2. Concentration et dépôts des spermatozoïdes

Après récupération, les liquides de rinçage et les cellules contenant les spermatozoïdes ont été concentrés et déposés dans des chambres de verre (Cellvision de 20 μ M, 2.5 μ L (CV 1020-4cv) ou Leja 100 μ M, 30 μ L (SC 100-01-02-A-CE, Luzernestraat, Pays-Bas)) ou entre lame et lamelle pour l'acquisition au scanner de lames. Le protocole pour la concentration et le dépôt des échantillons est représenté dans la [figure 19](#) et détaillé page suivante.

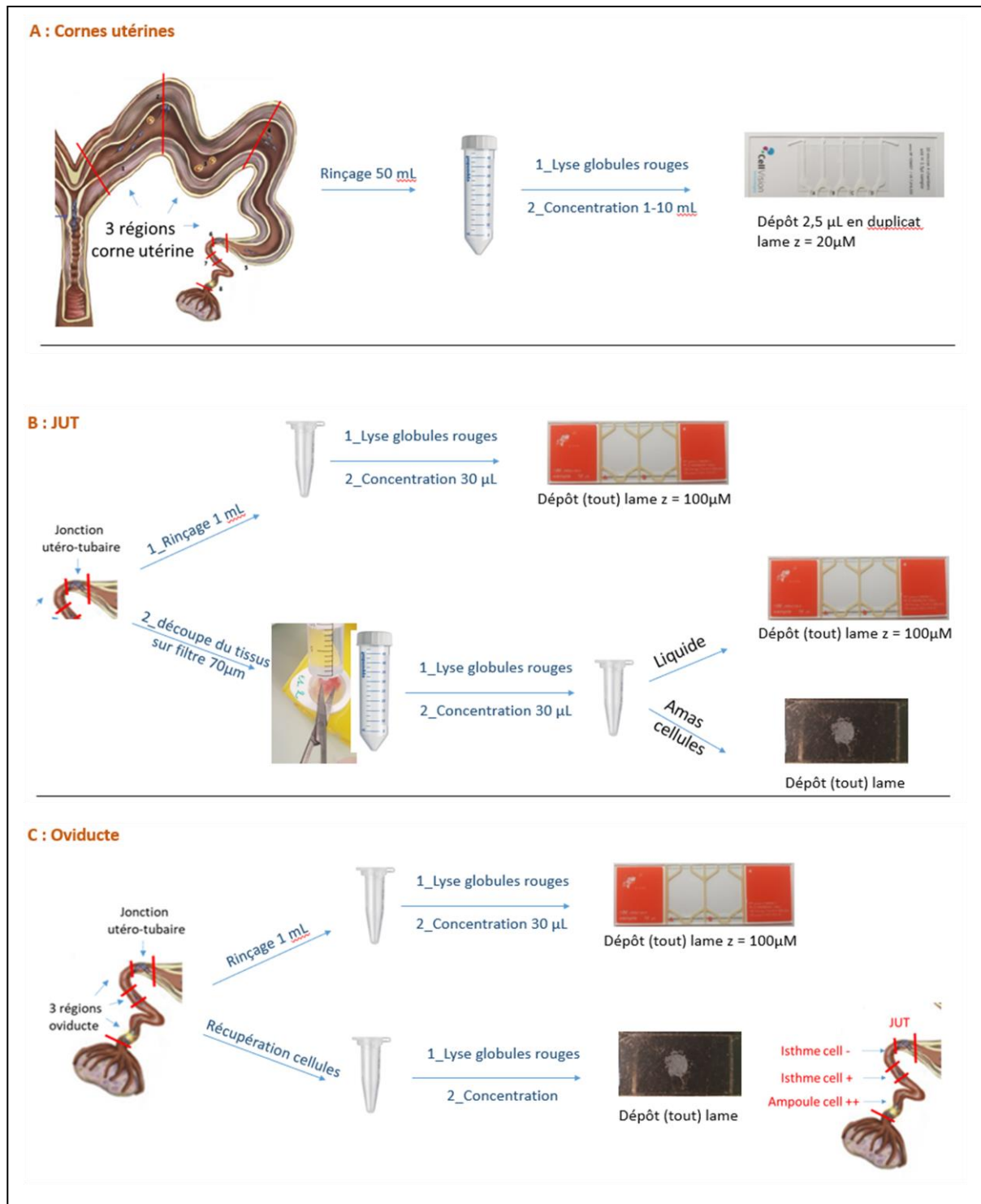


Figure 19 Protocole de la préparation des spermatozoïdes après dissection du tractus
Schémas de la préparation des spermatozoïdes récupérés à partir des cornes utérines (A), des JUT (B) et des oviductes (C).

Concentration des spermatozoïdes

Après récupération, les liquides de rinçage et les cellules contenant les spermatozoïdes ont été centrifugés à 2400 g, 3 min, 4 °C puis resuspendus dans un tampon permettant de lyser les globules rouges [273] (en g / l) 8,26 NH₄Cl ; 1 KHCO₃ ; 0,037 EDTA ; dans l'eau pH 7,3).

Après 10 min de lyse, les spermatozoïdes ont été à nouveau centrifugés puis resuspendus dans un volume dépendant de la concentration spermatique (forte dans l'utérus, moyenne dans la JUT et faible dans l'oviducte) et du type d'échantillon (rinçage ou cellules) : 1 à 10 ml pour les cornes utérines (**CaUT, MiUT, CrUT**), 30 μ L pour la JUT et les rinçages d'oviducte (**CaIS, CrIS, AM**) puis 30 à 500 μ L pour les cellules d'oviductes (**CaIS, CrIS, AM**).

Dépôt des spermatozoïdes

Ces échantillons ont été déposés soit dans des chambres de verre ou entre lame et lamelle, avec des volumes / dimensions adaptés aux échantillons :

- Un duplicate de 2,5 μ L sur la lame Cellvizion de 20 μ m pour les cornes utérines (**CaUT, MiUT, CrUT**)
- La totalité de l'échantillon (30 μ L) sur lame LEJA de 100 μ M pour les rinçages de la JUT et des oviductes (**CaIS, CrIS, AM**)
- Entre lame et lamelle pour les cellules d'oviducte (**CaIS, CrIS, AM**), la JUT découpée sur tissu et certains rinçages d'oviductes contenant beaucoup de cellules. Pour ce dépôt, les cellules étaient non pipetable et elles ont été prélevées avec le bout d'un cône, déposées sur la lame puis recouvertes d'une lamelle. La lamelle a été appuyée avec le bout du doigt pour aplanir l'échantillon.

6.3 Visualisation des spermatozoïdes au scanner de lames

Les échantillons ont été systématiquement observés aux oculaires d'un microscope à épifluorescence avant leur passage au scanner de lames pour ajuster les concentrations pour les rinçages de corne utérine et vérifier la présence d'au moins 1 spermatozoïde pour les échantillons d'oviducte. Si aucun spermatozoïde n'était aperçu à cette étape, les échantillons n'étaient pas passés au scanner de lames et le nombre de spermatozoïdes pour cet échantillon était considéré comme nul.

Les acquisitions avec le scanner de lames ont été effectuées avec l'objectif 10 X, en utilisant le cube EGFP pour la détection du fluorochrome CFSE et le cube CY3 pour la détection du fluorochrome R18. Plusieurs stratégies d'acquisition ont été définies en fonction de l'échantillon, des marquages, du type de dépôt et de lame pour avoir une acquisition adéquate.

6.4 Détection et comptage des spermatozoïdes avec le logiciel QuPath

Le logiciel QuPath est un logiciel d'analyse d'image libre de droit généralement utilisé dans le cadre de la pathologie numérique, pour analyser des scans numériques de lames microscopiques de tissu. Il contribue à la découverte de biomarqueurs tissulaires et à des diagnostics et pronostics plus rapides et efficaces [274].

Dans notre cas, nous l'avons utilisé pour identifier les spermatozoïdes dans les images générées par le scanner de lames, grâce à différentes fonctions de seuillage du niveau de fluorescence et de reconnaissance morphologique. La possibilité d'utiliser des scripts et de travailler en lots permet d'automatiser ces analyses. Un script général, codé Marie-Claire Blache (ingénieure de la plateforme d'imagerie cellulaire de l'unité PRC) a été défini pour la détection de spermatozoïdes fluorescents. Il est modifié à façon et fonctionne en batch pour analyser les images par lots.

La détection des spermatozoïdes repose en premier lieu sur l'établissement d'un seuil d'intensité de fluorescence qui va permettre de catégoriser les pixels en deux classes : la classe des « pixels détectés », c'est-à-dire dont l'intensité est au-dessus du seuil et les « pixels non classés » non pris en compte car leur intensité est en dessous du seuil.

Ensuite des objets vont être créés et segmentés (délimitation de l'objet selon la classe des pixels voisins) et une aire minimum est définie pour ces objets (50 μ m² et 30 μ m² respectivement pour le CFSE et le R18, car le CFSE détecte une surface du spermatozoïde légèrement plus grande que le R18), ce qui permet d'exclure de nombreux objets plus petits qu'un spermatozoïde. A cette étape, deux classes seront présentes, la classe « CFSE » et la classe « R18 ».

Ensuite tous les objets à l'intérieur des classes « CFSE » et « R18 » vont être rangés selon des paramètres de forme qui peuvent être combinés entre eux, tels que l'aire, la longueur, la circularité, la solidité, le diamètre minimum et maximum.

Au final, quatre classes seront conservées, les classes des spermatozoïdes individuels « SPZ CFSE » et « SPZ R18 » ainsi que les classes « AMAS SPZ CFSE » et « AMAS SPZ R18 » qui sont des amas de 2 à environ 5-10 spermatozoïdes. Toutes les autres classes ont été exclues des comptages.

Pour certaines images complexes, un second tri dans les classes « SPZ » est réalisé à l'aide de l'outil de visualisation de QuPath. A la fin de l'analyse QuPath, certains paramètres sont exportés vers un fichier Excel tels que le nombre d'objets par classe et l'aire des objets pour les classes « SPZ » et « AMAS SPZ ».

Lorsque tout l'échantillon n'a pas été déposé, comme c'est le cas avec les rinçages de l'utérus dont le volume pouvait atteindre 10 mL, le volume de la région d'intérêt a été calculé (grâce à la connaissance de la profondeur des chambres de verre et de l'aire de la région dessinée) pour évaluer le nombre de spermatozoïdes dans le volume initial.

6.5. Comptages manuels des spermatozoïdes au microscope à épifluorescence

Au début des analyses, quelques échantillons de rinçage et de cellules d'oviducte de faible densité spermatique ont été comptés manuellement (le scanner de lames n'avait pas réussi à faire son focus à cause de la faible densité spermatique) scanner de lames). Une contre-coloration des échantillons au Hoechst (9µM) a permis par la suite de compter la majorité de ces échantillons avec le scanner de lames.

7. Validation du marquage différentiel pour la quantification de la migration spermatique

Le CFSE et le R18 ont été choisis pour effectuer la validation du marquage différentiel (cf. partie Résultats [chapitre IV.1](#)) car ils respectaient les critères définis dans le Matériel et Méthode (cf. [chapitre III.4.2.](#)).

Le but de cette validation était de vérifier que si les spermatozoïdes d'une même semence étaient marqués au CFSE ou au R18 et qu'ils étaient ensuite mélangés dans des proportions connues puis inséminés, la proportion de ces deux marquages quantifiés dans le tractus femelle après IA serait proche de la proportion connue avant IA.

Dix cochettes Large White ont été synchronisées selon le protocole décrit au [chapitre III.4](#). Le protocole expérimental complet ([figure 20](#)) comprenait 6 lots différents de doses hétérospermiqes de verrats Piétrain pour les inséminations (une ou deux cochettes ont été inséminées par lot). Les doses hétérospermiqes ont été préparées pour l'insémination et 3 mélanges différents de fluorochromes ont été testés :

- 75 % CFSE / 25 % R18 (3 cochettes)
- 50 % CFSE / 50 % R18 (4 cochettes)
- 25 % CFSE / 75 % R18 (3 cochettes)

Pour effectuer une IA, une dose de semence hétérospermiqie était séparée en deux fractions de 60 mL, la première étant marquée avec 1 µM de CFSE (réf. 21888, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier) et la seconde avec 1,9 µM de R18 (réf. O246, Thermofisher Scientific, Massachusetts, États-Unis). Les spermatozoïdes ont été lavés sur Percoll puis chaque fraction a été reprise dans 45 mL de Kobidil+.

Une analyse CASA a permis de vérifier les mobilités et les concentrations des deux fractions, qui ont été ajustées si besoin pour être à concentration égale. Les spermatozoïdes issus des deux fractions ont ensuite été mélangés pour obtenir les proportions 1), 2) et 3) dans une dose constituée de $1,5$ à $2 \cdot 10^9$ spermatozoïdes dans 80 mL de Kobidil+.

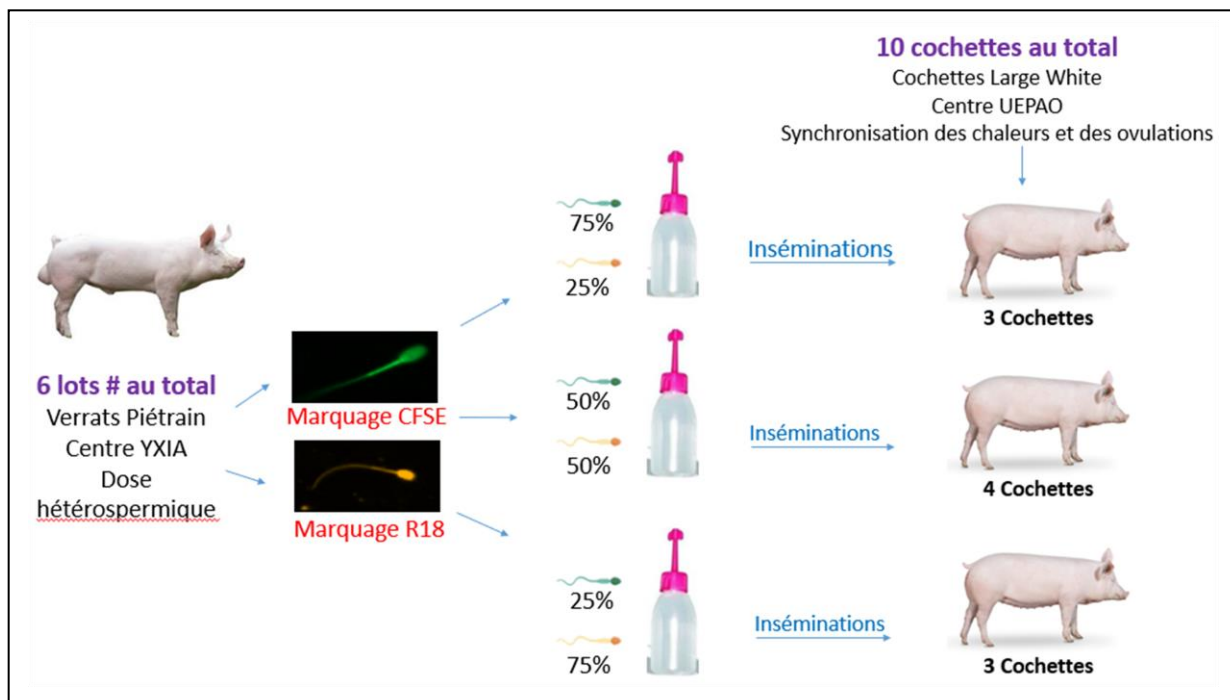


Figure 20 Protocole pour la validation du marquage différentiel

Une partie du mélange inséminé ($500 \mu\text{L}$) a été conservé à 4°C pour réaliser ultérieurement la quantification des spermatozoïdes marqués lors des analyses au scanner de lames. Trois heures après l'insémination, les cochettes ont été euthanasiées puis les échantillons de spermatozoïdes sont collectés à partir du tractus et quantifiés au scanner de lames selon le protocole décrit au [chapitre III.6](#). La proportion de spermatozoïdes CFSE et R18 a été calculée suite à la quantification de la migration spermatique au scanner de lames et logiciel QuPath.

8. Phénotypage de la migration des spermatozoïdes

Le fluorochrome R18 a été choisi pour effectuer ce phénotypage (cf. [chapitre IV.1](#)). Les cochettes ont été synchronisées selon le protocole décrit au [chapitre III.4](#).

Le protocole expérimental complet ([figure 21](#)) comprenait 7 lots différents de doses hétérospermiques pour l'insémination de 15 cochettes. Les doses hétérospermiques ont été préparées pour l'insémination d'une, deux ou trois cochettes (cf. [annexe 3](#)).

Pour effectuer une IA, 120 mL de semence en dose hétérospermique de verrats Piétrain ont été marqués avec $1,9 \mu\text{M}$ de R18, lavés sur gradient de Percoll puis les spermatozoïdes ont été repris dans 80 mL de Kobidil+. Après une mesure de la concentration et des trajectoires de spermatozoïdes au CASA, $1,5$ à 2 milliards de spermatozoïdes (car les lavages avaient induit une perte variable de spermatozoïdes entre les expériences) dans 80 mL de dilueur ont été inséminés / cochette.

Trois heures après l'insémination, les cochettes ont été euthanasiées. Le tractus a été photographié puis le stade du cycle a été évalué après examen des ovaires : stade pré-ovulatoire quand des follicules pré-ovulatoires (diamètre 4 à 6 mm) ont été observés, en cours d'ovulation si des follicules et des traces d'ovulations étaient observés sur le même ovaire et post-ovulatoire si tous les follicules avaient

ovulés (corps hémorragiques). Les dimensions des cornes utérines et des oviductes ont été mesurées après dissection et linéarisation. Les échantillons de spermatozoïdes ont été collectés à partir du tractus et quantifiés au scanner de lames selon le protocole décrit au [chapitre III.6.](#)

La quantité de spermatozoïdes R18 a été calculée suite à la quantification de la migration spermatique au scanner de lames et logiciel QuPath sauf pour les échantillons de cervix (CER) et de corne utérine (CUT) qui n'avaient pas été collectés pour les premières cochettes.

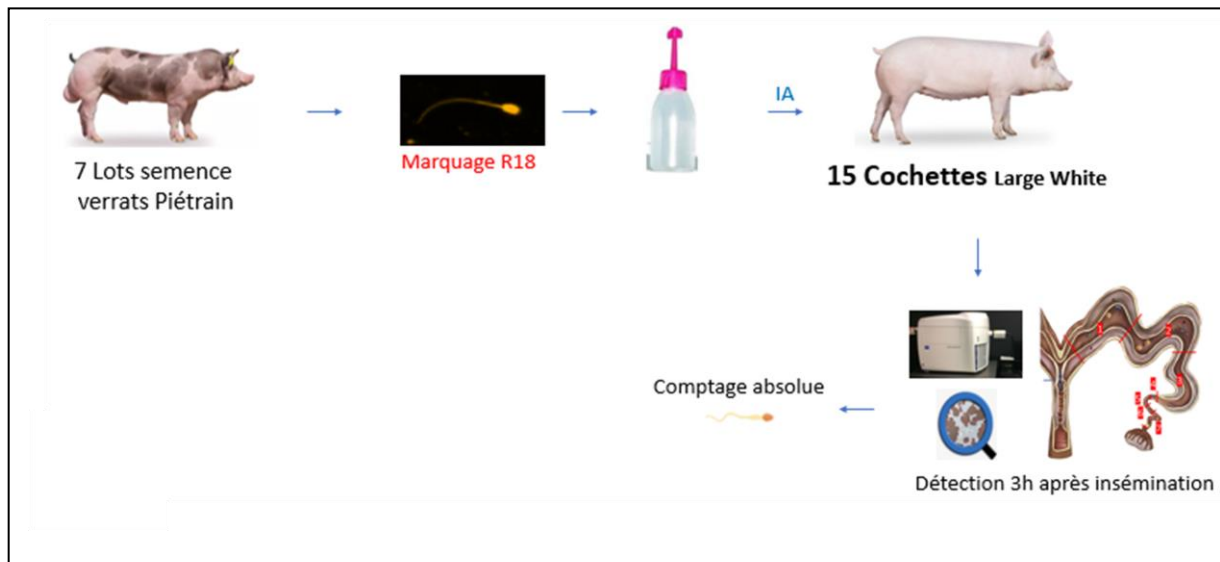


Figure 21 Protocole pour le phénotypage de la migration spermatique

9. Mesure de la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique

La résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique a été estimée par la mesure de l'intégrité membranaire après 20 minutes d'incubation à 17 °C dans un milieu hypotonique à 99 mOsm/L (Kobidil+ dilué dans de l'eau désionisée) et un milieu isotonique à 330 mOsm/L (Kobidil +, milieu contrôle). Les osmolarités ont été vérifiées et ajustées avec un osmomètre cryoscopique (Loeser, Berlin, Allemagne).

En microplaque 96 puits, 6,5 µL de spermatozoïdes (provenant de la dose YXIA) ont été ajoutés à 200 µL (concentration finale = $0,8 \cdot 10^6$ spermatozoïdes / mL) de milieu hypotonique ou isotonique contenant 10 nM de Syto® 16 green (réf. S34854, Thermofisher Scientific, Massachusetts, États-Unis) et 7,5 µM d'iodure de propidium (réf. 81845, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier). Le Syto®16 green va marquer en vert l'ADN de tous les spermatozoïdes tandis que l'iodure de propidium marque en rouge uniquement les spermatozoïdes morts ayant perdu leur intégrité membranaire. La réaction des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique est très rapide (seconde) et les 20 minutes d'incubation sont le temps nécessaire pour que le Syto®16 green marque le spermatozoïde.

La proportion de spermatozoïdes verts / rouges a été déterminée avec le cytomètre MACSQuant 10 (Miltenyi Biotech, Allemagne). La population de spermatozoïdes a été sélectionnée avec les paramètres de structure et de taille : histogramme bi-paramétrique FSC-A, (Forward Scatter Aire) / SSC-A (Side Scatter Aire) puis les doublets ont été retirés (histogramme bi paramétrique FSC-H, (Forward Scatter Hauteur) / FSC-A (Forward Scatter Aire)). La mesure des fluorescences vertes et rouges a permis de tracer un histogramme bi-paramétrique pour déterminer 4 populations : débris (IP -, Syto® 16 -), spermatozoïdes vivants (IP-, Syto® 16 +), spermatozoïdes morts (IP+, Syto® 16 -) et les spermatozoïdes doublements marqués (IP +, Syto® 16 +). Un minimum de 10 000 cellules a été

analysée. Les pourcentages de débris et de spermatozoïdes doublements marqués sont ensuite retirés du pourcentage total pour calculer la proportion (en %) de spermatozoïdes vivants et morts. Enfin, le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans la solution hypotonique à 99 mOsm/L a été exprimé en pourcentage du pourcentage initial de spermatozoïdes vivants de la solution isotonique à 330 mOsm/L.

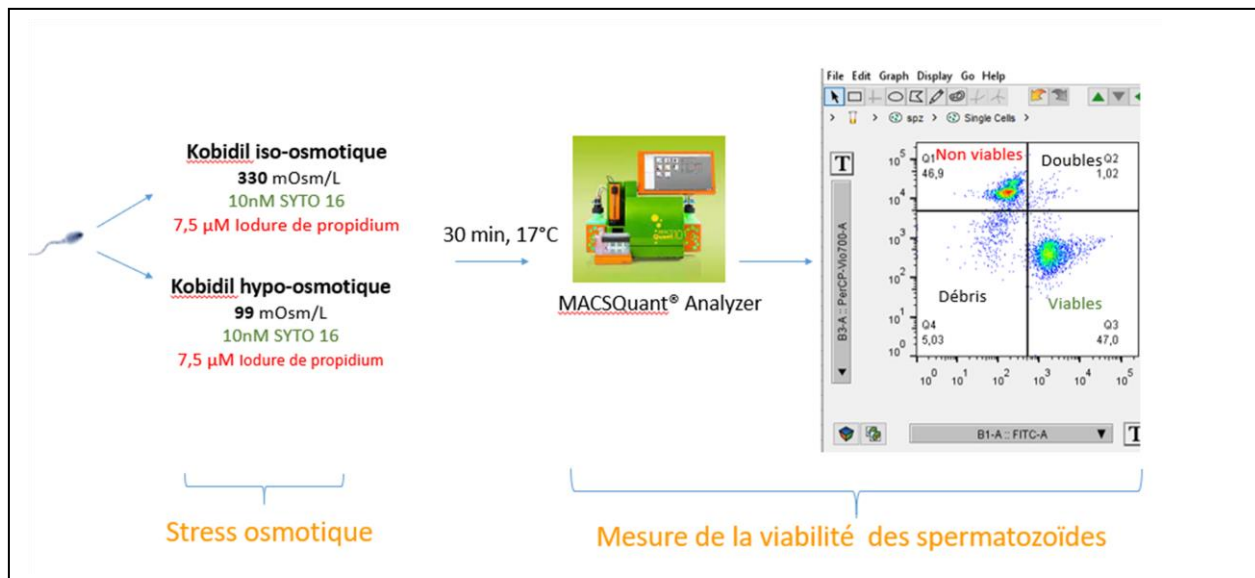


Figure 22 Protocole de mesure de la viabilité spermatique après stress hypo-osmotique

A droite, représentation de l'histogramme bi-paramétrique des intensités de fluorescence rouge (B3-A) et verte (B1-A) issu de l'analyse par cytométrie de flux. Les 4 populations décrites ci-dessus sont indiquées dans les cases du quadrant.

10. Evaluation de spermatozoïdes de verrats extrêmes pour la résistance au stress hypo-osmotique

L'évaluation de la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique a été réalisée sur 41 verrats de race Landrace et 44 verrats de race Large White, collectés dans les centres YXIA.

Les mesures de résistance ont été effectuées à J+2 maximum après réception des doses de semences selon la méthode décrite ci-dessus (chapitre III.5.9). Pour chaque éjaculat, un duplicata technique de stress hypo-osmotique a été réalisé. Les verrats pour lesquels au moins 3 éjaculats ont été évalués pour la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique ont été comparés statistiquement avec un test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les verrats statistiquement différents ont été classés dans le groupe des spermatozoïdes de faible résistance = résistants (-) ou des spermatozoïdes de forte résistance = résistants (+). Les deux groupes extrêmes ainsi constitués ont été comparés avec un test non paramétrique de Mann-Whitney.

Les verrats des centres ayant pu être remplacés rapidement (souvent pour des raisons génétiques), les verrats extrêmes ont été transférés dans une unité expérimentale INRAE (Porganic) à la fin des identifications pour les conserver et pour procéder à l'évaluation de leur capacité de migration spermatique.

11. Evaluation de la migration spermatique de spermatozoïdes de verrats extrêmes pour la résistance au stress hypo-osmotique

Les cochettes sont synchronisées selon le protocole décrit au [chapitre III.4](#).

Un jour avant l'IA, les verrats dont les spermatozoïdes étaient extrêmes en résistance au stress hypo-osmotique ont été prélevés dans la station Porganic puis la qualité de la semence a été évaluée juste après la collecte et après sa dilution dans du Kobidil+. Ces doses ont été préparées avec 2 milliards spermatozoïdes dans 80 mL de Kobidil+. Elles ont été récupérées le jour de la collecte et apportées à l'unité PRC, puis la résistance au stress hypo-osmotique des éjaculats a été évaluée.

Le jour des inséminations, une dose d'IA a été préparée en mélangeant 50 % de spermatozoïdes résistants (-) marqués au CFSE avec 50 % de spermatozoïdes résistants (+) marqués au R18. La concentration et la mobilité des éjaculats après marquage ont été mesurées au CASA et les concentrations ont été ajustées si besoin. Une partie de la dose (500 µL) a été conservée à 4 °C pour faire la quantification des spermatozoïdes marqués avec le scanner de lames et déterminer le ratio R18 / CFSE.

3 h après l'insémination, les cochettes ont été euthanasiées puis les échantillons de spermatozoïdes ont été collectés à partir du tractus. Les échantillons de spermatozoïdes ont été collectés à partir du tractus et quantifiés au scanner de lames selon le protocole décrit au [chapitre III.6](#).

La proportion de spermatozoïdes CFSE et R18 a été calculée suite à la quantification de la migration spermatique au scanner de lames et logiciel QuPath. Après calcul des proportions spermatiques R18 / CFSE pour chaque région, ce ratio a été normalisé par rapport à la proportion R18 / CFSE de spermatozoïdes avant insémination.

IV. Résultats

1. Validation des fluorochromes et des méthodes d'imagerie pour la quantification spermatique après IA

1.1. Validation des fluorochromes

1.1.1. Evaluation des fluorochromes

Le développement d'une méthode de quantification par imagerie de fluorescence a nécessité une validation des fluorochromes en amont. Les résultats complets de l'évaluation des 23 fluorochromes sont présentés en [annexe 1](#).

Le [tableau 3](#) résume les résultats des 23 fluorochromes testés, avec 17 monomarquages et 6 doubles marquages. Une des 6 caractéristiques suivantes a été attribuée pour chacun des fluorochromes, pour la gamme ou la/les concentrations spécifiées :

1. **Validé pour les marquages différentiels** : Non toxique, détecté *in vitro* et après IA et non diffusible
2. **Validé après IA** : Non toxique, détecté *in vitro* et après IA mais diffusible
3. **Validé *in vitro*** : Non toxique, détecté *in vitro* mais non détecté après IA
4. **Non validé** : Non/faiblement détecté au Cellvizio et scanner de lames ou toxique à la concentration visualisée au Cellvizio et au scanner de lames

Marquage	Molécules	λ (Ex-Em)	Cible	Concentrations	Localisation marquage	Résultats
Simple	CFSE	492-518	Amines	1µM	Tête et flagelle	1
Simple	R18	556-578	Lipides	1,9µM	Tête et flagelle	1
Double	Hoechst 33342 / R18	350-461/556-578	ADN/Lipide	8.9 µM/1.9µM	Tête/Tête et flagelle	2
Double	MitoTracker™ Green FM / R18	490-516/556-578	Mitochondries/ Lipides	0.25µM/1.9 µM	Flagelle/Tête et flagelle	2
Double	SYTO™ Deep Red / R18	652-669/556-578	ADN/Lipides	0.25 µM/1.8 µM	Tête/Tête et flagelle	2
Double	SiR-DNA / R18	652-674/556-578	ADN/Lipides	0.1 µM 1.88 µM	Tête/Tête et flagelle	2
Double	SYTO 16 green / R18	488-518/556-578	ADN/Lipides	31,2 nM/1.9 µM	Tête/Tête et flagelle	3
Simple	LBL-Dye 717	690-717	Lipides	0,0125-0,00625%	Tête et flagelle	3
Simple	MemGlow™ 640	650-673	Lipides	0,025	Tête et flagelle	3
Simple	MemGlow™ 700	689-713	Lipides	0,2 µM	Tête et flagelle	3
Simple	PKH67 Green	490-502	Lipides	1,6-0.4%	Tête et flagelle	4
Simple	Fluorescein isothiocyanate isomer I	492-518	Protéines	25.6-2.5 µM	Tête et flagelle	4
Simple	Tubulin Tracker Green	494-522	Tubuline	1-0.2%	Tête et flagelle	4
Simple	TRITC	529-596	Protéines	22,5-2.2 µM	Tête et flagelle	4
Simple	CellTrace™ Far Red	630-661	Amines	5µM & 2 µM	Tête et flagelle	4
Simple	Vybrant™ DiD	644-665	Lipides	0,5% & 1%	Tête et flagelle	4
Simple	CellTracker™ Deep Red	630-650	Lipides	10-5 µM	Tête et flagelle	4
Simple	CellMask™ Deep Red	649-666	Lipides	0,5% & 0,1%	Tête et flagelle	4
Simple	MitoTracker™ Deep Red FM	644-665	Mitochondries	12,5-1,5 µM	Flagelle	4
Simple	Tubulin Tracker Deep Red	652-669	Tubulines	1-0.2%		4
Simple	Methy green	388-633	ADN	100 µg/mL		4
Simple	FM™ 4-64 Dye	515-640	Lipides	50-0.5 µg/mL	Tête et flagelle	4
Double	Nile red / R18	552-636 /556-578	Lipides/Lipides	30 µM	Tête et flagelle	4

Tableau 3 Résumé des résultats de l'évaluation des fluorochromes

Au final, seuls le CFSE et le R18 répondent à l'ensemble des critères pour la mise en œuvre du marquage différentiel avec le scanner de lames et l'IVIS Spectrum. Ces fluorochromes marquent la tête et le flagelle permettant de reconnaître les spermatozoïdes en microscopie par leur forme allongée (figure 23).

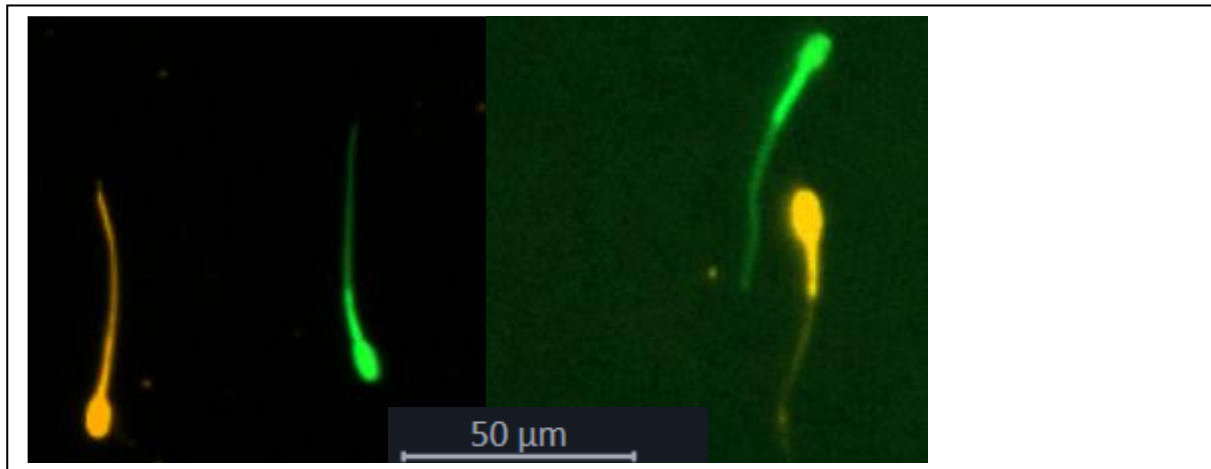


Figure 23 Image des spermatozoïdes après un marquage différentiel au CFSE et R18 avant et après IA

Images des spermatozoïdes qui ont été marqués différemment au CFSE et au R18 avant IA (à gauche) et collectés dans la JUT après insémination (à droite).

Les longueurs d'onde de ces deux fluorochromes correspondaient à la première plage de longueur d'onde du Cellvizio (λ 502-633 nm) et ils ne pouvaient donc pas être utilisés en marquage différentiel avec cet outil.

Un fluorochrome infrarouge détectable après IA et marquant l'entièreté du spermatozoïde n'a pas pu être validé. Cependant un très faible signal a pu être détecté après IA au scanner de lames pour le Memglow 640. La concentration de fluorochrome utilisée avait été volontairement diminuée pour limiter le coût financier ; une concentration plus importante, après validation de la toxicité, sera testée prochainement avec son analogue le Membright 700. Le Nile red a bien été détecté *in vitro* au scanner de lames en double marquage avec le R18 à 30 mM. En monomarquage, sa toxicité (faible à 10 min mais forte à 5 h après marquage (cf. tableau en annexe 1) devra être évaluée ainsi que sa détection *in vitro* et après IA.

Une des possibilités pour réaliser des marquages différentiels était de marquer tous les spermatozoïdes au R18 (marquage de l'entièreté du spermatozoïde) puis d'utiliser d'autres fluorochromes (dans une autre longueur d'onde) en double marquage uniquement sur une des deux conditions. Les marquages du noyau paraissaient adéquats car ils ne rentraient pas en compétition avec des marqueurs de lipides tel que le R18 (contrairement par exemple au Memglow). Plusieurs marqueurs du noyau (Hoechst, Syto Deep Red, SiR-DNA) ont pu être validés après IA mais les essais de diffusibilité ont montré qu'ils pouvaient marquer des spermatozoïdes non marqués initialement par ces fluorochromes. Il a été constaté que les échantillons diffusaient peu à 4 °C en tube par rapport à 17 °C. Néanmoins, après un délai de 3 heures dans le tractus génital femelle puis la collecte des échantillons à 4 °C, la discrimination des échantillons n'avait pas été possible. Ces fluorochromes pourraient être utilisés en complément d'autres fluorochromes pour l'étude d'une seule population spermatique.

Enfin le Mitotracker Green a été validé après IA mais il avait l'inconvénient de devoir être observé dans les 24 h après la collecte des échantillons. Associé au R18, ce fluorochrome pourrait permettre une

meilleure visualisation des spermatozoïdes au Cellvizio (renforcement du marquage de la pièce intermédiaire) dans une échelle de temps qui correspond à la migration des spermatozoïdes.

1.1.2 Evaluation de la toxicité des fluorochromes CFSE et R18

La toxicité des deux fluorochromes choisis pour le marquage différentiel (CFSE et R18) avait été évaluée au CASA avec des doses de semence hétérospermiques de race Pietrain. Elle a été évaluée à nouveau sur la race Landrace (race choisie pour l'étude sur la résistance au stress hypo-osmotique) et pour des doses de semence homospermique, qui avaient une variabilité entre doses plus importante que les doses hétérospermiques.

Les résultats de l'effet des fluorochromes CFSE et R18 aux concentrations qui avaient été validées pour le marquage différentiel sur la mobilité et la mobilité progressive à T0 et T4 h sont présentés dans la figure 24.

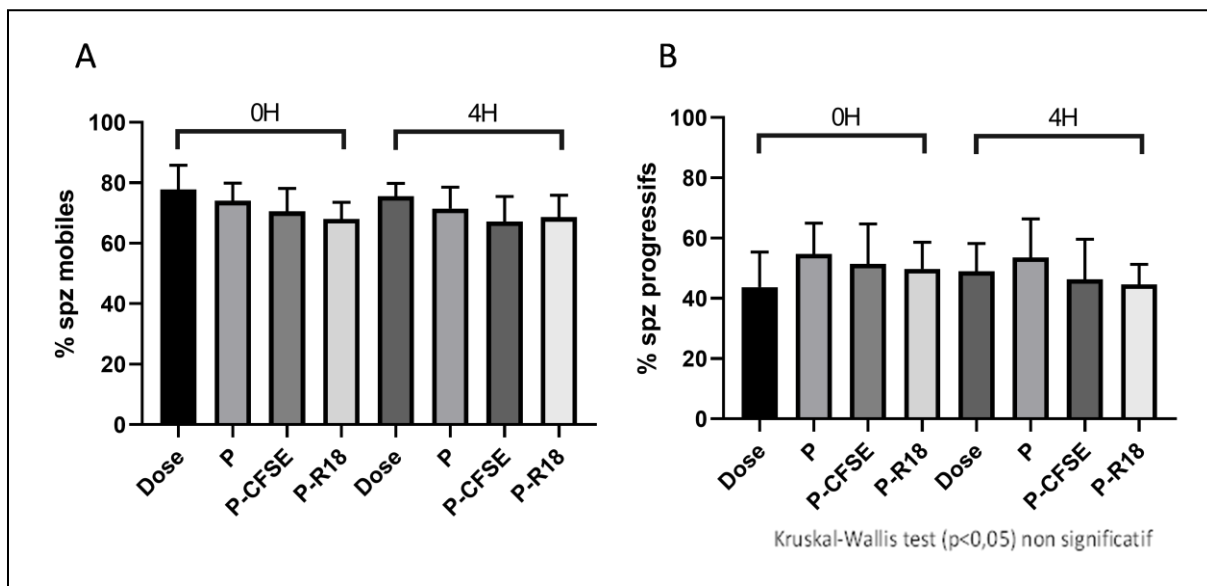


Figure 24 Effet des fluorochromes CFSE et R18 sur les spermatozoïdes de verrats Landrace

La mobilité (A) et la mobilité progressive (B) de spermatozoïdes non manipulés (dose), lavés sur Percoll (P) et incubés avec le CFSE à 1 μ M (P-CFSE) ou le R18 à 1.9 μ M (P-R18) puis lavés sur Percoll ont été mesurées à T0 et T4 h au CASA ($n = 4$ verrats, moyenne \pm écart type)

A T0 et T4 h d'incubation à 37 °C, les différences de mobilités et mobilités progressives entre les spermatozoïdes non marqués (témoins dose et Percoll) et marqués au R18 et au CFSE étaient non significatives, nous avons conclu que les deux fluorochromes n'avaient pas d'effet délétère sur la mobilité des spermatozoïdes.

1.2. Validation de la méthode d'imagerie

Au cours des deux premières années du projet, un seul fluorochrome marquant la totalité du spermatozoïde (R18) avait pu être validé. Ce fluorochrome a été évalué après insémination avec la méthode IVIS Spectrum, scanner de lames et Cellvizio (une seule fois pour l'IVIS Spetrum et le Cellvizio). L'absence de détection des spermatozoïdes marqués au R18 dans le tractus après IA avec la méthode l'IVIS Spectrum et sa détection compliquée au Cellvizio (forme du spermatozoïde difficile à reconnaître) nous avait conduit à développer notre méthode de quantification des spermatozoïdes dans le tractus femelle avec la méthode scanner de lames. La validation d'un second fluorochrome en fin de deuxième année, primordiale pour la mise en œuvre d'un marquage différentiel, mais dont l'émission de fluorescence (verte) ne pourrait pas être distinguée du R18 avec le Cellvizio, nous avait amené à continuer avec la méthode scanner de lames pour les marquages différentiels.

A part pour le chapitre suivant (IV.2) qui est consacré à la méthode IVIS Spectrum, tous les résultats présentés ont été obtenus avec la méthode scanner de lames décrite au chapitre Matériel et Méthodes III.6

1.2.1. Analyse des spermatozoïdes à l'IVIS Spectrum

Parmi les outils d'imagerie envisagés (cf. [chapitre III.4.1](#)), l'IVIS Spectrum avait l'avantage de pouvoir réaliser une quantification globale de la fluorescence des spermatozoïdes dans le tractus femelle en exposant ce dernier entièrement *ex vivo* sous la caméra de l'appareil. Cependant, nous devons évaluer la capacité de l'IVIS Spectrum à bien détecter les spermatozoïdes au travers des tissus du tractus. Des expérimentations *in vitro* (*spermatozoïdes marqués*) et *ex vivo* après injection dans le tractus de spermatozoïdes marqués et après IA de spermatozoïdes marqués ont été menées.

1.2.1.1 Détection des spermatozoïdes en goutte et après injection dans le tractus *ex vivo*

Les expérimentations présentées ci-dessous ont été effectuées avec des spermatozoïdes marqués au R18 ou/et au SYTO Deep Red (marqueur de l'ADN en infrarouge, validé [tableau 3, ligne 5](#)). A ce moment-là du projet, le CFSE n'avait pas encore été testé, mais le R18 et le SYTO Deep Red ayant été tous les deux validés après IA, nous avons voulu évaluer la détection des spermatozoïdes marqués avec ces fluorochromes par la méthode IVIS Spectrum.

La quantification d'une gamme de dilution des spermatozoïdes marqués ou non marqués a été réalisée pour déterminer le nombre minimal de spermatozoïdes détectables *in vitro*. La détection de ces fluorochromes a ensuite été réalisée dans le tractus après injection et incubation des spermatozoïdes *ex vivo*.

Seules les figures obtenues avec les spermatozoïdes marqués avec le R18 sont présentées comme exemples. Les résultats qui sont indiqués sous les figures sont mentionnés pour les deux fluorochromes, le R18 et le SYTO Deep Red.

La limite de détection en goutte est présentée [figure 25](#).

Les mesures de « Radiant Efficiency » sur les différentes dilutions ont permis de connaître la limite de détection de spermatozoïdes à partir de laquelle le signal commençait à augmenter. Elle correspondait à un nombre de 2344 spermatozoïdes pour la condition R18.

Le contrôle de spermatozoïdes non marqués et le milieu de dilution (Kobidil+) présentaient une absence de signal pour les 5 combinaisons de longueurs d'onde, sauf celle de (Ex / Em) 535 / 580 qui présentait un signal faible d'autofluorescence et qui a été pris en compte pour la détermination de la limite de détection du R18 (données non montrées).

La limite de détection avec les spermatozoïdes qui avaient été marqués au SYTO Deep Red (analysées avec les combinaisons de longueurs d'onde adéquates) a été moins bonne car le seuil de détection était de 18750 spermatozoïdes.

La détection de la fluorescence des spermatozoïdes après leur injection dans le tractus *ex vivo* est présentée [figure 26](#).

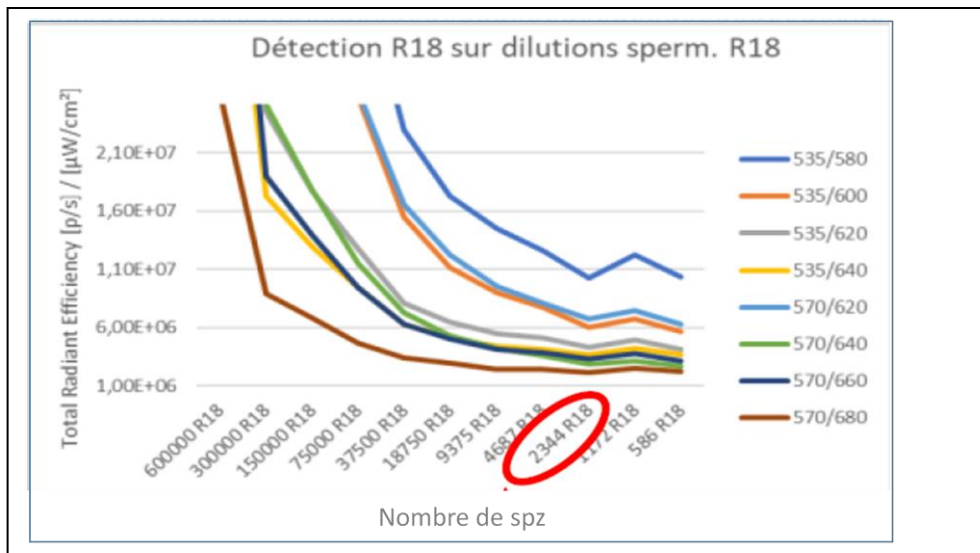


Figure 25 Mesure de la fluorescence de différentes quantités de spermatozoïdes déposés en goutte à l'IVIS Spectrum

Résultats des mesures de « Radiant Efficiency » (unité de fluorescence) d'une gamme de dilution de 586 à $0,6 \cdot 10^6$ spermatozoïdes, marqués avec $1,9 \mu\text{M}$ de R18 ($\text{Ex } \lambda = 556 / \text{Em } \lambda = 578$). 10 dilutions successives au $\frac{1}{2}$ de spermatozoïdes marqués à la concentration de $30 \cdot 10^6 / \text{mL}$ ont été effectuées. Les dilutions ont été déposées en goutte de $20 \mu\text{L}$. La détection des spermatozoïdes R18 est présentée pour les 6 combinaisons de longueur d'onde (Ex / Em) de 535 nm / 580 à 640 nm et 570 nm / 620 à 680 nm servant à déterminer la longueur d'onde spécifique du R18 et à faire le « démixage » spectral. La limite de détection des spz marqués au R18 est entourée en rouge.

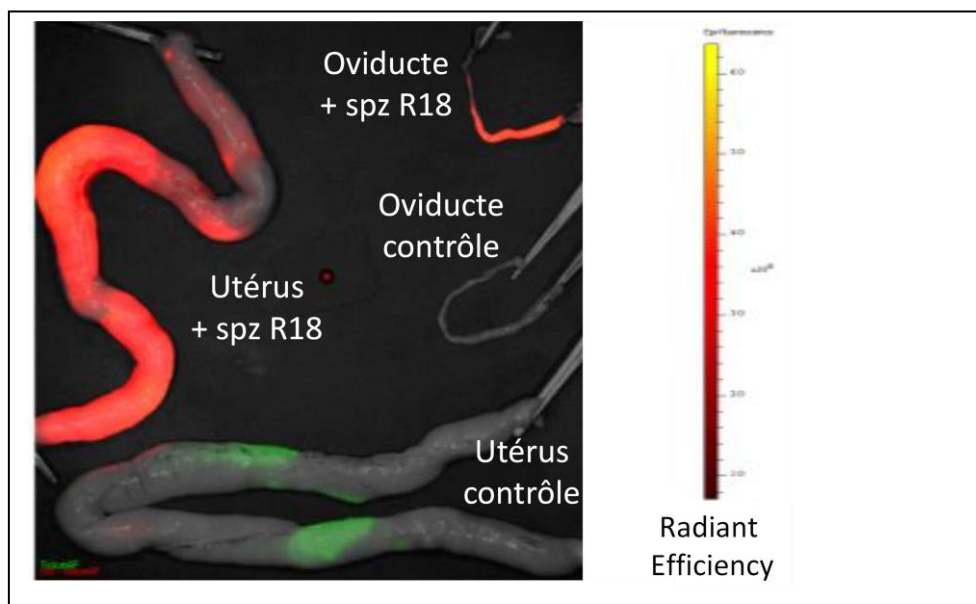


Figure 26 Image des spermatozoïdes quantifiés dans le tractus femelle après analyse à l'IVIS Spectrum

Images des mesures de la « Radiant Efficiency » (unité de fluorescence) dans la corne utérine ($2 \cdot 10^8$ spermatozoïdes) et de l'oviducte ($1 \cdot 10^7$ spermatozoïdes) de spermatozoïdes non marqués, marqués avec $1,9 \mu\text{M}$ de R18, injectés ex vivo. La détection du R18 a été réalisée avec les mêmes paramètres que la figure 25. Les images composites obtenues après exécution de l'algorithme de « démixage » spectral du logiciel pour les cornes utérines et les oviductes sont présentées. La couleur verte correspond à l'autofluorescence des tissus et la couleur rouge au signal spécifique des fluorochromes.

La fluorescence du R18, visualisée par la couleur rouge, était bien visible dans la corne utérine et l'oviducte et elle était absente des contrôles (spermatozoïdes non marqués). Certaines zones de la corne utérine ont été peu colorées, reflétant probablement une plus faible densité en spermatozoïdes qui avaient été répartis en massant / bougeant le tractus. De l'autofluorescence (couleur verte) a été visible dans deux régions localisées de la corne utérine pour l'acquisition R18.

Un résultat similaire a été obtenu avec le SDR avec un bruit de fond réparti sur toute la corne utérine. Cette expérimentation permet de montrer une bonne détection des spermatozoïdes marqués au R18 et SDR après injection de $2 \cdot 10^8$ spermatozoïdes et $1 \cdot 10^7$ spermatozoïdes, respectivement, dans la corne utérine et l'oviducte.

1.2.1.2 Détection des spermatozoïdes après IA

Pour valider la détection des spermatozoïdes après IA avec l'IVIS Spectrum, $1,2 \cdot 10^9$ spermatozoïdes doublement marqués avec $1,9 \mu\text{M}$ de R18 / $0,25 \mu\text{M}$ de SDR ont été inséminés chez une cochette. Ensuite, 1,5 h après l'insémination, la cochette a été euthanasiée puis le tractus a été analysé à l'IVIS Spectrum. Après le traitement des images, aucun signal spécifique n'a pu être détecté dans les cornes utérines et les oviductes.

A l'issue de l'analyse, les cornes utérines ont été rincées pour récupérer les spermatozoïdes et pour les compter au scanner de lames. Les résultats du comptage sont présentés [figure 27](#).

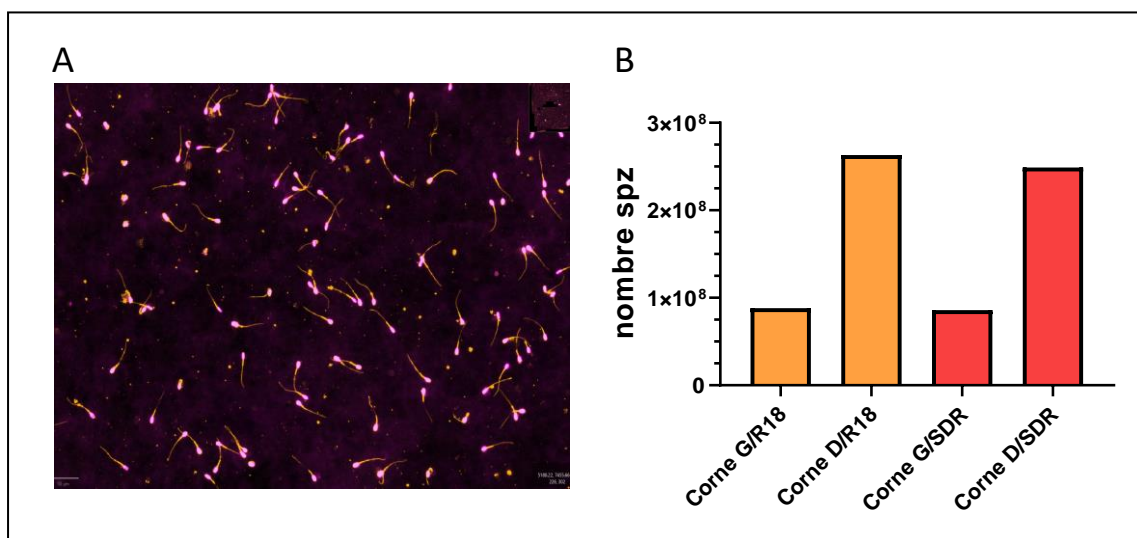


Figure 27 Quantification des spermatozoïdes au scanner de lames après analyse à l'IVIS Spectrum

(A) Visualisation des spermatozoïdes qui ont été récupérés des cornes utérines après l'analyse à l'IVIS Spectrum.
 (B) Résultats de la quantification des spermatozoïdes dans la corne utérine gauche (Corne G) et droite (corne D) avec la fluorescence R18 et SDR.

Le comptage des spermatozoïdes qui avaient été récupérés par rinçage au scanner de lames avait permis de dénombrer environ $9 \cdot 10^7$ et $2,5 \cdot 10^8$ dans la corne utérine gauche et droite respectivement. La quantification de spermatozoïdes de $2,5 \cdot 10^8$ dans la corne droite était quasiment équivalente au nombre de spermatozoïdes qui avaient été injectés lors de l'expérimentation *ex vivo* ($2 \cdot 10^8$ spermatozoïdes, voir ci-dessus [chapitre IV.2.1](#)). Lors de cet essai *ex vivo*, les spermatozoïdes avaient pu être détectés avec l'IVIS Spectrum, la détection des spermatozoïdes dans la corne utérine droite de la présente expérimentation aurait donc dû être possible.

Suite aux résultats négatifs de cette évaluation à l'IVIS Spectrum, la technique a été abandonnée et la récupération des spermatozoïdes dans des régions du tractus suivie d'une analyse avec le scanner de lames a été privilégiée.

1.3. Détection semi-automatisée des spermatozoïdes après analyse au scanner de lames et validation du marquage différentiel après IA

Chez les gros mammifères d'élevage, les méthodes utilisées classiquement (publiées) pour compter les spermatozoïdes après IA consistent à les récupérer à partir du tractus (par rinçage après abattage ou sous anesthésie avec des cathéters) et à les compter manuellement avec des cellules de numération. Parfois, un marquage des spermatozoïdes est réalisé en amont.

La méthode développée dans ce projet, avec le marquage fluorescent de la tête et du flagelle des spermatozoïdes grâce à des fluorochromes, a permis de développer une méthode de détection semi-automatisée des spermatozoïdes basée sur la reconnaissance de cette forme spécifique après segmentation des objets fluorescents. La détection de deux fluorochromes, le CFSE et le R18, que l'on peut distinguer avec le scanner de lames permet de mettre en œuvre des marquages différentiels. La validation de ces marquages différentiels était importante pour évaluer l'impact de la résistance au stress hypo-osmotique des spermatozoïdes sur leur transit dans le tractus femelle. En effet, elle a permis de valider une méthode permettant de faire une comparaison directe de la capacité du tractus femelle à sélectionner des spermatozoïdes sur le critère de résistance.

1.3.1. Détection semi-automatisée des spermatozoïdes après analyse au scanner de lames

1.3.1.1 Détection et classification automatisée

Après acquisition au scanner de lames, les images ont été analysées avec le logiciel QuPath. Les images ci-dessous illustrent la détection et la classification automatisée effectuée en batch sur les images avec ce logiciel.

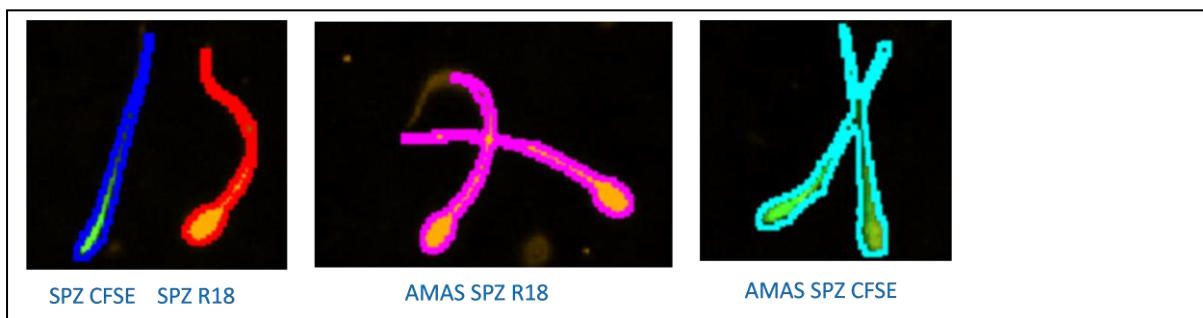


Figure 28 Exemples de formes détectées et conservées pour le comptage de la classe spermatozoïdes

Détection des spermatozoïdes avec QuPath après analyse au scanner de lames. Sur la figure ont été représentées les classes « SPZ » (détection bleue), « SPZ R18 » (rouge), « AMAS SPZ CFSE » (rose) et « AMAS SPZ R18 » (bleu clair).

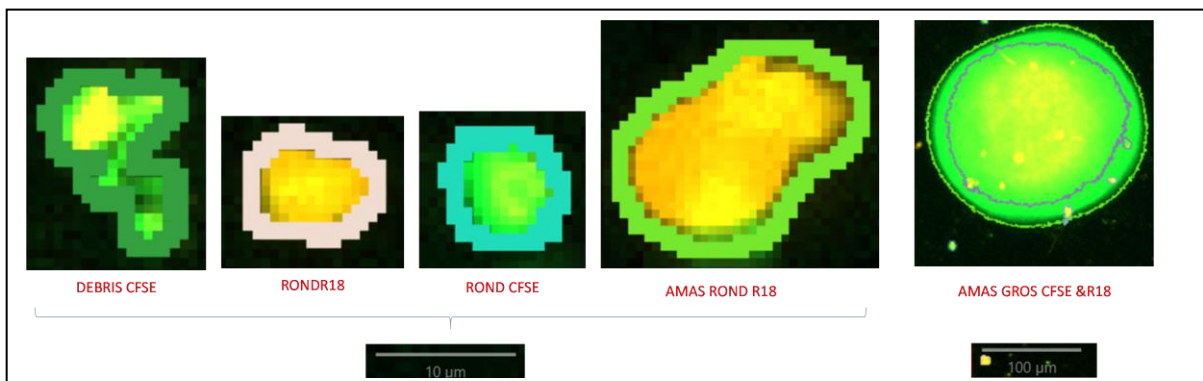


Figure 29 Exemples de formes détectées et exclues du comptage

Détections des autres formes que les spermatozoïdes avec QuPath après analyse au scanner de lames. Ces formes ont été classées dans les différentes classes définies dans le Matériel et Méthodes chapitre III.5.5

Les formes constituées par les spermatozoïdes isolés et de petits amas de spermatozoïdes ont été conservées pour le comptage des spermatozoïdes (figure 28), alors que les autres formes ont été exclues (figure 29). Les objets fluorescents qui ont été retirés du comptage sont de grande taille (taches de poussières...), de petite taille (auto fluorescence de certaines cellules) et de formes diverses pour les débris cellulaires.

1.3.1.2. Classification manuelle

1.3.1.2.1 Retrait des faux positifs

Après l'analyse automatisée de QuPath, certaines images nécessitaient de retirer manuellement certaines formes qui se retrouvaient dans la classe « SPZ » des spermatozoïdes. Cette proportion de faux positifs dépendait de la qualité de l'échantillon.

Pour les échantillons de cornes utérines, des formes fluorescentes diverses correspondant à des spermatozoïdes en cours de phagocytose ont été observées et étaient plus ou moins présentes selon les échantillons (figure 30).

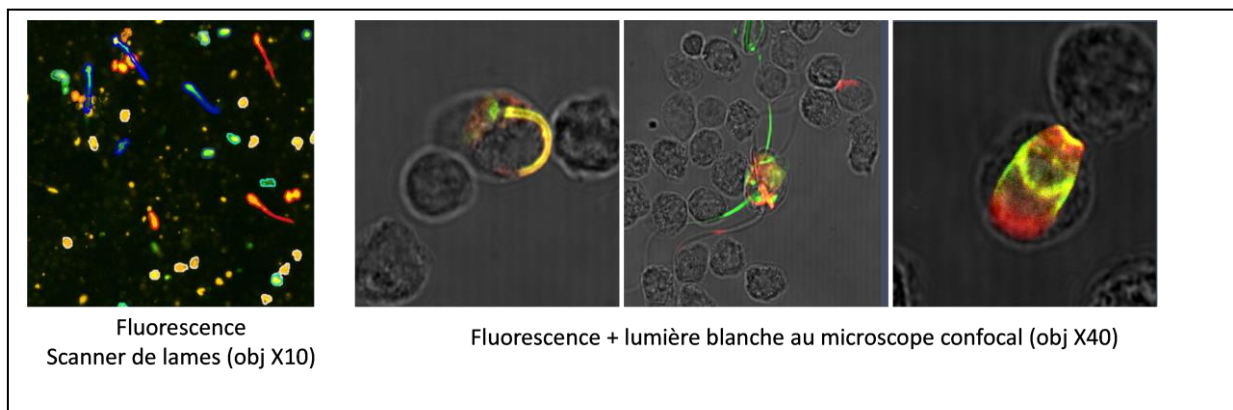


Figure 30 Images de rinçage de cornes utérines au scanner de lames et au microscope confocal

Après IA, le rinçage utérin a été fixé au paraformaldéhyde et les spermatozoïdes ont été rincés au PBS et puis visualisé au scanner de lames (objectif X10) et au microscope confocal (objectif X40). Les cellules immunitaires étaient visibles en lumière blanche et les spermatozoïdes phagocytés en fluorescence.

Ces spermatozoïdes phagocytés étaient visualisés à l'intérieur des cellules utérines avec l'objectif X40 et la superposition de la fluorescence et de la lumière blanche. Au contraire, ils étaient difficiles à observer au scanner de lames à l'objectif X10. Sur les images au X40, les cellules immunitaires de l'utérus ne contenant pas de spermatozoïdes ne présentaient pas d'autofluorescence, ce qui suggérait que les formes fluorescentes observées au scanner de lames étaient majoritairement des spermatozoïdes en cours de phagocytose.

D'autres formes fluorescentes nécessitaient aussi un tri manuel dans la classe « SPZ » comme les taches de poussière qui génèrent des faux positifs (figure 31).

La présence de taches de poussière faiblement fluorescentes en vert (malgré les précautions prises) pouvait faire apparaître des débris entrant dans la classe « SPZ ». Ces taches étaient repérées et les objets à l'intérieur étaient supprimés.

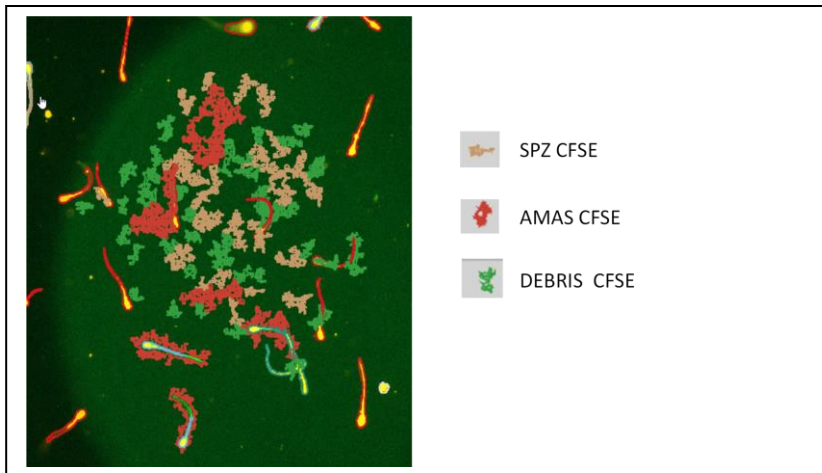


Figure 31 Image des débris faux positifs dans une tache de poussière

Les débris, selon leurs formes, faisaient partie des classes « SPZ CFSE » (en marron) ou « DEBRIS CFSE » (en vert) ou « AMAS SPZ CFSE » (rouge foncé).

1.3.1.2.2. Ajout des faux négatifs

Sur certaines images et plus fréquemment sur les échantillons épais, les spermatozoïdes marqués au R18 étaient acquis avec une mauvaise focalisation et apparaissaient avec une tête ronde (plutôt qu'ovale) et un flagelle flou et diffus. Le classement dans la classe « RONDE » ou « SPZ » était délicat pour ce cas de figure. Pour les rinçages et les cellules d'oviducte où souvent peu de spermatozoïdes ont été détectés, un tri manuel a été effectué pour décider visuellement à quelle classe appartenait le spermatozoïde. Pour le marquage au CFSE, cette distinction était plus facile car le flagelle des spermatozoïdes dans le tractus était souvent plus visible et mieux segmenté. Un exemple de cette mauvaise focalisation et classification est montré [figure 32](#).

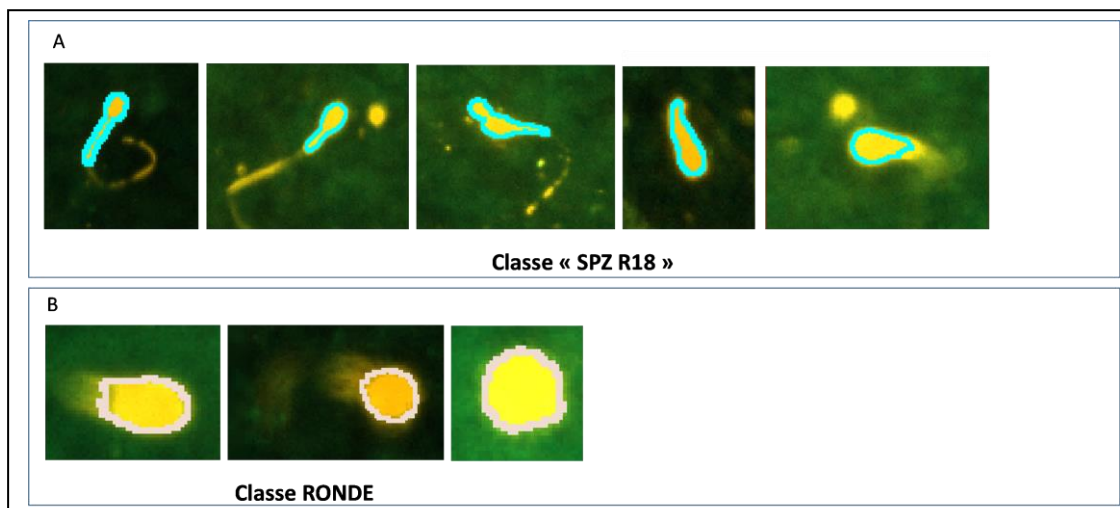


Figure 32 Exemples de discrimination difficile des spermatozoïdes R18

(A) Exemples de segmentation pour la classe « SPZ R18 » et (B) pour la classe « RONDE » (cf. chapitre III.5.5 pour la définition des classes). Pour la classe « RONDE » en (B), les deux premières images semblent être des spermatozoïdes dont le flagelle apparaît flou en arrière-plan alors que celle de droite semble strictement ronde.

1.3.1.3. Traitement des échantillons de tissus/cellules épais

Le dépôt des échantillons constitués d'un fin morceau de tissu (JUT pour la méthode où elle était découpée sur un filtre) ou d'amas cellulaires (cellules de l'oviducte) (cf. [chapitre III.5.2](#)) qui s'effectuait entre lame et lamelle était plus épais qu'un dépôt liquide. De plus, ce type de dépôt présentait un bruit de fond plus important (dû à l'autofluorescence des cellules) dans le canal du CFSE et plus faiblement

dans celui du R18. L'acquisition avec un canal supplémentaire qui correspondait uniquement au bruit de fond de ces cellules (canal CY2) a permis de retirer le bruit de fond généré par ces types d'échantillons avec un gain sur la segmentation des spermatozoïdes et sur la diminution du nombre de débris lors de l'analyse d'image (données non présentées, comparaison d'une analyse sans / avec retrait du bruit de fond sur une petite portion de l'image). Comme les spermatozoïdes ont été répartis sur une plus grande épaisseur, plusieurs plans focaux ont été scannés puis superposés pour générer l'image finale. Un exemple avant / après retrait du bruit de fond est présenté [figure 33](#).

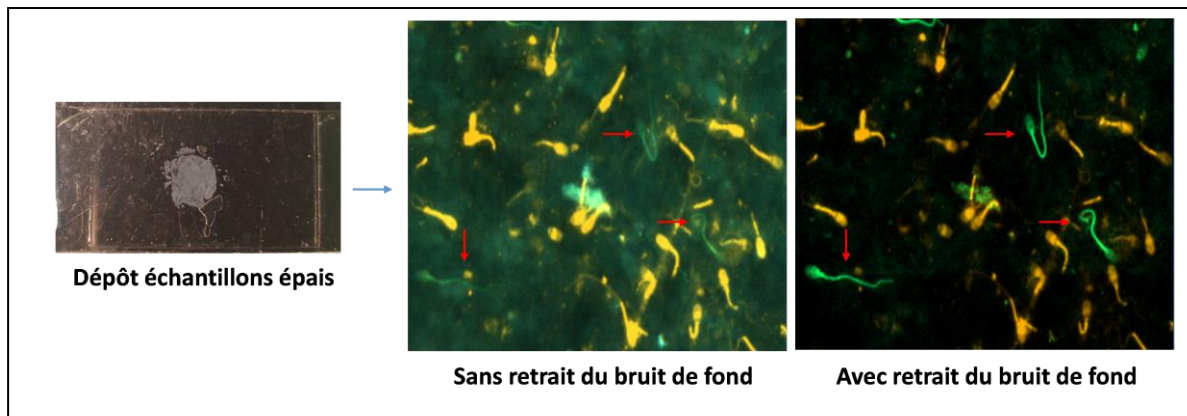


Figure 33 Image d'un amas de cellules de la JUT

Les images montrent des amas de cellules pour la JUT avant et après retrait du bruit de fond. Les spermatozoïdes verts apparaissent nettement mieux sur les images de droite que sur celle de gauche.

1.3.2. Validation du marquage différentiel des spermatozoïdes marqués au CFSE et R18

Le CFSE et le R18 ont été choisis pour effectuer la validation du marquage différentiel (cf. partie Résultats [chapitre IV.1](#)) car ils respectaient les critères définis dans le Matériel et Méthode (cf. [chapitre III.4.2.](#)).

Le but de cette validation était de comparer avant et après IA la proportion des spermatozoïdes marqués au CFSE et au R18. La proportion de ces deux marquages quantifiés dans le tractus femelle après IA devra être proche de la proportion connue avant IA pour valider la méthode.

Trois proportions définies d'un mélange de spermatozoïdes marqués avec l'un ou l'autre de ces fluorochromes et provenant d'une même dose ont été quantifiées avec le scanner de lames dans les différentes régions du tractus 3 h après IA, selon le protocole [chapitre III.7](#). Une quantification du mélange des spermatozoïdes marqués avant insémination a été faite au scanner de lames pour chaque insémination avec à chaque fois un résultat ratiométrique très proche du ratio théorique (données non montrées).

Les résultats du [tableau 4](#) et la [figure 34](#) ont été obtenus avec les quantifications réalisées pour chaque région définie au [chapitre III.5.2](#) : cervix et utérus (CER, CUT, CaUT, MiUT, CrUT), JUT (rinçage et découpe sur filtre), oviducte (CaIS, CrIS, AM ; rinçage et cellules). Tous les résultats de quantification des régions ont été pris en compte sauf celles où moins de 20 spermatozoïdes totaux/image étaient présents et celles pour deux régions de l'oviducte aux valeurs de ratio extrêmes. Pour les échantillons

qui ont été déposés en duplicate, le nombre de spermatozoïdes par région a été calculé en faisant la moyenne des deux répliquats.

CFSE	Proportion CFSE / R18		
	25%	50%	75%
R18	75%	50%	25%
Nombre échantillons analysées	41	45	35
Ratio spz CFSE/R18 avant IA	0,33	1	3
Ratio spz CFSE/R18 après IA	0,35	1,06	3,11
CV (coefficient de variation) %	18,77	32,89	16,72
Erreur relative (%)	5,20	6,49	3,78

Tableau 4 Validation du marquage différentiel CFSE et R18

Pour les 3 proportions de spermatozoïdes inséminés ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, de CFSE par rapport au R18), le ratio CFSE / R18 avant IA a été comparé au ratio après IA. Les estimations du coefficient de variation (CV) et de l'erreur relative ont servi à valider la méthode. $CV = \text{écart type} / \text{moyenne} * 100$, $\text{Biais} = \text{ratio CFSE} / \text{R18 après IA} - \text{ratio CFSE} / \text{R18 avant IA}$, $\text{Erreur relative} = \text{Biais} / \text{ratio avant IA} * 100$.

Pour les 3 proportions de spermatozoïdes marqués CFSE et R18, le calcul du coefficient de variation (CV) a permis de comparer la dispersion des ratios obtenus pour chaque proportion. Ce CV est plus faible pour les conditions 1 et 3 (environ 17%) et il atteint 33% pour la condition 2. L'erreur relative était inférieure à 7 % toutes conditions confondues ce qui paraît satisfaisant pour des comptages après insémination. Cependant quand l'erreur a été représentée en valeur absolue en fonction du nombre de spermatozoïdes par image (voir [figure 34](#)), il est observé que, toutes conditions confondues, la dispersion des valeurs de cette erreur n'est pas homogène mais varie selon le nombre de spermatozoïdes totaux détectés par image. La régression non linéaire spline a permis de représenter l'évolution de cette variation. Il est observé une variabilité maximale pour les conditions où il y a le moins de spermatozoïdes / image. Cette variabilité diminue légèrement de 10 à 500 spermatozoïdes / image, plus fortement de 500 à 1500 spermatozoïdes / image puis elle se stabilise. Les nombres de spermatozoïdes / image pour les échantillons d'oviducte (point vert) sont tous compris entre 10 et 500, intervalle où la variabilité est plus importante.

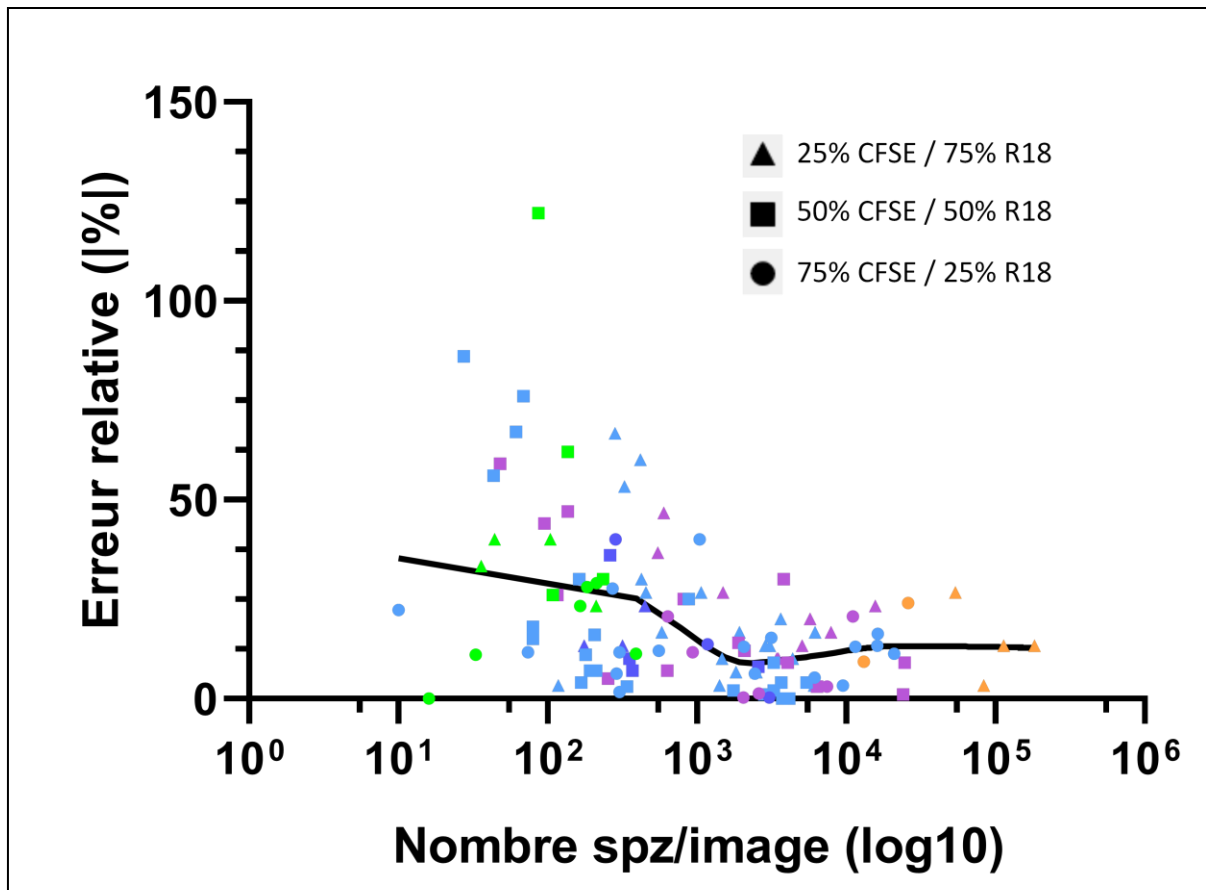


Figure 34 Erreur relative en fonction du nombre de spermatozoïdes comptés par région

Représentation de l'erreur relative en % et en valeur absolue pour la proportion 25 % CFSE / 75 % R18 (triangle), 50 % CFSE / 50 % R18 (carré) et 75 % CFSE / 25 % R18 (rond) en fonction du nombre de spermatozoïdes par image. Une régression spline a été appliquée. Chaque valeur correspond au nombre de spermatozoïdes comptés par image ou la moyenne du nombre de spermatozoïdes par image pour les duplicatas de dépôts. Les régions du tractus sont indiquées par un code couleur. La catégorie « JUT (amas) » correspond à des comptages d'échantillons de JUT pour lesquels un amas de cellules non pipetable était présent.

2. Phénotypage de la migration spermatique 3 h après IA

La migration spermatique a pu être évaluée chez 15 cochettes en dénombrant les spermatozoïdes dans les différentes les régions du tractus femelle 3 h après IA avec le scanner de lames selon le protocole [chapitre III.8](#). Les résultats de phénotypage ont été obtenus avec les quantifications réalisées pour chaque région définie au [chapitre III.6.1](#) : Utérus (CaUt, MiUt, CrUt), JUT et oviducte (CaIS, CrIS, AM). Les régions du cervix (CER) et du corps utérin (CUT) n'ont pas été incluses dans ce phénotypage (prélèvements qui n'avaient pas été effectués pour les premières cochettes de l'étude).

L'évaluation du stade du cycle, le nombre de follicules pré-ovulatoire ou ayant ovulés par ovaire et les dimensions des cornes utérines et des oviductes sont présentés dans le tableau en [annexe 2](#). Les valeurs individuelles de comptage sont présentées dans des tableaux en [annexe 3](#) pour les cornes utérines et la JUT [et en annexe 4](#) pour les oviductes.

Après récupération du tractus, l'évaluation des ovaires a permis de vérifier que les cochettes étaient à un stade propice à la fécondation. En effet, elles présentaient toutes des follicules pré-ovulatoires (4-6 mm de diamètre) et/ou des follicules ayant ovulés.

Parmi les cochettes, 40 % avaient ovulé (6 sur 15) au moment de l'observation, soit 36 h après le traitement buséréline. Les ovaires ayant été observés après abattage 3 h après l'IA, il était possible que les follicules ayant ovulé aient été au stade pré-ovulatoire au moment de l'IA.

2.1. Comptage des spermatozoïdes dans les régions du tractus femelle

Les résultats présentant la distribution des spermatozoïdes le long du tractus ont été obtenus avec 13 cochettes (sur les 15 mentionnées ci-dessus) pour lesquelles au moins 1 spermatozoïde a été observé dans les oviductes. En effet, même si les spermatozoïdes ont été retrouvés pour toutes les cochettes dans les cornes utérines et la JUT, la visualisation des spermatozoïdes dans l'oviducte était une preuve qu'ils avaient bien franchi la jonction utéro-tubaire. Ainsi, les 2 cochettes pour lesquelles aucun spermatozoïde n'a été trouvé dans les oviductes ont été écartées.

Les résultats des comptages dans chaque région du tractus du côté gauche et du côté droit sont résumés dans le [tableau 5](#) et les données individuelles indiquées dans l'[annexe 4](#) (régions de la corne utérine et région de la jonction utéro-tubaire) et [annexe 5](#) (régions de l'oviducte).

Régions		Nombre de spermatozoïdes côté gauche					Nombre de spermatozoïdes côté droit				
		Médiane	Moyenne	Min	Max	Cochette sans spz	Médiane	Moyenne	Min	Max	Cochette sans spz
Utérus	Caudal	2,39E+06	7,38E+06	2,60E+05	5,55E+07	0	2,28E+06	1,31E+07	7,17E+03	6,25E+07	0
	Milieu	3,66E+06	8,97E+06	2,33E+05	5,81E+07	0	3,64E+06	1,29E+07	2,03E+05	7,91E+07	0
	Cranial	6,31E+06	8,55E+06	9,16E+04	3,05E+07	0	4,92E+06	9,79E+06	5,85E+05	4,35E+07	0
JUT		2,84E+04	4,57E+04	2,56E+03	1,59E+05	0	2,35E+04	4,00E+04	2,56E+03	1,56E+05	0
Oviducte	Isthme caudal	1	216	0	1260	6	12	206	0	2090	3
	Isthme cranial	3	34	0	284	5	4	45	0	198	6
	Ampoule	1	27	0	136	6	9	108	0	626	4

Tableau 5 Comptages de spermatozoïdes dans le tractus femelle pour les côtés gauche et droit

Résultats de comptages du nombre de spermatozoïdes, exprimés par la médiane, la moyenne, le minimum et le maximum de spermatozoïdes, pour chaque région du tractus du côté gauche et droit, ainsi que le nombre de cochettes pour lesquelles aucun spermatozoïde n'a pu être visualisé dans la région considérée après analyse au scanner de lames.

Les valeurs médianes et moyennes des côtés droit et gauche étaient proches pour les régions de cornes utérines et la JUT. Néanmoins une forte variabilité a été constatée entre cochettes (cf. [annexe 3](#)). Pour les comptages dans les oviductes, il a été constaté aussi une forte variabilité entre cochettes et entre régions. Pour certaines femelles, les spermatozoïdes ont été retrouvés dans toutes les régions alors que pour d'autres, les spermatozoïdes ont été seulement présents dans l'isthme ou dans l'ampoule (cf. [annexe 4](#)). Avec les données de ces 13 cochettes, aucune corrélation n'a pu être établie entre le nombre de spermatozoïdes dans les cornes utérines et la JUT et entre le nombre de spermatozoïdes dans la JUT et l'oviducte (données non montrées).

2.2. Représentation de la densité spermatique le long du tractus femelle

Les données de comptage étant très variables entre cochettes, l'évolution du nombre de spermatozoïdes dans le tractus femelle a été représentée en exprimant le nombre de spermatozoïdes comptés dans les différentes régions en fonction du nombre de spermatozoïdes dans la région caudale de l'utérus (en pourcentage). De plus, comme les régions avaient des longueurs différentes, chaque pourcentage a été exprimé pour 1 cm de région afin de représenter la densité spermatique le long du tractus femelle. L'ensemble des 15 cochettes de l'étude a été pris en compte pour cette comparaison ([figure 35](#)).

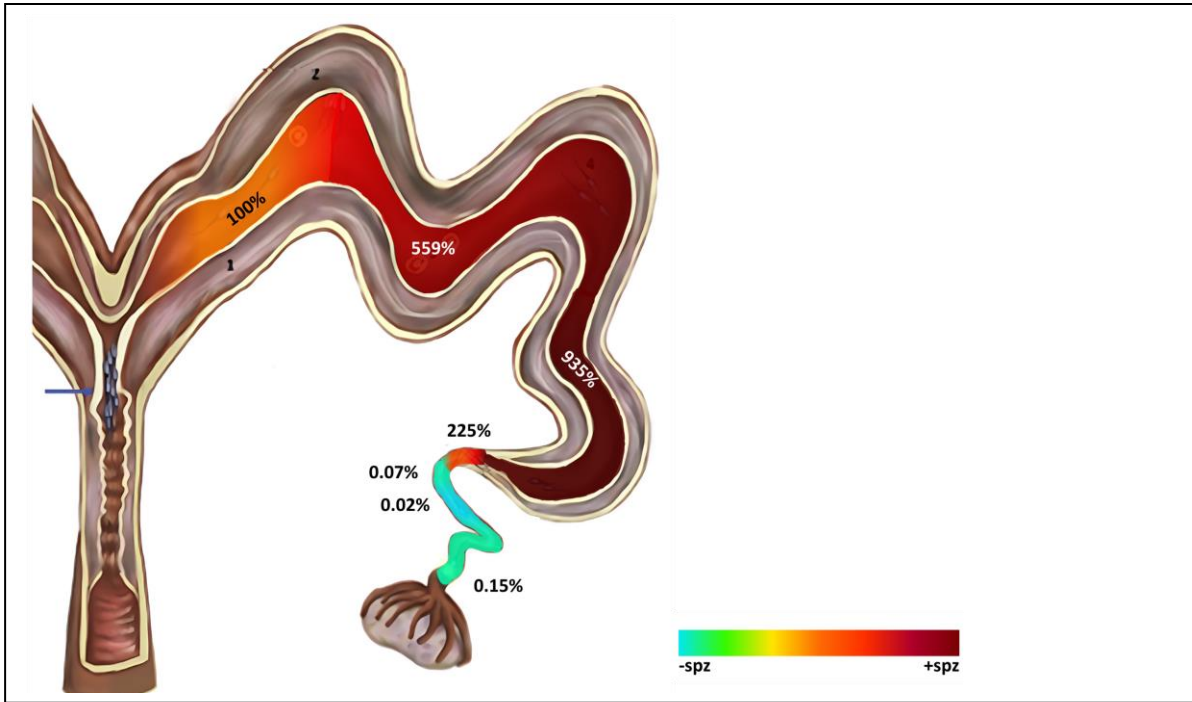


Figure 35 Représentation de la densité spermatique le long du tractus femelle

(A) Pour chacune des 7 régions, le nombre de spermatozoïdes a été exprimé en % du nombre de spermatozoïdes dans la corne utérine caudale puis divisé par la longueur moyenne de la région (CaUT = 40 cm, CrUT = 40 cm, MiUT = 40 cm, JUT = 2 cm, CaIS = 5,8 cm, CrIS = 5,8 cm, AM = 14,5 cm). Un code couleur allant du bleu (faible densité de spermatozoïdes) au rouge foncé (forte densité) illustre la répartition des spermatozoïdes dans le tractus femelle (il est considéré que le % calculé pour 1 cm de région était homogène le long cette région).

2.3. Gradient de spermatozoïdes dans les cornes utérines

Avec les données issues des calculs effectués pour la représentation de la densité spermatique (chapitre 2.2.), la région caudale (à 100% pour toutes les cochettes), la région du milieu et la région crâniale de la corne utérine ont été comparées dans la figure 36.

La quantification des spermatozoïdes dans les trois régions de la corne utérine a permis de montrer une augmentation significative du nombre de spermatozoïdes dans les régions du milieu et crâniale par rapport à la région caudale. Ceci pourrait suggérer une remontée des spermatozoïdes mobiles qui réussissent tout de même à progresser vers le haut des cornes utérines, malgré les forces de poussée des contractions utérines, décrites comme pouvant être bidirectionnelles, qui entraînent les spermatozoïdes.

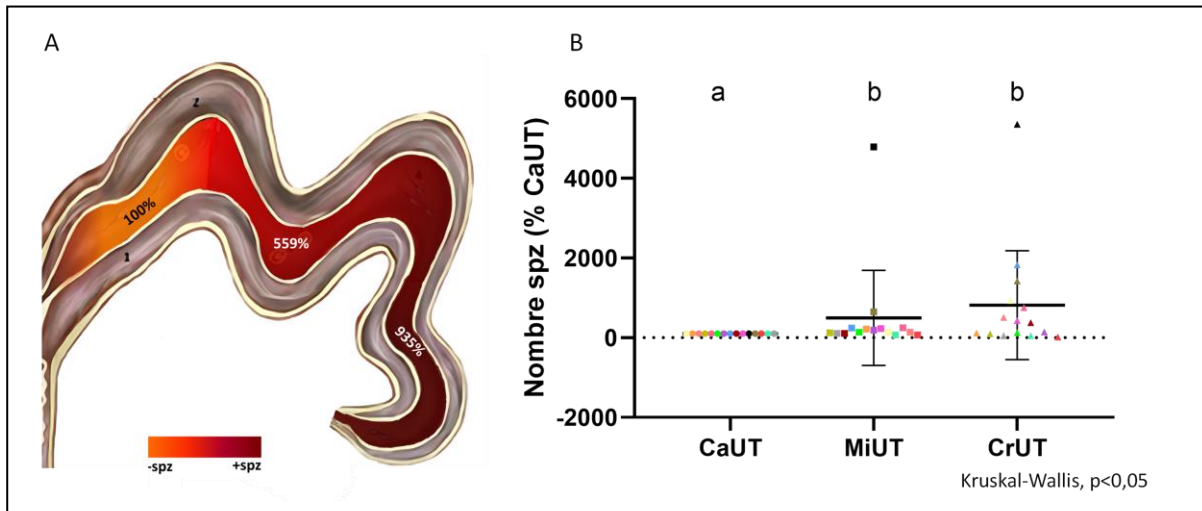


Figure 36 Gradient ascendant de spermatozoïde dans la cornes utérines

(A) Un code couleur allant de l'orange au rouge foncée illustre la répartition des spermatozoïdes dans cornes utérines (il est considéré que le % calculé pour 1 cm de région était homogène le long cette région).

(B) Pour les cornes utérines, les valeurs individuelles ont été représentées pour chaque cochette (une couleur /cochette) ainsi que la valeur moyenne \pm écart type. Le % de spermatozoïdes dans la région du milieu et crâniale de la corne utérine est significativement plus élevé que dans la région caudale.

CaUT corne utérine caudale, MiUT = corne utérine milieu, CrUT = corne utérine crâniale.

Ce gradient de concentration, globalement croissant entre CaUT et CrUT était très variable entre cochettes mais également entre cornes utérines. La **figure 37** illustre cette variabilité entre les cornes utérines gauches et droites pour les 15 cochettes de l'étude.

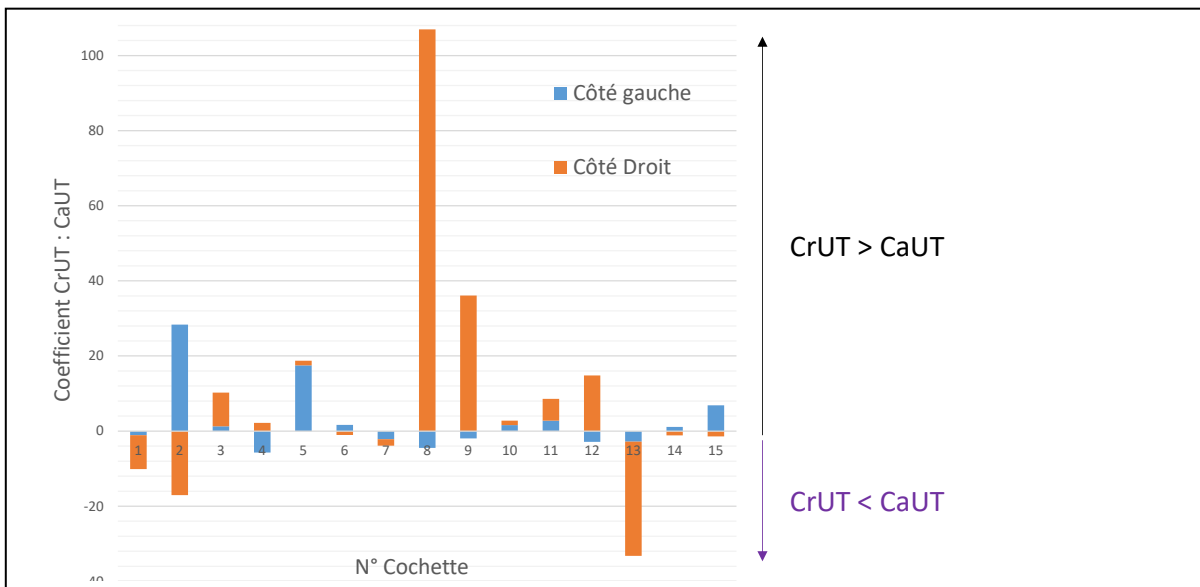


Figure 37 : Variabilité des spermatozoïdes dans les cornes utérines entre le côté gauche et le côté droit

Le coefficient entre les nombres de spermatozoïdes des régions crâniale et caudale des cornes utérines a été calculé (nombre supérieur / nombre inférieur). Un signe négatif a été ensuite attribué aux conditions où le nombre de spermatozoïdes dans la région CrUT étant inférieur à la région CaUT. Une diminution du nombre de spermatozoïdes dans la région crâniale par rapport à la région caudale sera donc visualisée par les valeurs négatives alors qu'une augmentation le sera par les valeurs positives. Les côtés gauche (en bleu) et droit (en orange) ont été représentés pour chacune des 15 cochettes.

Ce graphique illustre la variabilité entre cochettes au niveau des nombres de spermatozoïdes comptés dans la région crâniale des cornes utérines par rapport à la région caudale. Par exemple, les cochettes 2, 8, 9 et 13 avaient une forte variation (coefficient multiplicateur >20) entre ces deux régions alors que cette variation était plus modérée ou faible chez les autres cochettes. Cette forte variation a pu concerner une seule corne utérine comme c'est le cas pour les cochettes 8, 9 et 13 (comparaison des histogrammes bleu et orange pour une cochette donnée).

2.4. Sélection spermatique par la jonction utéro-tubaire

Avec les données issues des calculs effectués pour la représentation de la densité spermatique ([chapitre 2.2.](#)), la corne utérine, la jonction utéro-tubaire et l'oviducte ont été comparés.

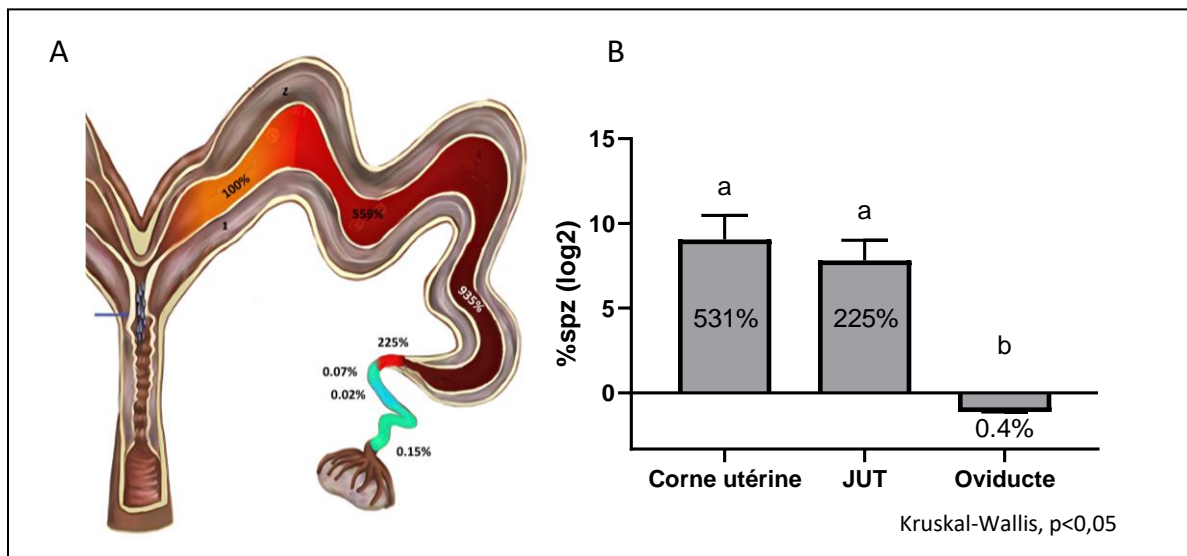


Figure 38 Sélection des spermatozoïdes par la jonction utéro-tubaire

(A) Représentation de la densité spermatique le long du tractus femelle (voir figure 35). (B) La moyenne des pourcentages pour les 3 régions de la corne utérine, le pourcentage pour la JUT et moyenne des pourcentages pour les 3 régions de l'oviducte ont été comparés statistiquement avec un test de Kruskal-Wallis.

Il est constaté une très forte diminution significative de la densité spermatique dans l'oviducte par rapport à la jonction utéro-tubaire et à la corne utérine.

2.5. Retenue des spermatozoïdes dans l'isthme caudale

Il a été observé un nombre (en moyenne) plus élevé de spermatozoïdes dans l'isthme caudal par rapport aux deux autres régions (isthme crânial et ampoule) mais cette différence n'a pas été validée. Pour faire une analyse statistique par Chi-Square, les nombres de spermatozoïdes de toutes les cochettes dans une région sont additionnés et rapportés à la somme du total des spermatozoïdes comptés dans tout l'oviducte ([figure 39](#)).

Il a été observé qu'une plus grande proportion de spermatozoïdes a été retrouvée dans la région de l'isthme caudale par rapport à l'isthme crânial et à l'ampoule, avec plus de la moitié des spermatozoïdes qui ont été dénombrés dans cette région par rapport au total.

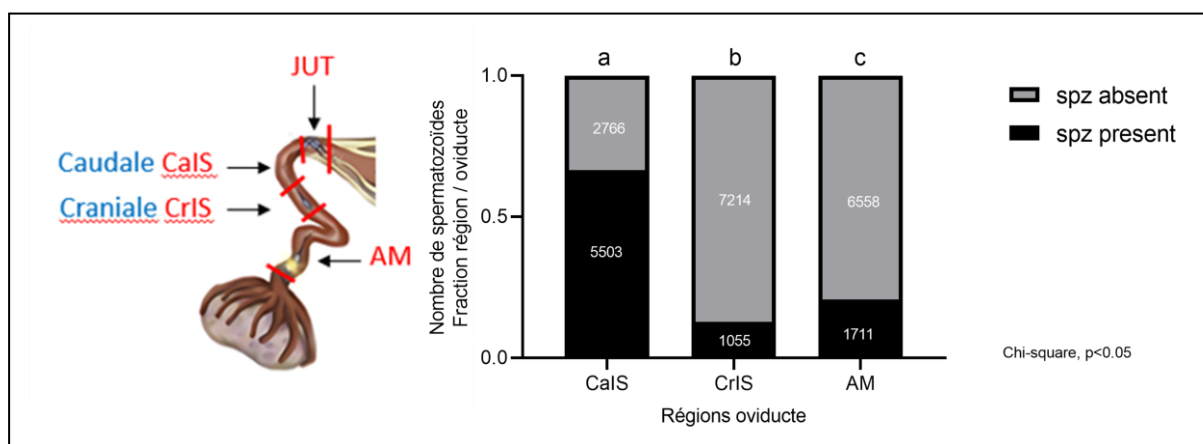


Figure 39 Proportion des spermatozoïdes entre les différentes régions de l’oviducte

Proportion (sous forme de fraction) du nombre des spermatozoïdes pour les 3 régions de l’oviducte (histogramme noir) par rapport à l’oviducte entier (histogramme complet). Le test Chi-square a été effectué sur les valeurs indiquées en blanc sur le graphique et qui représentent la somme des spermatozoïdes présents / absents pour les 26 oviductes de 13 cochettes. CalS = Isthme caudal, CrIS = Isthme crânial, AM = Ampoule.

2.6. Redistribution des spermatozoïdes au moment de l’ovulation

L’évaluation de la migration spermatique dans l’oviducte présentée ci-dessus est globale et elle ne tient pas compte de l’effet du stade du cycle. L’évaluation des ovaires sur les tractus de cochettes a permis de confirmer que les inséminations étaient bien effectuées au stade peri-ovulatoire et d’identifier des 7 cochettes au stade pré-ovulatoire et 6 cochettes au stade post-ovulatoire. La comparaison de la distribution des spermatozoïdes dans les trois régions de l’oviducte (isthme caudal, isthme crânial et ampoule) entre ces deux stades (pré- / post-ovulatoires) est présentée dans la figure 40. Comme dans le [paragraphe 2.1.2.4](#) ci-dessus, pour faire une analyse statistique par Chi-Square, les nombres de spermatozoïdes de toutes les cochettes dans une région sont additionnés et rapportés à la somme du total des spermatozoïdes comptés dans tout l’oviducte. Le graphique A de la [figure 40](#) représente ces données sous forme de fraction, avec les nombres de spermatozoïdes qui ont été utilisés pour faire le test statistique indiqué en blanc. Le graphique B de la [figure 40](#) représente ces données sous forme de pourcentage pour une meilleure visibilité des données.

Il est constaté que les spermatozoïdes de la région de l’isthme caudal représentaient environ $\frac{3}{4}$ du total avant ovulation alors qu’ils ne représentaient que moins de la moitié du total après l’ovulation. Cette proportion région / total dans l’oviducte entre avant / après l’ovulation sont plus équilibrées dans la région de l’isthme crânial et elle est plus élevée après l’ovulation qu’avant l’ovulation dans la région de l’ampoule.

L’ovulation a donc eu un effet important sur le transit des spermatozoïdes et a permis la progression des spermatozoïdes de l’isthme vers l’ampoule.

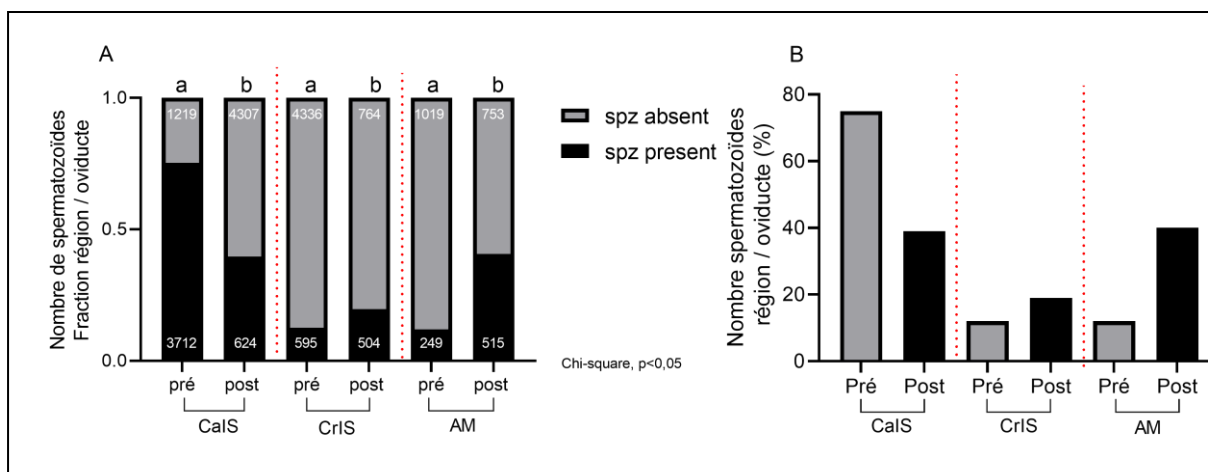


Figure 40 Proportion des spermatozoïdes entre les différentes régions de l'oviducte avant et après l'ovulation

A) Proportion (sous forme de fraction) du nombre des spermatozoïdes pour les 3 régions de l'oviducte (histogramme noir) par rapport à l'oviducte entier (histogramme complet). Le test Chi-square a été effectué entre la condition pré-ovulatoire (pré) et poste ovulatoire (post) de chaque région de l'oviducte sur les valeurs indiquées en blanc sur le graphique et qui représentent la somme des spermatozoïdes présents / absents pour 14 oviductes au stade pré-ovulatoire et 8 oviductes au stade en post-ovulatoire.

(B) Pourcentage de spermatozoïdes des 3 régions de l'oviducte par rapport au total pour le stade pré-ovulatoire (en gris) et post-ovulatoire (en noir). Cette représentation permet d'illustrer l'évolution du nombre de spermatides dans les trois régions de l'oviducte entre le stade pré-ovulatoire (avant l'ovulation) et post ovulatoire (après l'ovulation).

3. Capacité de migration de spermatozoïdes de verrats extrêmes pour la résistance au stress hypo-osmotique

3.1. Identification de spermatozoïdes de verrats extrêmes pour la résistance au stress hypo-osmotique

L'évaluation de nombreux verrats sur le critère de la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique a été réalisée pour constituer deux groupes de verrats extrêmes : un premier groupe de verrats dont les spermatozoïdes avaient une faible résistance (= résistants (-)) et un second groupe de verrats dont les spermatozoïdes avaient une forte résistance (= résistants (+)). Au total, 41 verrats de race Landrace et 44 verrats de race Large White ont été analysés avec au moins un éjaculat/verrat.

Un total de 6 éjaculats de verrot de la race Landrace et 9 de la race Large White, a été retiré du jeu de données car ils présentaient une viabilité < 65 % pour la condition contrôle (viabilité en condition isotonique 330 mOsm/L). De plus, un nombre important de verrats ont été aussi retirés car ils avaient été évalués avec seulement 1 à 2 éjaculats, ce qui a restreint l'effectif final à 26 verrats Landrace et 28 verrats Large White pour lesquels au moins 3 éjaculats ont pu être évalués. Ces verrats ont donc été conservés pour l'analyse et la constitution des groupes. Les mesures de résistance au stress hypo-osmotique sont présentées dans la [figure 40](#).

Les résultats des mesures de résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique ont montré que la résistance des spermatozoïdes verrats Landrace était légèrement supérieure à ceux de la race Large White avec respectivement 28,5 % et 19,7 % de spermatozoïdes viables en moyenne à 99 mOsm/L. Des différences de réponse entre verrats ont été mises en évidence, avec une amplitude de réponse plus grande (ratio maximum de 3,4) pour la race Landrace que la race Large White (ratio maximum 2,3).

L'analyse de comparaison multiple (Kruskal Wallis, Uncorrected Dunn's test) a permis de valider statistiquement les différences entre les verrats extrêmes (faible ou forte diminution de la viabilité après stress hypo-osmotique) pour les deux lignées. Cependant, l'objectif était de constituer pour chaque lignée deux groupes extrêmes de 6-7 verrats selon leur résistance osmotique. Cela a pu être réalisé pour les verrats Landrace parmi lesquels les deux groupes constitués des verrats n°1 à 7 et n°21 à 26 étaient statistiquement différents. En revanche pour la lignée Large White (28 verrats totaux), nous n'avons pas pu obtenir deux groupes extrêmes statistiquement différents.

Sur les 13 verrats Landrace, 12 ont été transférés dans une unité INRAE (Porganic) afin de les conserver pour réaliser les évaluations de la migration spermatique. En effet, la carrière de ces verrats, provenant de centres d'IA, peut être assez courte et nous ne pouvions pas anticiper le moment où ils seraient remplacés. Pour les raisons d'impossibilité de collecte suite à leur transfert et divers problèmes de santé, plusieurs verrats extrêmes n'ont pas pu être conservés dans les groupes après leur transfert.

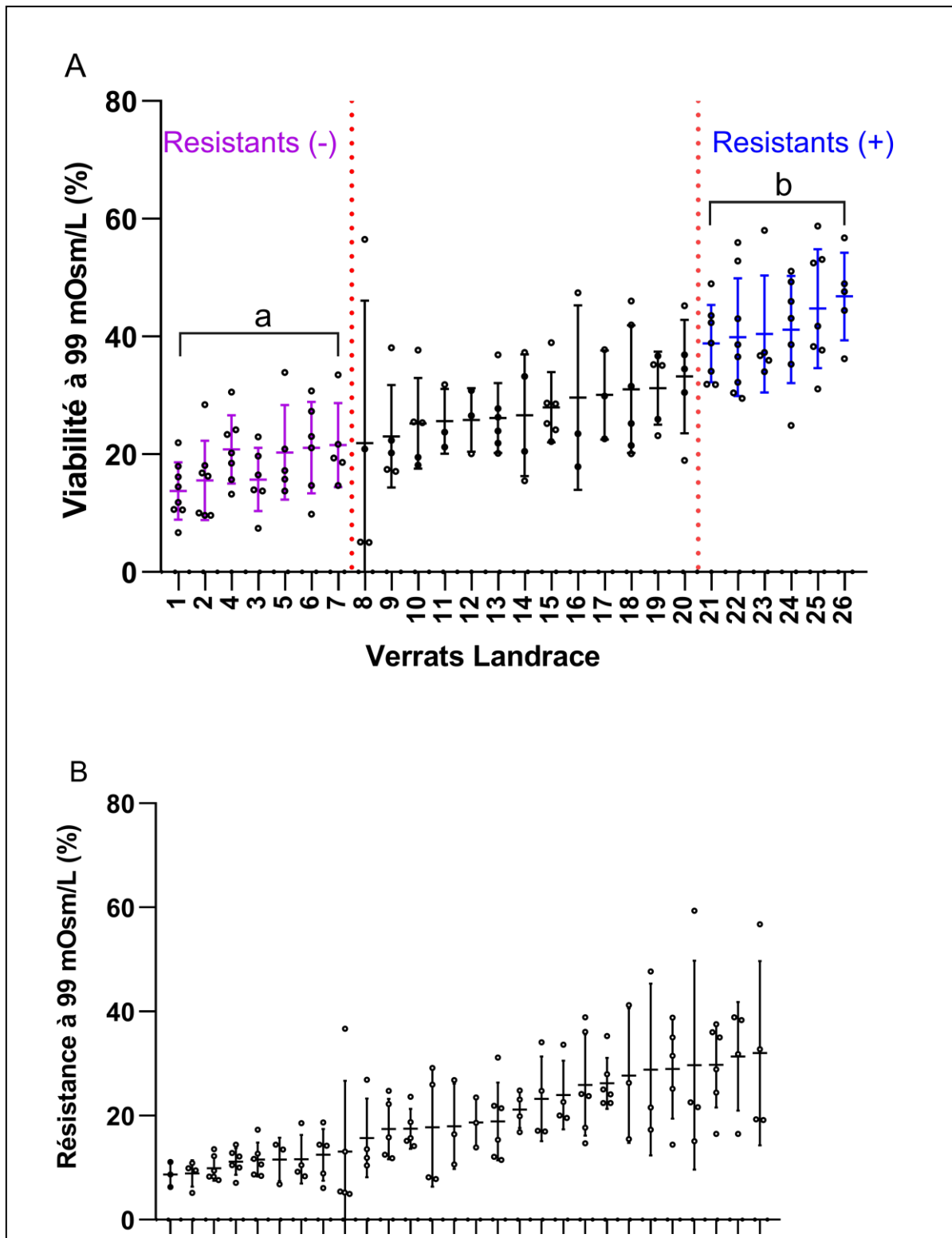


Figure 41 Résistance des spermatozoïdes à un stress hypo-osmotique pour les races Landrace et Large White

Comparaison de la viabilité des spermatozoïdes de verrat après un stress hypo-osmotique à 99 mOsm/L à 17°C pour (A) la race Landrace (3 à 8 éjaculats / verrat) et (B) la race Large White (3 à 6 éjaculats / verrat) évaluée par cytométrie de flux. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants à 99 mOsm/L a été exprimé en pourcentage du pourcentage initial de spermatozoïdes vivants à 330 mOsm (valeurs individuelles et moyenne \pm écart type).

Le groupe de 7 verrats dont les spermatozoïdes avaient les plus faibles résistances (résistants (-), en violet) est statistiquement différent groupe des 6 verrats dont les spermatozoïdes avaient les plus fortes résistances (résistants (+), en bleu) après l'analyse statistique de Kruskal Wallis, Uncorrected Dunn's test, $p < 0.05$

3.2. Comparaison de la migration des spermatozoïdes extrêmes pour la résistance au stress hypo-osmotique

Avec les groupes constitués précédemment, la capacité à migrer entre des spermatozoïdes faiblement ou fortement résistants au stress hypo-osmotique a été évaluée en comparant leur distribution au sein d'un même tractus de cochette selon le protocole [chapitre III.11.](#)

Trois cochettes ont été inséminées avec des doses hétérospermiqes constituées d'un mélange : 50 % spermatozoïdes de verrat résistants (-) marqués au CFSE / 50 % de spermatozoïdes verrat résistants (+) marqués au R18.

L'identification, le groupe et les mesures de résistance des spermatozoïdes de verrats (obtenus au [chapitre précédent IV.3.1, figure 37](#)) pour les 3 IA qui ont été effectuées sont présentés dans la [figure 42](#).

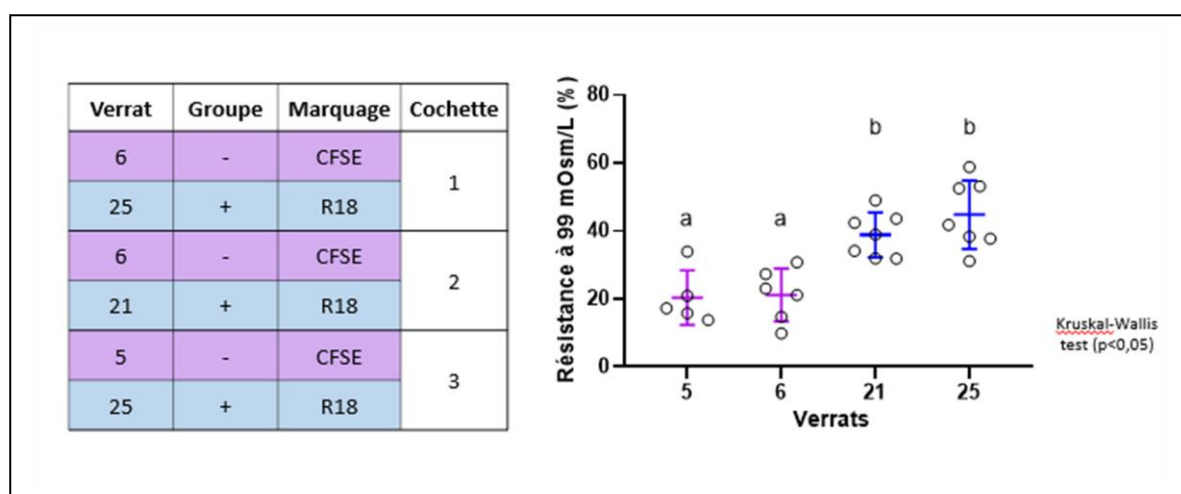


Figure 42 Identification des verrats pour les IA hétérospermiqes de spermatozoïdes résistants (-) et résistants (+)

A gauche, le tableau indique les numéros des deux verrats dont les spermatozoïdes sont résistants (-) ou résistants (+) et dont les spermatozoïdes ont été mélangés pour chacune des trois IA hétérospermiqes. A droite, la mesure de la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique de ces mêmes verrats : verrat n °5 (n = 5 éjaculats), verrat n °6 (n = 6), verrat n °21 (n = 7) et verrat n °25 (n = 7).

Après récupération des tractus, les spermatozoïdes ont été quantifiés avec le scanner de lames dans les différentes régions. Suite à ces analyses, plusieurs régions du côté gauche et droit du tractus ont présenté un nombre insuffisant ou nul de spermatozoïdes pour être évaluées (< 100), conformément aux résultats de la validation de la méthode de marquage différentiel ([chapitre IV.3.](#)). Les échantillons d'oviducte ayant peu de spermatozoïdes comptés, sauf pour un échantillon, ne sont donc pas présentés. Ces échantillons n'apparaissent pas dans le tableau de résultats en [annexe 5](#), qui présente les ratios de spermatozoïdes résistants (+) / résistants (-) par région pour les deux côtés du tractus. Ces résultats sont illustrés dans la [figure 43](#).

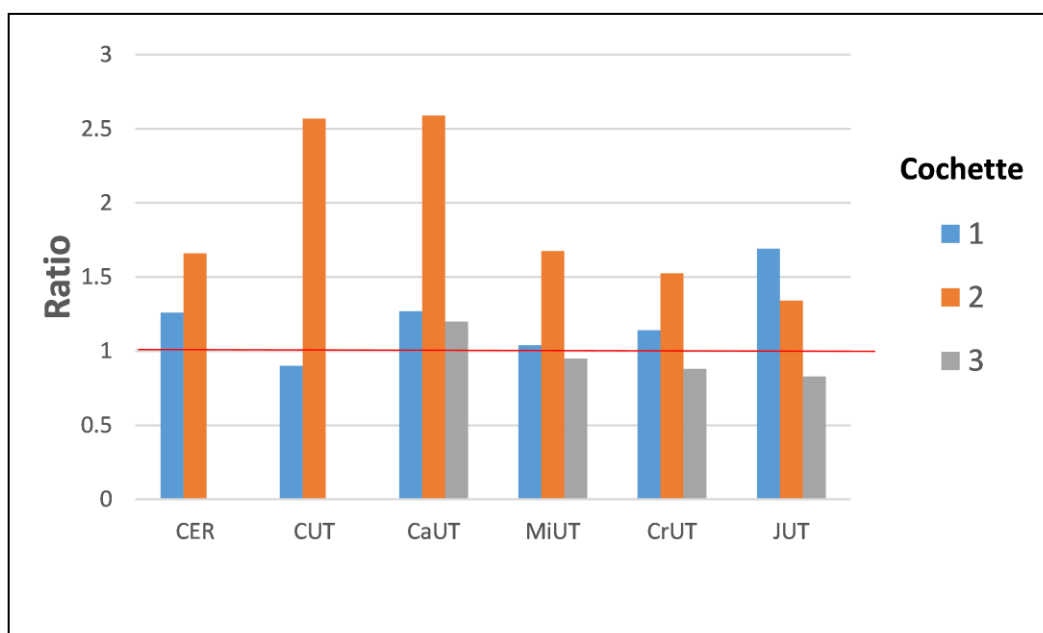


Figure 43 Quantification après IA hétérospermiq ue des spermatozoïdes résistants (-) et (+)

Le ratio spermatozoïdes résistants (+) / résistants (-) pour les 3 IA avec le mélange 50% spermatozoïdes verrat résistants (-) marqué au CFSE / 50 % spermatozoïdes verrat résistants (+) marqué au R18 est présenté pour chaque région du tractus individuellement pour chacune des 3 cochettes. Les histogrammes dépassant la barre de seuil au ratio de 1 indiquent les régions et cochettes pour lesquelles il y a plus de spermatozoïdes résistants (+) que de (-). Pour les régions CaUT, MiUT, CRUT, et JUT, la moyenne du côté gauche et droit a été effectuée. CER = cervix, CUT = corps utérin, CaUT = corne utérine caudale, MiUT = corne utérine milieu, CrUT = corne utérine crâniale, JUT = jonction utéro-tubaire.

Sur les trois cochettes inséminées, il a été observé un nombre plus important de spermatozoïdes résistants (+) pour deux cochettes. Pour la cochette n°1, les spermatozoïdes résistants (+) ont été plus important au niveau de la JUT avec une proportion > 1,5. Pour la cochette n°2, les spermatozoïdes résistants (+) ont été plus important dans les régions allant du cervix jusqu'à la jonction utéro-tubaire. Pour la cochette n°3, il est observé une légère diminution du nombre de spermatozoïdes résistants (+) dans les cornes utérines et la jonction utéro-tubaire.

Les comptages du ratio de spermatozoïdes résistants (+) / résistants (-) avant insémination étaient très proches de 1, confirmant que l'insémination avait bien été réalisée avec des proportions équivalentes des spermatozoïdes résistants (-) et résistants (+) (données non montrées).

Ces données sont préliminaires et d'autres inséminations sont prévues pour les compléter.

V. Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la migration spermatique dans les différentes régions du tractus femelle chez la cochette afin d'évaluer la relation entre la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique et leur transit. Afin de suivre les spermatozoïdes, nous avons dû développer des outils technologiques (marquage fluorescent) et tester 3 systèmes d'imagerie.

A l'issue de la première tâche du projet, une méthode de quantification semi-automatisée des spermatozoïdes par imagerie de fluorescence avec l'outil scanner de lames et le logiciel QuPath a été développée. Cette méthode a servi à quantifier la migration spermatique dans le tractus femelle (second objectif). Elle a aussi été employée pour valider un marquage différentiel, qui a ensuite été mis en œuvre pour comparer la migration des spermatozoïdes faiblement ou fortement résistants au stress hypo-osmotique (troisième objectif).

La méthode de quantification qui a été développée est spécifique des spermatozoïdes (segmentation des images sur leur forme) et elle a permis de distinguer les spermatozoïdes entiers des spermatozoïdes en cours de phagocytose, des cellules rondes et des débris cellulaires fluorescents. Elle a aussi été semi-automatisée par l'acquisition de lames entières avec le scanner et le lancement automatique du script d'analyse en batch sur les images avec QuPath. Cependant, un tri visuel et manuel s'est imposé quand les images étaient trop imprécises ou floues. Le développement d'outils d'analyse d'image reconnaissant directement la forme du spermatozoïde grâce à des algorithmes de segmentation cellulaire et des réseaux de neurones est en cours d'essai en collaboration avec la Plateforme d'Imagerie Cellulaire de l'unité.

Le marquage différentiel a été validé grâce aux résultats de l'évaluation montrant le faible biais (< à 7%). Cependant, l'augmentation du biais pour les images ayant un nombre limité de spermatozoïdes comptés par image a constitué la limite de la méthode, en particulier pour les nombres de spermatozoïdes dans l'oviducte qui sont souvent faibles (10-500 spermatozoïdes / image). La mise en œuvre de ce marquage différentiel était très importante, car il permettait de réaliser des IA hétérospermiques et donc de comparer directement la capacité du tractus femelle à sélectionner les spermatozoïdes sur des critères de qualité spermatique telle que la résistance osmotique.

Deux fluorochromes, le CFSE et le R18, ont été validés pour mettre en œuvre le marquage différentiel avec la méthode du scanner de lames. Malheureusement, ces deux fluorochromes ne pouvaient pas être distingués avec le Cellvizio. La recherche d'un fluorochrome émettant dans l'infrarouge va donc être poursuivie, car le Cellvizio était la seule méthode *in vivo* qui permettait de dénombrer et de visualiser les spermatozoïdes en microscopie chez les mammifères d'élevage. Dans un premier temps, le Membright 700 et le Nile red vont être évalués pour réaliser un marquage différentiel par Cellvizio en association avec le R18.

Les essais avec l'Ivis Spectrum, prometteurs suite à la détection des spermatozoïdes injectés *ex vivo*, s'étaient révélés décevants pour détecter les spermatozoïdes après IA avec le R18. Un biais possible dans la comparaison de l'expérience avec les spermatozoïdes injectés et les spermatozoïdes après IA était que l'épaisseur du tractus pouvait être différente, ce qui aurait pu diminuer la détection du signal R18 si le tractus était plus épais pour l'essai après IA. Un second essai mériterait d'être effectué, car cet outil permettrait d'avoir une quantification globale de la répartition des spermatozoïdes dans les cornes utérines, sans séparation préalable des régions, et pas seulement dans 3 régions de 40 cm comme c'est le cas dans notre protocole avec le scanner de lames. L'Ivis Spectrum pourrait aussi permettre la visualisation des spermatozoïdes à l'entrée de la JUT où l'on suppose qu'ils sont beaucoup plus concentrés que dans la région plus distale.

Le second objectif de ce projet a consisté à réaliser le phénotypage de la migration des spermatozoïdes dans le tractus de cochette grâce à la méthode de quantification développée en amont. Cette migration a été quantifiée 3 h après insémination, à un moment proche de l'ovulation, un temps et un stade du cycle où l'établissement du réservoir spermatique a été décrit dans l'isthme caudal de l'oviducte [275].

Sur les 15 cochettes de l'étude, 60 % des cochettes n'avaient pas ovulé 36 h après le traitement de la buséréline (analogue de la GNRH). Quarante pourcent avaient donc ovulé, mais il était possible que certaines cochettes aient été en fin de phase folliculaire au moment de l'IA (3 h entre l'IA et l'abattage). En effet, la durée d'ovulation moyenne chez la truie est d'environ 1 h 40 en conditions naturelles, néanmoins, elle augmente à 4 h 30 après synchronisation des ovulations à l'hCG (gonadotrophine chorionique humaine) [25].

En regardant l'évolution du nombre de spermatozoïdes à partir de la région caudale de la corne utérine, une augmentation du nombre a été constatée, en moyenne, dans le milieu (facteur x5) et la région crâniale (facteur x8) des cornes utérines. Ce plus faible nombre de spermatozoïdes dans le premier tiers de la corne utérine pourrait être le reflet de l'élimination de spermatozoïdes par écoulement à travers le cervix sur la base de leur faible mobilité. Cette élimination pourrait se propager ensuite dans les régions plus distales des cornes utérines. La mobilité des spermatozoïdes semblait importante pour traverser la JUT mais elle pourrait aussi l'être dans la partie de la corne utérine à proximité de la JUT [91]. Chez la brebis, après insémination intra-utérine sous anesthésie, un gradient de concentration croissant vers la JUT a été observé par Cellvizio 4 h après IA [95].

Ce gradient de concentration était variable entre cochettes entre le côté gauche et le côté droit des cornes utérines. Pour 4 / 15 cochettes, la forte augmentation ou diminution du nombre de spermatozoïdes dans la partie crâniale par rapport à la partie caudale, pour une des deux cornes utérines, n'a pas été retrouvée pour l'autre corne. Ce gradient a même varié en sens inverse dans la corne adjacente pour trois cochettes. Une telle disparité de distribution avait aussi été décrite après « insémination » de composés radioactifs de différentes tailles moléculaires chez la cochette [75]. Il est possible que dans certains cas, les spermatozoïdes soient brassés dans l'utérus. D'après les résultats de Tummaruk *et al* après une insémination utérine profonde dans une corne utérine, des spermatozoïdes ont été comptés dans l'autre corne utérine non inséminée chez 1 / 5 des truies 24 h après IA. Ceci pourrait refléter une forte activité contractile de l'utérus, si les spermatozoïdes étaient passés par le corps utérin pour rejoindre l'autre corne [276].

Dans notre étude, nous n'avons pas mesuré le reflux des spermatozoïdes ni les contractions utérines et il aurait été intéressant de croiser ces mesures avec les données sur la migration des spermatozoïdes. Le système immunitaire n'a pas été évalué, mais il semblait déjà très actif 3 h après IA pour certaines cochettes. Certains rinçages de corne utérine présentaient de fortes quantités de cellules qui décantaient dans l'échantillon sous forme de culot blanc. Ce culot correspondait à des cellules ovoïdes au microscope, qui ressemblait à celles qui contenaient des spermatozoïdes en cours de phagocytose. Il a été remarqué que pour un même volume, plus ce culot était gros et plus la densité de ces cellules était importante au microscope. De plus, les nombreux débris parfois présents sur les images des rinçages de cornes utérines obtenues au scanner de lames correspondaient sûrement à des spermatozoïdes en cours de phagocytose. Bien que ces débris n'aient pas été observés avec un grossissement suffisant et en lumière blanche avec le scanner de lames, les images confocales ont permis d'observer que les cellules utérines qui ne contenaient pas de spermatozoïdes étaient non fluorescentes (pas d'autofluorescence).

Les résultats de quantification ont montré une sélection importante des spermatozoïdes au cours de leur migration avec une réduction importante de leur nombre dans l'oviducte en comparaison à la JUT et aux cornes utérines, confirmant que le passage de la jonction utéro-tubaire sélectionne drastiquement les spermatozoïdes [63].

Dans notre étude, la variabilité entre femelles était importante, comme dans les autres études chez les mammifères d'élevage [71, 91]. Pour deux cochettes sur quinze, aucun spermatozoïde n'a été compté dans les oviductes et il a été remarqué que très peu de spermatozoïdes ont été comptés au niveau de la JUT, sauf pour le côté droit d'une des 2 cochettes. Ce défaut de transport des spz à la JUT pourrait expliquer ce résultat.

Ces études peuvent être difficiles à comparer car elles varient au niveau des conditions expérimentales (races des animaux, protocoles et délai de l'IA / prélèvement, méthode de comptage). De plus, le nombre de spermatozoïdes inséminés était beaucoup plus important dans les années 60 que dans les années 80 (20-40 milliards vs 3 milliards). Dans une étude comparable à la nôtre sur le plan expérimental [64] mais avec seulement 5 cochettes, les quantifications étaient relativement proches des nôtres (différence d'un facteur 2) en comparant les valeurs moyennes. Un nombre plus élevé de spermatozoïdes était retrouvé dans les oviductes, notamment au niveau de l'isthme caudal (2000 vs 200). Cependant, l'étude n'indique pas si des cochettes ont été écartées en raison de l'absence de spermatozoïdes dans les oviductes. Dans une autre étude menée sur 26 truies, environ ¼ des truies n'avaient pas de spermatozoïdes dans les oviductes [91].

La quantité de spermatozoïdes a été comparée pour une même longueur (1 cm) de corne utérine, de JUT et d'oviducte. Cependant, les lumières des régions ne sont pas équivalentes et la concentration des spermatozoïdes n'a donc pas été estimée. Des analyses du tractus à l'IRM pourraient permettre de calculer le volume de ces régions. En extrapolant ces volumes et en considérant que le volume de la JUT est plus petit que la corne utérine d'un facteur 10 maximum (pour une même longueur), il ne semblait pas y avoir une plus forte concentration en spermatozoïdes dans la JUT par rapport à l'utérus 3 h après IA. Une étude avait décrit une diminution des spermatozoïdes dans l'utérus de 2 à 12 h alors que ce nombre dans la JUT restait constant [83]. Il est possible que la différence corne utérine / JUT soit plus prononcée 12 h après IA.

Ce phénotypage a été réalisé en mesurant la distribution des spermatozoïdes dans 7 régions du tractus. Une très forte diminution des spermatozoïdes a été constatée entre la JUT et l'oviducte, mais sur les 2 cm de prélèvement de la JUT, nous n'avons pas pu savoir si les spermatozoïdes étaient bloqués à un endroit particulier au sein de la JUT. En complément de ces comptages, des méthodes d'imagerie SBF (Serial block-face, Kratoscope, Kaer Labs) avec coupes histologiques permettraient de préciser la quantification et la régionalisation des spermatozoïdes dans la JUT. En effet l'imagerie SBF permettrait de faire une reconstruction en 3D de la JUT en empilant des images d'autofluorescence du tissu acquis par une caméra couplée à un microtome. L'originalité du SBF est de photographier le bloc de tissu entre chaque coupe à l'opposé des méthodes traditionnelles qui empilent les images des coupes, potentiellement déformées par leur manipulation. En ajoutant un second système de détection de la fluorescence des spermatozoïdes au SBF, les spermatozoïdes pourraient être visualisés dans la JUT reconstruite en 3D.

Certaines études avaient relaté une corrélation entre le nombre de spermatozoïdes retrouvés dans les régions du tractus de truie. Viring *et al* ont observé qu'un nombre plus faible de spermatozoïdes dans la JUT entraîne automatiquement un nombre plus faible de spermatozoïdes dans l'oviducte, qu'ils soient vivants ou morts [82]. Langendijk *et al* ont constaté une relation linéaire entre le nombre de spermatozoïdes dans la partie caudale de la corne utérine et les nombres de spermatozoïdes dans la JUT et l'isthme 12 h après IA [91]. Chez la vache, une corrélation positive entre les nombres de

spermatozoïdes dans l'utérus et dans l'oviducte 8 h après IA a aussi été décrite [85]. Sur les données obtenues dans ce projet avec les 13 cochettes, aucune corrélation entre régions n'a pu être établie, comme selon les données de la publication de Tummaruk *et al* [277].

Le dénombrement des spermatozoïdes dans l'oviducte montre que presque 50 % des oviductes évalués possédaient un plus grand nombre de spermatozoïdes dans la partie caudale de l'isthme par rapport deux régions suivantes. Cette région est effectivement la première région rencontrée après la JUT et son rôle de réservoir spermatique a été décrit comme limitant la progression des spermatozoïdes vers l'ampoule [123].

Dans l'oviducte, la redistribution des spermatozoïdes vers des régions plus distales a été décrite chez plusieurs espèces autour de l'ovulation [123]. La progestérone notamment, qui augmente après l'ovulation va faciliter le relargage des spermatozoïdes de l'épithélium de l'oviducte. En effet chez la truie, l'augmentation de la polyspermie *in vivo* après injection de progestérone est le reflet de ce relargage [148, 149]. De plus, chez la caille japonaise, l'injection de progestérone induit le relargage des spermatozoïdes du réservoir des spermatozoïdes (« sperm storage tubule ») [278]. Dans l'espèce porcine, cet effet sur la polyspermie sous-entend que les spermatozoïdes se sont détachés des cellules. Ce relargage est probablement le résultat de l'effet direct de la progestérone sur les spermatozoïdes. En effet, il a été montré chez plusieurs espèces que la progestérone induit un influx calcique intracellulaire dans le spermatozoïde qui aboutit à un mouvement hyperactif, mouvement qui peut participer à son détachement, et à la capacitation des spermatozoïdes, qui elle aussi, pourrait induire leur perte de liaison aux cellules [104, 142]. L'ajout de progestérone induit chez le porc le relargage *in vitro* d'une partie des spermatozoïdes fixés sur des agrégats cellulaires d'oviductes (mécanisme qui requiert le canal calcique CatSper) [151], et chez le bovin sur des explants d'oviducte et des cultures de cellules d'oviducte en monocouche [279].

Les résultats de comptage ont montré qu'une proportion plus importante de spermatozoïdes dans la région caudale, décrite comme le réservoir spermatique. Cependant, cette proportion diminue entre le stade pré-ovulatoire et post-ovulatoire, pour aboutir à une proportion équilibrée entre l'isthme caudal et l'ampoule. Ceci suggère une redistribution des spermatozoïdes vers l'ampoule après l'ovulation.

Lors de l'évaluation des ovaires, un nombre différent de follicules au stade pré-ovulatoire a parfois été relevé entre l'ovaire gauche et droit des cochettes (jusqu'à 8 follicules maximum de différence). Sous l'effet de concentrations hormonales locales différentes, comme la 17β œstradiol, des différences de contractions utérines pourraient aussi exister entre les deux côtés [280, 281]. Cependant, elles sont peut-être moindres que celles existant entre le côté ipsilatéral (côté de l'ovulation) et controlatéral des espèces mono-ovulantes [146, 282].

Le troisième objectif de ce projet visait à établir s'il y avait un lien entre la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique et leur migration dans le tractus femelle. Cette résistance a été évaluée *in vitro* dans une solution d'osmolarité non physiologique et elle semble être liée à des caractéristiques mécaniques de la membrane des spermatozoïdes. En particulier, elle est corrélée négativement à la quantité de protéines séminales fixées sur les spermatozoïdes (Tsikis *et al*, article en préparation) et la sélection des spermatozoïdes sur ce critère, s'il y en a une dans le tractus femelle, mériterait d'être éclaircie.

Pour étudier l'impact de la résistance des spermatozoïdes au stress hypo-osmotique sur leur migration dans le tractus femelle, deux groupes de verrats dont les éjaculats présentaient des profils extrêmes en réponse au stress hypo-osmotique ont été constitués : un premier groupe de verrot dont les spermatozoïdes sont faiblement résistants (résistants (-)) et le second avec des spermatozoïdes fortement résistants (résistants (+)). Parmi les deux lignées génétiques évaluées, la lignée Landrace a

été choisi, car deux groupes de verrats extrêmes étaient mieux discriminés (test statistique de Kruskal-Wallis) que la race Large White. Ensuite, des marquages différentiels avec des inséminations hétérospermiques de spermatozoïdes résistants (-) / résistants (+) ont été réalisées puis la migration spermatique a été évaluée. Par rapport à des inséminations homospermiques, ces inséminations en mélange permettent de s'affranchir de la variabilité entre cochettes et de l'éventuel biais lors de la réalisation des inséminations, et d'avoir une évaluation de la migration spermatique entre nos deux conditions avec un nombre restreint de cochettes. Les études ayant comparé la fertilité des mâles avec des spermatozoïdes inséminés en dose homospermique et hétérospermique ont révélé qu'il y avait une bonne corrélation entre les résultats [283]. Chez le taureau, l'évaluation de la fertilité avec un index hétérospermique a permis une estimation de la fertilité comparable à celle de l'index homospermique mais avec 170 fois moins d'inséminations [284].

A ce stade des expérimentations, les résultats sont préliminaires et ils vont être complétés. En effet, seulement trois IA hétérospermiques d'un mélange de spermatozoïdes résistants (-) et résistants (+) ont été effectuées. L'analyse de la proportion entre les spermatozoïdes résistants (-) et résistants (+) montre que pour 2 IA sur 3, nous avons observé un nombre plus important de spermatozoïdes résistants (+) dans les cornes utérines et la jonction utéro-tubaire du tractus femelle. Au moins 6 autres répliques (cochette) sont prévues pour compléter ces résultats préliminaires. Plusieurs travaux publiés ont pu décrire qu'il y avait une corrélation positive entre le taux de fécondation et le nombre de spermatozoïdes comptés dans la zone pellucide de l'embryon (4 à 5 jours après l'ovulation) et qui sont appelés « spermatozoïdes accessoires ». Ces spermatozoïdes représentent le nombre de spermatozoïdes vivants qui se trouvaient à la fois dans les oviductes et qui ont interagi avec l'ovocyte [35]. Déterminer le ratio de spermatozoïdes résistants (-) / résistants (+) dans ces embryons grâce au marquage différentiel serait un autre approche intéressante à développer pour évaluer ces deux populations spermatiques dans le tractus femelle.

En conclusion, nous avons établi la distribution, après insémination, des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle chez la truie et les résultats préliminaires suggèrent que la résistance osmotique des spermatozoïdes pourrait être liée à ce transit. Le développement d'autres approches d'imagerie complémentaires à celle présentée dans ce projet, comme des méthodes *in vivo* (Cellvizio) et de reconstitution 3D (SBF), pourrait compléter et affiner ces résultats. Avec la méthode développée dans ce projet, la migration des spermatozoïdes épидидymaires et éjaculés, contrastés au niveau de l'abondance des protéines séminales à leur surface, pourra être comparée. Le rôle de la fibronectine, sa localisation et ses ligands spermatiques devront être recherchés et son effet biologique sur la fluidité membranaire des spermatozoïdes et sur leur migration dans le tractus pourra être mesuré. Ainsi, l'étude du rôle du plasma séminal dans la migration des spermatozoïdes dans le tractus femelle sera poursuivie.

VI. Bibliographie

1. Thibier, M., *Les Biotechnologies de la Reproduction Animale (BRA) : quels impacts ?* Académie d'Agriculture de France, 2019.
2. Hammond, J. and S. Asdell, *The vitality of the spermatozoa in the male and female reproductive tracts*. Journal of Experimental Biology, 1923.
3. Puga Molina, L.C., et al., *Molecular Basis of Human Sperm Capacitation*. Front Cell Dev Biol, 2018. **6**: p. 72.
4. Bidanel, J.-P., et al., *Cinquante années d'amélioration génétique du porc en France : bilan et perspectives*. INRAE Productions Animales, 2020. **33**(1).
5. Fukaya, S., et al., *Characterization of conception rate after embryo transfer in comparison with that after artificial insemination in dairy cattle*. J Dairy Sci, 2024. **107**(11).
6. Waberski, D., et al., *Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges*. Theriogenology, 2019. **137**: p. 2-7.
7. Gadea, J., *Semen extenders used in the artificial insemination of swine*. Spanish Journal of Agricultural Research, 2003. **1**: p. 17-27.
8. Jakel, H., et al., *In vitro performance and in vivo fertility of antibiotic-free preserved boar semen stored at 5 degrees C*. J Anim Sci Biotechnol, 2021. **12**(1): p. 9.
9. Waberski, D., et al., *Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 14748.
10. Van Tran, L., et al., *Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction - A Review*. Asian-Australas J Anim Sci, 2017. **30**(5): p. 622-637.
11. Parks, J.E. and D.V. Lynch, *Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes*. Cryobiology, 1992. **29**(2): p. 255-66.
12. Labbé, C., et al., *Cholesterol/phospholipid ratio in sperm of several domestic species does not directly predict sperm fitness for cryopreservation*. Genet Sel Evol, 2001. **33**(Suppl 1): p. S61-74.
13. Johnson, L.A., et al., *Storage of boar semen*. Animal Reproduction Science, 2000. **62**(1-3): p. 143-72.
14. Ferchaud, S., et al., *Quels paramètres liés à l'insémination peuvent expliquer les variations des performances de reproduction en élevage ? Focus sur le verrat et la semence*. Journées Recherche Porcine, 2013. **45**: p. 83-84.
15. Feller, D., et al., *Le verrat, la truie : aspects techniques de la reproduction*. Filière porcine Wallonne, 2004.
16. Flowers, W.L., *Management of boars for efficient semen production*. J Reprod Fertil Suppl, 1997. **52**: p. 67-78.
17. Broekhuijse, M.L., et al., *Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility*. J Anim Sci, 2012. **90**(3): p. 779-89.
18. Soede, N.M., P. Langendijk, and B. Kemp, *Reproductive cycles in pigs*. Anim Reprod Sci, 2011. **124**(3-4): p. 251-8.
19. Ka, H., et al., *Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin-1 β at the time of implantation in pigs*. J Anim Sci Biotechnol, 2018. **9**: p. 44.
20. Driancourt, M.A., S. Fréret, and M. Saint-Dizier, *La reproduction animale et humaine*. Chapitre 12. Les cycles oestrien. Synthèses. Editions QUAE, 2014.
21. Quick, B.L., *Timing of ovulation in gilts treated with different regimens of ovugel[®] and matrix[®]*. Thèse_University of Missouri-Columbia, 2015.
22. Universités de Fribourg, L.e.B., *embryology.ch* Campus Virtuel Suisse
23. Soede, N.M. and B. Kemp, *Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs*. J Reprod Fertil Suppl, 1997. **52**: p. 91-103.
24. Almeida, F.R., S. Novak, and G.R. Foxcroft, *The time of ovulation in relation to estrus duration in gilts*. Theriogenology, 2000. **53**(7): p. 1389-96.

25. Soede, N.M., J.P. Noordhuizen, and B. Kemp, *The duration of ovulation in pigs, studied by transrectal ultrasonography, is not related to early embryonic diversity*. Theriogenology, 1992. **38**(4): p. 653-66.
26. Hunter, R.H., *The effects of delayed insemination on fertilization and early cleavage in the pig*. J Reprod Fertil, 1967. **13**(1): p. 133-47.
27. Kemp, B. and N.M. Soede, *Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs*. J Reprod Fertil Suppl, 1997. **52**: p. 79-89.
28. Casanovas, C., *Règles d'insémination (I)*. 2016.
29. Casanovas, C. *Représentation graphique du réflexe d'immobilité, de l'ovulation et du moment optimal de l'IA chez une truie avec un œstrus de 60h*. 2021.
30. Flowers, W.L. and K.L. Esbenschade, *Optimizing management of natural and artificial matings in swine*. J Reprod Fertil Suppl, 1993. **48**: p. 217-28.
31. Baker, R.D., P.J. Dziuk, and H.W. Norton, *Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts*. J Anim Sci, 1968. **27**(1): p. 88-93.
32. Flowers, W.L., *Increasing fertilization rate of boars: Influence of number and quality of spermatozoa inseminated* Journal of Animal Science, 2002. **80**(E-suppl_1): p. E47-E53.
33. Saacke, R.G., et al., *Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality*. Anim Reprod Sci, 2000. **60-61**: p. 663-77.
34. D'Amour, O., *Identification et caractérisation de marqueurs protéiques de la fertilité mâle*. 2013.
35. Ardon, F., et al., *Assessing in vivo fertilizing capacity of liquid-preserved boar semen according to the 'Hanover gilt model'*. Reprod Domest Anim, 2003. **38**(2): p. 161-5.
36. Foxcroft, J.R., et al., *Application of advanced AI technologies to improve the competitiveness of the pork industry*. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada, 2010.
37. Gil Villa, A.M., W.D. Cardona-Maya, and A.P. Cadavid Jaramillo, *[Early embryo death: does the male factor play a role?]*. Arch Esp Urol, 2007. **60**(9): p. 1 057-68.
38. Roca, J., et al., *Will AI in pigs become more efficient?* Theriogenology, 2016. **86**(1): p. 187-93.
39. Broekhuijse, M.L., et al., *The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility*. Theriogenology, 2012. **77**(7): p. 1466-1479 e3.
40. Petrunkina, A.M., et al., *Determinants of sperm quality and fertility in domestic species*. Reproduction (Cambridge, England), 2007. **134**(1): p. 3-17.
41. Amann, R.P. and D. Waberski, *Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments*. Theriogenology, 2014. **81**(1): p. 5-17 e1-3.
42. Braundmeier, A.G. and D.J. Miller, *The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility*. J Dairy Sci, 2001. **84**(9): p. 1915-25.
43. Schulze, M., et al., *Development of an in vitro index to characterize fertilizing capacity of boar ejaculates*. Anim Reprod Sci, 2013. **140**(1-2): p. 70-6.
44. Schulze, M., et al., *Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa*. Theriogenology, 2019. **127**: p. 15-20.
45. Ferreira, C.E., et al., *Contribution of boars to reproductive performance and paternity after homospermic and heterospermic artificial insemination*. Reprod Fertil Dev, 2015. **27**(7): p. 1012-9.
46. Mellagi, A.P.G., et al., *Update on artificial insemination: Semen, techniques, and sow fertility*. Mol Reprod Dev, 2022. **90**(7): p. 601-611.
47. Martinez, E.A., et al., *Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs*. Reproduction 2001. **58**: p. 301-311.
48. Garcia-Vazquez, F.A., et al., *Morphological changes in the porcine cervix: A comparison between nulliparous and multiparous sows with regard to post-cervical artificial insemination*. Theriogenology, 2019. **127**: p. 120-129.
49. Martinez, E.A., et al., *Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows*. Reproduction, 2002. **123**(1): p. 163-70.

50. Lorenzen, E., et al., *A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection*. Vet Res, 2015. **46**: p. 116.
51. Hireche, S., *Anatomie et fonctions de l'appareil génital femelle*. université des frères mentouri constantine
52. Rickard, J.P. and S.P. de Graaf, *Sperm surface changes and their consequences for sperm transit through the female reproductive tract*. Theriogenology, 2020. **150**: p. 96-105.
53. Scott, M.A., et al., *The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the uterotubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa in situ using scanning electron microscopy*. J Reprod Fertil Suppl, 2000(56): p. 415-21.
54. Rickard, J.P., et al., *The fate of spermatozoa in the female reproductive tract: A comparative review*. Theriogenology, 2019. **137**: p. 104-112.
55. Suarez, S.S. and A.A. Pacey, *Sperm transport in the female reproductive tract*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(1): p. 23-37.
56. England, G.C.W., et al., *Normal and abnormal response to sperm deposition in female dogs: A review and new hypotheses for endometritis*. Theriogenology, 2021. **159**: p. 176-183.
57. Yanagimachi, R., *Mysteries and unsolved problems of mammalian fertilization and related topics*. Biol Reprod, 2022. **106**(4): p. 644-675.
58. Fair, S., et al., *The biological mechanisms regulating sperm selection by the ovine cervix*. Reproduction, 2019. **158**(1): p. R1-R13.
59. Rath, D., C. Knorr, and U. Taylor, *Communication requested: Boar semen transport through the uterus and possible consequences for insemination*. Theriogenology, 2016. **85**(1): p. 94-104.
60. Martyn, F., F.M. McAuliffe, and M. Wingfield, *The role of the cervix in fertility: is it time for a reappraisal?* Hum Reprod, 2014. **29**(10): p. 2092-8.
61. Miller, D.J., *Review: The epic journey of sperm through the female reproductive tract*. Animal, 2018. **12**(s1): p. s110-s120.
62. Langendijk, P., N.M. Soede, and B. Kemp, *Uterine activity, sperm transport, and the role of boar stimuli around insemination in sows*. Theriogenology, 2005. **63**(2): p. 500-13.
63. Gadella, B.M., *Reproductive tract modifications of the boar sperm surface*. Mol Reprod Dev, 2017. **84**(9): p. 822-831.
64. Kunavongkrit, A., et al., *A study on the number of recovered spermatozoa in the uterine horns and oviducts of gilts, after fractionated or non-fractionated insemination*. J Vet Med Sci, 2003. **65**(1): p. 63-7.
65. Hunter, R.H. and P.C. Leglise, *Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the role of the isthmus*. J Reprod Fertil, 1971. **24**(2): p. 233-46.
66. Hunter, R.H. and P.C. Léglise, *Tubal surgery in the rabbit: fertilization and polyspermy after resection of the isthmus*. Am J Anat, 1971. **132**(1): p. 45-52.
67. Holt, W.V. and A. Fazeli, *Do sperm possess a molecular passport? Mechanistic insights into sperm selection in the female reproductive tract*. Mol Hum Reprod, 2015. **21**(6): p. 491-501.
68. Hunter, R.H., *Components of oviduct physiology in eutherian mammals*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2012. **87**(1): p. 244-55.
69. Dautier, L. *Physiologie du déplacement des spermatozoides dans les voies génitales femelles chez la brebis et la vache (suite)*. in *Annales de zootechnie*. 1959.
70. First, N.L., et al., *Transport of Boar Spermatozoa in Estrual and Luteal Sows*. Journal of Animal Science, 1968. **27**(4): p. 1032-1036.
71. Hawk, H.W., *Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle*. J Dairy Sci, 1987. **70**(7): p. 1487-503.
72. Wheaton, L.G., et al., *Uterine motility during the estrous cycle: studies in healthy bitches*. Am J Vet Res, 1988. **49**(1): p. 82-6.

73. R. Claus, H.-D.M., T. Giménez, C. Hoang-Vu, E. Münster,, *Effect of seminal oestrogens of the boar on prostaglandin F2 α release from the uterus of the sow*. *Animal Reproduction Science*, 1990. **23**(Issue 2): p. Pages 145-156.
74. Kunz, G., et al., *The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy*. *Hum Reprod*, 1996. **11**(3): p. 627-32.
75. Einarsson, S., et al., *Distribution of small- and medium-sized molecules within the genital tract of artificially inseminated gilts*. *J Reprod Fertil*, 1980. **59**(2): p. 453-7.
76. Hunter, R.H., R. Nichol, and S.M. Crabtree, *Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct*. *Reprod Nutr Dev* (1980), 1980. **20**(6): p. 1869-75.
77. Overstreet, J.W. and R.A. Tom, *Experimental studies of rapid sperm transport in rabbits*. *J Reprod Fertil*, 1982. **66**(2): p. 601-6.
78. Hunter, R.H., *Experimental studies of sperm transport in sheep, cows and pigs*. *Vet Rec*, 1985. **116**(7): p. 188.
79. Domino, M., et al., *Uterine EMG activity in the non-pregnant sow during estrous cycle*. *BMC Vet Res*, 2018. **14**(1): p. 176.
80. Vazquez, J.M., et al., *Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination*. *Theriogenology*, 2005. **63**(2): p. 536-47.
81. First, N.L., et al., *Transport and loss of boar spermatozoa in the reproductive tract of the sow*. *Journal of Animal Science*, 1968. **27**(4): p. 1037-1040.
82. Viring, S., *Distribution of live and dead spermatozoa in the genital tract of gilts at different times after insemination*. *Acta Vet Scand*, 1980. **21**(4): p. 587-97.
83. Viring, S. and S. Einarsson, *Sperm distribution within the genital tract of naturally inseminated gilts*. *Nord Vet Med*, 1981. **33**(3): p. 145-9.
84. Akthar, I., et al., *Sperm interaction with the uterine innate immune system: toll-like receptor 2 (TLR2) is a main sensor in cattle*. *Reprod Fertil Dev*, 2021. **34**(2): p. 139-148.
85. Mitchell, J.R., P.L. Senger, and J.L. Rosenberger, *Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract*. *J Anim Sci*, 1985. **61**(4): p. 956-67.
86. Marey, M.A., et al., *Sensing sperm via maternal immune system: a potential mechanism for controlling microenvironment for fertility in the cow*. *J Anim Sci*, 2020. **98**(Suppl 1): p. S88-s95.
87. Bergmann, A.E., *Sperm binding properties to uterine epithelial cells in vitro employing a primary porcine endometrium culture system* 2015, University of Göttingen.
88. Hernandez-Caravaca, I., et al., *Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows*. *Anim Reprod Sci*, 2012. **136**(1-2): p. 14-22.
89. Mezalira, A., et al., *Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows*. *Reprod Domest Anim*, 2005. **40**(1): p. 1-5.
90. Steverink, D.W., et al., *Semen backflow after insemination and its effect on fertilisation results in sows*. *Anim Reprod Sci*, 1998. **54**(2): p. 109-19.
91. Langendijk, P., et al., *Role of myometrial activity in sperm transport through the genital tract and in fertilization in sows*. *Reproduction*, 2002. **123**(5): p. 683-90.
92. Hernandez-Caravaca, I., et al., *Boar sperm with defective motility are discriminated in the backflow moments after insemination*. *Theriogenology*, 2015. **83**(4): p. 655-61.
93. Baker, R.D. and A.A. Degen, *Transport of live and dead boar spermatozoa within the reproductive tract of gilts*. *J Reprod Fertil*, 1972. **28**(3): p. 369-77.
94. García-Vázquez, F.A., et al., *Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract*. *J Reprod Dev*, 2015. **61**(5): p. 407-13.
95. Druart, X., et al., *In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract*. *Reproduction* (Cambridge, England), 2009. **138**(1): p. 45-53.

96. Taylor, U., et al., *Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage*. *Reprod Domest Anim*, 2008. **43**(2): p. 166-75.
97. Li, J.C., S. Yamaguchi, and H. Funahashi, *Boar seminal plasma or hen's egg yolk decrease the in-vitro chemotactic and phagocytotic activities of neutrophils when co-incubated with boar or bull sperm*. *Theriogenology*, 2012. **77**(1): p. 73-80.
98. Zambrano, F., et al., *Swine spermatozoa trigger aggregated neutrophil extracellular traps leading to adverse effects on sperm function*. *J Reprod Immunol*, 2021. **146**: p. 103339.
99. Woelders, H. and A. Matthijs, *Phagocytosis of boar spermatozoa in vitro and in vivo*. *Reprod Suppl*, 2001. **58**: p. 113-27.
100. Rath, D., et al., *Sperm interactions from insemination to fertilization*. *Reprod Domest Anim*, 2008. **43 Suppl 5**: p. 2-11.
101. Miller, D.J., *Sperm in the Mammalian Female Reproductive Tract: Surfing Through the Tract to Try to Beat the Odds*. *Annu Rev Anim Biosci*, 2024. **12**: p. 301-319.
102. Koyama, H., D. Shi, and T. Fujimori, *Biophysics in oviduct: Planar cell polarity, cilia, epithelial fold and tube morphogenesis, egg dynamics*. *Biophys Physicobiol*, 2019. **16**: p. 89-107.
103. Thibault, C. and M.-C. Levasseur. *Conservation et survie prolongée des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles des vertébrés*. in *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 1973. EDP Sciences.
104. Saint-Dizier, M., et al., *Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals*. *Mol Cell Endocrinol*, 2020. **516**: p. 110956.
105. Rodriguez-Martinez, H., et al., *Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs*. *Anat Histol Embryol*, 1990. **19**(1): p. 16-36.
106. Elweza, A.E., et al., *A proinflammatory response of bovine endometrial epithelial cells to active sperm in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 2018. **85**(3): p. 215-226.
107. Teclé, E., et al., *The female reproductive tract contains multiple innate sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) that facilitate sperm survival*. *J Biol Chem*, 2019. **294**(31): p. 11910-11919.
108. Luongo, C., et al., *Seminal plasma mitigates the adverse effect of uterine fluid on boar spermatozoa*. *Theriogenology*, 2019. **136**: p. 28-35.
109. Chirinos, M., et al., *Uterine flushings from women treated with levonorgestrel affect sperm functionality in vitro*. *Reproduction*, 2017. **154**(5): p. 607-614.
110. Griffiths, G.S., et al., *Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency*. *Reproduction*, 2008. **135**(3): p. 293-301.
111. Lee, R.K., et al., *Expression of cystatin C in the female reproductive tract and its effect on human sperm capacitation*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018. **16**(1): p. 8.
112. Shalgi, R., T.T. Smith, and R. Yanagimachi, *A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction*. *Biol Reprod*, 1992. **46**(3): p. 419-24.
113. Gaddum-Rosse, P., *Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat*. *Am J Anat*, 1981. **160**(3): p. 333-41.
114. Muro, Y., et al., *Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization*. *Biol Reprod*, 2016. **94**(4): p. 80.
115. Qu, Y., et al., *Cooperation-based sperm clusters mediate sperm oviduct entry and fertilization*. *Protein Cell*, 2021. **12**(10): p. 810-817.
116. Tienthai, P., *The porcine sperm reservoir in relation to the function of hyaluronan*. *J Reprod Dev*, 2015. **61**(4): p. 245-50.
117. Hunter, R.H., *Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs*. *Reprod Domest Anim*, 2002. **37**(4): p. 186-90.
118. Rodriguez-Martinez, H., S. Einarsson, and B. Larsson, *Spontaneous motility of the oviduct in the anaesthetized pig*. *J Reprod Fertil*, 1982. **66**(2): p. 615-24.

119. Papaioannou, S., *A hypothesis for the pathogenesis and natural history of proximal tubal blockage*. Hum Reprod, 2004. **19**(3): p. 481-5.
120. Li, S. and W. Winuthayanon, *Oviduct: roles in fertilization and early embryo development*. J Endocrinol, 2017. **232**(1): p. R1-r26.
121. Leahy, T. and B.M. Gadella, *Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage*. Reproduction, 2011. **142**(6): p. 759-78.
122. Visconti, P.E., et al., *Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation*. J Biol Chem, 1999. **274**(5): p. 3235-42.
123. Mahe, C., et al., *Sperm migration, selection, survival, and fertilizing ability in the mammalian oviduct*. Biol Reprod, 2021. **105**(2): p. 317-331.
124. Ickowicz, D., M. Finkelstein, and H. Breitbart, *Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases*. Asian J Androl, 2012. **14**(6): p. 816-21.
125. Anifandis, G., et al., *Molecular and cellular mechanisms of sperm-oocyte interactions opinions relative to in vitro fertilization (IVF)*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(7): p. 12972-97.
126. Bernecic, N.C., et al., *Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa*. Theriogenology, 2019. **137**: p. 56-66.
127. Jin, S.K. and W.X. Yang, *Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated?* Oncotarget, 2017. **8**(2): p. 3600-3627.
128. Zigo, M., et al., *Porcine model for the study of sperm capacitation, fertilization and male fertility*. Cell Tissue Res, 2020. **380**(2): p. 237-262.
129. Piehler, E., et al., *Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation*. Cytometry A, 2006. **69**(10): p. 1062-70.
130. Plante, G. and P. Manjunath. *Binder of sperm (BSP) proteins in the male reproductive tract of farm animals*. in *9th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology*. 2014.
131. Rodriguez-Martinez, H., et al., *Seminal plasma proteins: what role do they play?* Am J Reprod Immunol, 2011. **66 Suppl 1**: p. 11-22.
132. Gwathmey, T.M., et al., *Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct*. Biology of Reproduction, 2006. **75**(4): p. 501-7.
133. Manásková, P., et al., *Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies*. J Reprod Immunol, 2007. **74**(1-2): p. 103-13.
134. Ekhlesi-Hundrieser, M., et al., *Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig*. Biol Reprod, 2005. **73**(3): p. 536-45.
135. Aitken, R.J. and B. Nixon, *Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored*. Mol Hum Reprod, 2013. **19**(12): p. 785-93.
136. Nixon, B., et al., *The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors*. Biol Reprod, 2006. **74**(2): p. 275-87.
137. Keller, A. and K. Kerns, *Sperm capacitation as a predictor of boar fertility*. Mol Reprod Dev, 2023. **90**(7): p. 594-600.
138. Petrunkina, A.M., et al., *Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa*. Theriogenology, 2005. **64**(8): p. 1766-1782.
139. Petrunkina, A.M., et al., *Signalling pathways involved in the control of sperm cell volume*. Reproduction, 2007. **133**(1): p. 61-73.
140. Freitas, M.J., S. Vijayaraghavan, and M. Fardilha, *Signaling mechanisms in mammalian sperm motility*. Biol Reprod, 2017. **96**(1): p. 2-12.
141. Suarez, S.S., *Control of hyperactivation in sperm*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(6): p. 647-57.
142. Mirihagalle, S., J.R. Hughes, and D.J. Miller, *Progesterone-Induced Sperm Release from the Oviduct Sperm Reservoir*. Cells, 2022. **11**(10).

143. Teclé, E. and P. Gagneux, *Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx*. *Mol Reprod Dev*, 2015. **82**(9): p. 635-50.
144. Kadirvel, G., et al., *Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir*. *Biol Reprod*, 2012. **87**(6): p. 147.
145. Machado, S.A., et al., *LewisX-containing glycans on the porcine oviductal epithelium contribute to formation of the sperm reservoir*. *Biol Reprod*, 2014. **91**(6): p. 140.
146. Lamy, J., et al., *Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle*. *Theriogenology*, 2016. **86**(6): p. 1409-1420.
147. Hunter, R.H., B. Cook, and N.L. Poyser, *Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1983. **14**(4): p. 225-32.
148. Hunter, R.H., *Local action of progesterone leading to polyspermic fertilization in pigs*. *J Reprod Fertil*, 1972. **31**(3): p. 433-44.
149. Hunter, R.H., H.H. Petersen, and T. Greve, *Ovarian follicular fluid, progesterone and Ca²⁺ ion influences on sperm release from the fallopian tube reservoir*. *Mol Reprod Dev*, 1999. **54**(3): p. 283-91.
150. Tamburrino, L., et al., *Progesterone, spermatozoa and reproduction: An updated review*. *Mol Cell Endocrinol*, 2020. **516**: p. 110952.
151. Machado, S.A., et al., *Release of Porcine Sperm from Oviduct Cells is Stimulated by Progesterone and Requires CatSper*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 19546.
152. Brüssow, K.P., I. Egerszegi, and J. Rátky, *Is the function of the porcine sperm reservoir restricted to the ovulatory period?* *J Reprod Dev*, 2014. **60**(5): p. 395-8.
153. Mburu, J.N., et al., *Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation*. *Anim Reprod Sci*, 1996. **45**(1-2): p. 109-21.
154. Chang, H. and S.S. Suarez, *Unexpected flagellar movement patterns and epithelial binding behavior of mouse sperm in the oviduct*. *Biol Reprod*, 2012. **86**(5): p. 140, 1-8.
155. Ishikawa, Y., et al., *Surfing and Swimming of Ejaculated Sperm in the Mouse Oviduct*. *Biol Reprod*, 2016. **94**(4): p. 89.
156. Hino, T. and R. Yanagimachi, *Active peristaltic movements and fluid production of the mouse oviduct: their roles in fluid and sperm transport and fertilization†*. *Biol Reprod*, 2019. **101**(1): p. 40-49.
157. Guidobaldi, H.A., et al., *Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement*. *Reproduction*, 2012. **143**(5): p. 587-96.
158. Giojalas, L.C. and H.A. Guidobaldi, *Getting to and away from the egg, an interplay between several sperm transport mechanisms and a complex oviduct physiology*. *Mol Cell Endocrinol*, 2020. **518**: p. 110954.
159. Harwalkar, K., et al., *Anatomical and cellular heterogeneity in the mouse oviduct-its potential roles in reproduction and preimplantation development†*. *Biol Reprod*, 2021. **104**(6): p. 1249-1261.
160. Yániz, J.L., et al., *Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa*. *Anat Rec*, 2000. **260**(3): p. 268-78.
161. Xiao, W., et al., *Thermotaxis of mammalian sperm*. *Mol Hum Reprod*, 2022. **28**(8).
162. Eisenbach, M. and L.C. Giojalas, *Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(4): p. 276-85.
163. Giojalas, L., H. Guidobaldi, and R. Sanchez, *Sperm Chemotaxis in Mammals*. 2015. p. 272-307.
164. Gu, N.H., et al., *Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2019. **17**(1): p. 66.
165. Plant, T.M., et al., *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Fourth edition ed. 2015, Amsterdam: Elsevier Academic Press.
166. Ward, W.S., *Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development*. *Mol Hum Reprod*, 2010. **16**(1): p. 30-6.

167. Mortimer, D., *The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function*. Mol Hum Reprod, 2018. **24**(12): p. 567-592.
168. Gadella, B.M. and J.P. Evans, *Membrane fusions during mammalian fertilization*. Adv Exp Med Biol, 2011. **713**: p. 65-80.
169. Jones, R., et al., *The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins*. Biol Reprod, 2008. **79**(3): p. 421-31.
170. Bianchi, E., et al., *Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization*. Nature, 2014. **508**(7497): p. 483-7.
171. Zhang, M., et al., *High Resolution Proteomic Analysis of Subcellular Fractionated Boar Spermatozoa Provides Comprehensive Insights Into Perinuclear Theca-Residing Proteins*. Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 836208.
172. Zhao, W., et al., *Outer dense fibers stabilize the axoneme to maintain sperm motility*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(3): p. 1755-1768.
173. Lindemann, C.B. and K.A. Lesich, *Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum*. Cytoskeleton (Hoboken), 2016. **73**(11): p. 652-669.
174. Visconti, P.E., *Sperm bioenergetics in a nutshell*. Biol Reprod, 2012. **87**(3): p. 72.
175. Jones, R., *Sperm survival versus degradation in the Mammalian epididymis: a hypothesis*. Biol Reprod, 2004. **71**(5): p. 1405-11.
176. Dacheux, J.L. and M. Paquignon, *Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa*. Reprod Nutr Dev (1980), 1980. **20**(4A): p. 1085-99.
177. Franca, L.R., G.F. Avelar, and F.F. Almeida, *Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs*. Theriogenology, 2005. **63**(2): p. 300-18.
178. Dacheux, J.L., et al., *Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation*. Theriogenology, 2005. **63**(2): p. 319-41.
179. Rodriguez-Martinez, H., et al., *Seminal Plasma: Relevant for Fertility?* Int J Mol Sci, 2021. **22**(9).
180. Gorski, K., et al., *Effects of breed and ejaculate volume on sperm morphology and semen parameters of boars*. Anim Sci J, 2021. **92**(1): p. e13629.
181. Guillouet, P., et al., *Analyse de facteurs de variation de la production spermatique de verrats d'insémination artificielle*. Journées Rech. Porcine en France, 1999. **31**(31): p. 45-52.
182. Podico, G., et al., *Semen Quality of the First and Second Ejaculates Collected from Breeding Inactive Stallions after Cooling and Freezing*. Vet Sci, 2023. **10**(3).
183. Murphy, E.M., et al., *Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre*. J Anim Sci, 2018. **96**(6): p. 2408-2418.
184. David, I., et al., *Character process model for semen volume in AI rams: evaluation of correlation structures for long and short-term environmental effects*. Genet Sel Evol, 2007. **39**(1): p. 55-71.
185. Mann, T. and C. Lutwak-Mann, *Secretory function of male accessory organs of reproduction in mammals*. Physiol Rev, 1951. **31**(1): p. 27-55.
186. Luongo, C., et al., *Should All Fractions of the Boar Ejaculate Be Prepared for Insemination Rather Than Using the Sperm Rich Only?* Biology (Basel), 2022. **11**(2).
187. Rodriguez-Martinez, H., et al., *The physiological roles of the boar ejaculate*. Society of Reproduction and Fertility Supplement, 2009. **66**: p. 1-21.
188. Wallgren, M., F. Saravia, and H. Rodriguez-Martinez, *The vanguard sperm cohort of the boar ejaculate is overrepresented in the tubal sperm reservoir in vivo*. J Reprod Dev, 2010. **56**(1): p. 68-72.
189. Alkmin, D.V., et al., *Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate*. Cryobiology, 2014. **69**(2): p. 203-10.
190. Xu, X., et al., *In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction*. Theriogenology, 1996. **45**(4): p. 745-55.

191. Zhu, J., et al., *Effects of semen plasma from different fractions of individual ejaculates on IVF in pigs*. Theriogenology, 2000. **54**(9): p. 1443-52.
192. Luongo, C., et al., *Impact of inclusion of post-spermiatic ejaculate fraction in boar seminal doses on sperm metabolism, quality, and interaction with uterine fluid*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 15258.
193. Druart, X. and S. de Graaf, *Seminal plasma proteomes and sperm fertility*. Anim Reprod Sci, 2018. **194**: p. 33-40.
194. Centurion, F., et al., *Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution*. Biol Reprod, 2003. **69**(2): p. 640-6.
195. Banjoko, S.O. and F.O. Adeseolu, *Seminal Plasma pH, Inorganic Phosphate, Total and Ionized Calcium Concentrations In The Assessment of Human Spermatozoa Function*. J Clin Diagn Res, 2013. **7**(11): p. 2483-6.
196. Rickard, J.P., et al., *Seminal plasma aids the survival and cervical transit of epididymal ram spermatozoa*. Reproduction, 2014. **148**(5): p. 469-78.
197. Overstreet, J.W., et al., *The importance of seminal plasma for sperm penetration of human cervical mucus*. Fertil Steril, 1980. **34**(6): p. 569-72.
198. Caballero, I., et al., *Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies*. Reprod Domest Anim, 2012. **47 Suppl 3**: p. 12-21.
199. Druart, X., et al., *Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility*. Theriogenology, 2019. **137**: p. 30-35.
200. Leahy, T. and S.P. de Graaf, *Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing*. Reprod Domest Anim, 2012. **47 Suppl 4**: p. 207-13.
201. Recuero, S., et al., *Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa*. Theriogenology, 2019. **137**: p. 36-42.
202. Bromfield, J.J., *A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species*. Reproduction, 2016. **152**(6): p. R223-R232.
203. Parrilla, I., et al., *Boar seminal plasma: current insights on its potential role for assisted reproductive technologies in swine*. Anim Reprod, 2020. **17**(3): p. e20200022.
204. Druart, X., et al., *Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma*. J Proteomics, 2013. **91**: p. 13-22.
205. Zigo, M., et al., *Ubiquitin-proteasome system participates in the de-aggregation of spermadhesins and DQH protein during boar sperm capacitation*. Reproduction, 2019. **157**(3): p. 283-295.
206. Perez-Patino, C., et al., *The proteome of pig spermatozoa is remodeled during ejaculation*. Mol Cell Proteomics, 2018.
207. Dostalova, Z., et al., *Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1200**(1): p. 48-54.
208. Kroh, P.D., et al., *Boar spermadhesin AWN: novel insights in its binding behavior and localization on sperm*. Biol Reprod, 2022. **106**(4): p. 775-791.
209. Müller, K., et al., *Porcine spermadhesin AQN-3 binds to negatively charged phospholipids*. Chem Phys Lipids, 2023. **254**: p. 105306.
210. Jonakova, V., et al., *Sperm surface proteins in mammalian fertilization*. Mol Reprod Dev, 2000. **56**(2 Suppl): p. 275-7.
211. Dostalova, Z., J.J. Calvete, and E. Topfer-Petersen, *Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface*. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 1995. **376**(4): p. 237-42.
212. Manásková, P., et al., *Aggregated and monomeric forms of proteins in boar seminal plasma: characterization and binding properties*. Folia Biol (Praha), 2000. **46**(4): p. 143-51.
213. Manásková, P., et al., *Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and chromatographic methods*. Am J Reprod Immunol, 2003. **50**(5): p. 399-410.

214. Topfer-Petersen, E., et al., *Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives*. *Andrologia*, 1998. **30**(4-5): p. 217-24.
215. Jelínková, P., et al., *Mannan-binding proteins from boar seminal plasma*. *J Reprod Immunol*, 2004. **62**(1-2): p. 167-82.
216. Silva, E., et al., *Lactadherin is a candidate oviduct Lewis X trisaccharide receptor on porcine spermatozoa*. *Andrology*, 2017. **5**(3): p. 589-597.
217. Rodriguez-Martinez, H., et al., *Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow*. *Journal of Reproductive Immunology*, 2010. **84**(1): p. 57-65.
218. Vilagran, I., et al., *Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker*. *Andrology*, 2015. **3**(2): p. 345-56.
219. Vilagran, I., et al., *Triosephosphate isomerase (TPI) and epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5) are markers for boar sperm quality*. *Animal Reproduction Science*, 2016. **165**: p. 22-30.
220. Gonzalez-Cadavid, V., et al., *Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters*. *Theriogenology*, 2014. **82**(5): p. 697-707.
221. Rungruangsak, J., et al., *52 Difference of Seminal Plasma Proteins in Good- and Poor-Freezability Boar Ejaculates*. *Reproduction, Fertility and Development*, 2018. **30**(1): p. 165-165.
222. Pilch, B. and M. Mann, *Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma*. *Genome Biol*, 2006. **7**(5): p. R40.
223. Lilja, H., et al., *Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen*. *The Journal of clinical investigation*, 1987. **80**(2): p. 281-5.
224. Katnik-Prastowska, I., M. Przybysz, and A. Chelmonska-Soyta, *Fibronectin fragments in human seminal plasma*. *Acta Biochimica Polonica*, 2005. **52**(2): p. 557-60.
225. Pinke, L.A., et al., *Analysis of fibronectin on human sperm*. *The Journal of urology*, 1997. **158**(3 Pt 1): p. 936-41.
226. Wennemuth, G., et al., *Influence of fibronectin on the motility of human spermatozoa*. *International Journal of Andrology*, 1997. **20**(1): p. 10-6.
227. Kwon, W.S., et al., *Discovery of predictive biomarkers for litter size in boar spermatozoa*. *Mol Cell Proteomics*, 2015. **14**(5): p. 1230-40.
228. Novak, S., et al., *Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars*. *Journal of Andrology*, 2010. **31**(2): p. 188-200.
229. Dyck, M.K., et al., *Biological markers of boar fertility*. *Reprod Domest Anim*, 2011. **46 Suppl 2**: p. 55-8.
230. Plante, G., et al., *Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins*. *Cell and Tissue Research*, 2016. **363**(1): p. 105-27.
231. Bergeron, A. and P. Manjunath, *New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk*. *Mol Reprod Dev*, 2006. **73**(10): p. 1338-44.
232. Plante, G., et al., *Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins*. *Cell and Tissue Research*, 2016. **363**(1): p. 105-27.
233. Pini, T., et al., *Binder of Sperm Proteins 1 and 5 have contrasting effects on the capacitation of ram spermatozoa*. *Biol Reprod*, 2018. **98**(6): p. 765-775.
234. Pini, T., et al., *Binder of Sperm Proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage*. *Cryobiology*, 2018. **82**: p. 78-87.
235. Calvete, J.J., et al., *Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1*. *FEBS Letters*, 1997. **407**(2): p. 201-6.
236. Manaskova, P., et al., *Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies*. *J Reprod Immunol*, 2007. **74**(1-2): p. 103-13.

237. Burkitt, J.M., *Chapter 54 - Sodium Disorders*, in *Small Animal Critical Care Medicine*, D.C. Silverstein and K. Hopper, Editors. 2009, W.B. Saunders: Saint Louis. p. 224-229.
238. Lang, F., et al., *Functional significance of cell volume regulatory mechanisms*. *Physiol Rev*, 1998. **78**(1): p. 247-306.
239. Benko, F., et al., *Signaling Roleplay between Ion Channels during Mammalian Sperm Capacitation*. *Biomedicines*, 2023. **11**(9): p. 2519.
240. Sahin, E., et al., *Control of bull sperm cell volume during epididymal maturation*. *Reprod Fertil Dev*, 2009. **21**(3): p. 469-78.
241. Cooper, T.G., *The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility*. *Asian J Androl*, 2011. **13**(1): p. 130-8.
242. Gilmore, J.A., et al., *Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation*. *J Reprod Fertil*, 1996. **107**(1): p. 87-95.
243. Benson, J.D., et al., *The cryobiology of spermatozoa*. *Theriogenology*, 2012. **78**(8): p. 1682-99.
244. Cooper, T.G. and C.H. Yeung, *Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet*. *Microscopy Research and Technique*, 2003. **61**(1): p. 28-38.
245. Lavanya, M., et al., *Microenvironment of the male and female reproductive tracts regulate sperm fertility: Impact of viscosity, pH, and osmolality*. *Andrology*, 2022. **10**(1): p. 92-104.
246. Yeung, C.H., J.P. Barfield, and T.G. Cooper, *Physiological volume regulation by spermatozoa*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006. **250**(1-2): p. 98-105.
247. Einarsson, S. and B. Gustafsson, *A case of epididymal dysfunction in boar*. *Andrologie*, 1973. **5**(4): p. 273-9.
248. Tooley, C. *The influence of high osmolality upon the maturation of spermatozoa in the boar epididymis*. The university of Nottingham, 2008.
249. King, G.J. and J.W. Macpherson, *Alkaline and acid phosphatase activity, pH and osmotic pressure of boar semen*. *Can J Comp Med Vet Sci*, 1966. **30**(11): p. 304-7.
250. Davies, D.C., et al., *The removal of the seminal vesicles from the boar and the effects on the semen characteristics*. *J Reprod Fertil*, 1975. **43**(2): p. 305-12.
251. Li, R., et al., *Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos*. *Mol Reprod Dev*, 2007. **74**(9): p. 1228-35.
252. Petrunkina, A.M., et al., *Sperm-cell volumetric measurements as parameters in bull semen function evaluation: correlation with nonreturn rate*. *Andrologia*, 2001. **33**(6): p. 360-7.
253. Petrunkina, A.M., et al., *Role of potassium channels, the sodium-potassium pump and the cytoskeleton in the control of dog sperm volume*. *Theriogenology*, 2004. **61**(1): p. 35-54.
254. Wong, C.W., H.W. Han, and S.H. Hsu, *Changes of cell membrane fluidity for mesenchymal stem cell spheroids on biomaterial surfaces*. *World J Stem Cells*, 2022. **14**(8): p. 616-632.
255. Gautier, C. and C. Aurich, *"Fine feathers make fine birds" - The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction*. *Anim Reprod Sci*, 2022. **246**: p. 106884.
256. Gunwant, V., et al., *Protein-Mediated Changes in Membrane Fluidity and Ordering: Insights into the Molecular Mechanism and Implications for Cellular Function*. *J Phys Chem Lett*, 2024. **15**(16): p. 4408-4415.
257. Saez, F., A. Ouvrier, and J.R. Drevet, *Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability*. *Asian J Androl*, 2011. **13**(1): p. 11-7.
258. Petrunkina, A.M., *Fundamental Aspects of Gamete Cryobiology*. *J Reproduktionsmed Endokrinol*, 2007. **4** p. 78-91.
259. Oldenhof, H., et al., *Tolerance of spermatozoa to hypotonic stress: role of membrane fluidity and correlation with cryosurvival*. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2015. **27**(2): p. 285-93.
260. Holt, W.V., *Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences*. *Theriogenology*, 2000. **53**(1): p. 47-58.

261. Garner, D.L. and L.A. Johnson, *Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide*. Biol Reprod, 1995. **53**(2): p. 276-84.
262. Yeste, M., et al., *The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter*. Anim Reprod Sci, 2010. **119**(3-4): p. 265-74.
263. Druart, X., et al., *Hypotonic resistance of boar spermatozoa: sperm subpopulations and relationship with epididymal maturation and fertility*. Reproduction, 2009. **137**(2): p. 205-13.
264. Christova, Y., et al., *Molecular diffusion in sperm plasma membranes during epididymal maturation*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **216**(1-2): p. 41-6.
265. Christova, Y., P.S. James, and R. Jones, *Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals*. Molecular Reproduction and Development, 2004. **68**(3): p. 365-72.
266. Tsikis, G., et al., *Seminal plasma differentially alters the resistance of dog, ram and boar spermatozoa to hypotonic stress*. Anim Reprod Sci, 2018. **193**: p. 1-8.
267. Driancourt, M.A. *Fixed time artificial insemination in gilts and sows. Tools, schedules and efficacy*. in *Society for Reproduction and Fertility*. 2013.
268. X. Druart, J.C., G. Baril, F. Clement, J.-L. Dacheux, J.-L. Gatti,, *Visualisation in vivo des spermatozoïdes de bélier dans le tractus génital de brebis par microscopie confocale fibrée*. Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie, 2011. **Volume 1806**(11): p. 601-669.
269. Schimpf, U., et al., *Topical reinforcement of the cervical mucus barrier to sperm*. Sci Transl Med, 2022. **14**(673): p. eabm2417.
270. D'Amours, O., et al., *Proteomic Markers of Functional Sperm Population in Bovines: Comparison of Low- and High-Density Spermatozoa Following Cryopreservation*. J Proteome Res, 2018. **17**(1): p. 177-188.
271. Henning, H.H.W., et al., *Fluorescent labelling of boar spermatozoa for quantitative studies on competitive sperm-oviduct binding*. Reprod Fertil Dev, 2019. **31**(9): p. 1520-1532.
272. Vincent, R. and D. Nadeau, *Adjustment of the osmolality of Percoll for the isopycnic separation of cells and cell organelles*. Anal Biochem, 1984. **141**(2): p. 322-8.
273. Vuorte, J., S.E. Jansson, and H. Repo, *Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay*. Cytometry, 2001. **43**(4): p. 290-6.
274. Bankhead, P., et al., *QuPath: Open source software for digital pathology image analysis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16878.
275. Hunter, R.H., *Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct*. J Reprod Fertil, 1984. **72**(1): p. 203-11.
276. Tummaruk, P. and P. Tienthai, *Number of spermatozoa in the crypts of the sperm reservoir at about 24 h after a low-dose intrauterine and deep intrauterine insemination in sows*. Reprod Domest Anim, 2010. **45**(2): p. 208-13.
277. Tummaruk, P., et al., *Distribution of spermatozoa and embryos in the female reproductive tract after unilateral deep intra uterine insemination in the pig*. Reprod Domest Anim, 2007. **42**(6): p. 603-9.
278. Ito, T., et al., *Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds*. Endocrinology, 2011. **152**(10): p. 3952-62.
279. Lamy, J., et al., *Steroid hormones regulate sperm-oviduct interactions in the bovine*. Reproduction, 2017. **154**(4): p. 497-508.
280. Krzymowski, T., J. Kotwica, and S. Stefanczyk-Krzymowska, *Uterine and ovarian countercurrent pathways in the control of ovarian function in the pig*. J Reprod Fertil Suppl, 1990. **40**: p. 179-91.
281. Langendijk, P., et al., *Myometrial activity around estrus in sows: spontaneous activity and effects of estrogens, cloprostenol, seminal plasma and clenbuterol*. Theriogenology, 2002. **57**(5): p. 1563-77.
282. Einer-Jensen, N. and R. Hunter, *Counter-current transfer in reproductive biology*. Reproduction, 2005. **129**(1): p. 9-18.

283. Kasimanickam, R., et al., *Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity*. Theriogenology, 2006. **66**(5): p. 1307-15.
284. Beatty, R.A., et al., *An experiment with heterospermicsemination in cattle*. J Reprod Fertil, 1969. **19**(3): p. 491-502.

VII. Annexes

Annexe 1 Evaluation des 23 fluorochromes

Molécules	λ(Ex/Em)	Cible	Conc / %	Signal Cellvisio	Signal Scanner	Localisation marquage	↓Mobilité spz (J0)	↓Mobilité spz (J1)	Validé in vitro	Validé après IA	Diffusion	Résultats
Hoechst 33342 (Sigma_B2261)	350/461	ADN	8.9 µM	OK	OK	Tête	Pas d'effet		✓		Oui	Validé in vitro et après IA mais diffusible
Hoechst 33342 Chlorure de rhodamine B octadécyle (R18) Double marquage	350/461 + 556/578	ADN + Lipide	8.9 µM 1.9 µM	OK	OK	Tête + Tête + flagelle	Pas d'effet		✓	✓	Oui/ Hoechst	
SYTO 16 green (Invitrogen_S7578)	488/518	ARN/ADN	1000 nM			Tête		-93%	X			Validé in vitro
			500 nM					-69%				
			250 nM					-42%				
			125 nM					-32%				
			125 nM	OK				-69%				
			62,5 nM					-21%				
			31,2 nM					Pas d'effet		✓		
			15,6 nM	Faible						X		
SYTO 16 green + Chlorure de rhodamine B octadécyle (R18) Double marquage	488/518 + 556/578	ARN/ADN + Lipides	31.2 nM		OK	Tête + Tête et Flagelle	Pas d'effet		✓	X		
PKH67 Green (Phanos Technologies_MINI67-1KT)	490/502	Lipides	1,6%	Faible		Tête et flagelle	non évalué		X			Non validé
			0,8%				non évalué					
			0,4%				Pas d'effet					
Fluorescein isothiocyanate isomer I (Sigma_F7250)	492/518	Protéines	25,6 µM	OK		Tête et flagelle	-100%		X			Non validé
			12,8 µM					-100%				
			5,1 µM	Faible				-100%				
			2,5 µM					-28%				
			5,1 µM		Faible			Pas d'effet				
2,5 µM		Pas d'effet										
Tubulin Tracker Green (Invitrogen_T34078)	494/522	Tubuline	1%	OK		Tête et flagelle	-38%		X			Non validé
			0,4%	Faible			Pas d'effet					
			0,2%	Faible								
			0,2%	Faible								
Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE) (Sigma_21888)	492/518	Amine	50µM		OK	Tête et flagelle	-95%		X			Validé in vitro et après IA et pour marquage différentiel
			20µM					-54%				
			10µM					-41%				
			5µM					-21%		-36%		
			2.5µM					-13%		-13%	✓	
			1µM					Pas d'effet		Pas d'effet	✓	
			0.5µM					Pas d'effet		Pas d'effet	✓	
			1µM									
TRITC (Santa cruz_sc-215958)	529/596	protéines	22,54 µM	OK		Tête et flagelle	-100%		X			Non validé
			11,27 µM					-97%				
			2,254 µM					-50%				

Chlorure de rhodamine B octadécyle (R18) (Invitrogen_O246)	556/578	Lipides	30 µM			Tête et flagelle	-96%		X		Validé in vitro et après IA et pour marquage différentiel	
			15 µM				-60%					
			7,5 µM				-9%		✓			
			7,5 µM	OK			Pas d'effet					
			7,5 µM				-9%		✓			
			1.88 µM		OK		Pas d'effet					
			1.88 µM						✓	Non		
MitoTracker™ Green FM (Invitrogen_M7514) + Chlorure de rhodamine B octadécyle (R18) (Invitrogen_O246) Double marquage	490/516 + 556/578	mitochondries	5 µM			Flagelle + Tête et flagelle	-100%		X		Validé in vitro et après IA mais diffusible * Marquage stable 96h in vitro et 24h après IA (IA_abattage = 3h)	
			7,5 µM				-95%					
			2 µM				-64%					
			7,5 µM				-29%					
			0,5 µM	OK			Pas d'effet		✓			
			7,5 µM				Pas d'effet		✓			
		Mitochondries + Lipides	0,5 µM									
			7,5 µM									
			0.25µM			OK	Pas d'effet		✓*	Oui/Mitotracker (24h post IA)		
			3.75 µM									
			0.13 µM									
			1.88 µM									
0.25µM												
1.88 µM												
0.25µM												
1.88 µM												
SYTO™ Deep Red (Invitrogen_S34900)	652/669	ADN/ARN	20 µM	OK		Tête	-100%		X		Validé in vitro et après IA mais diffusible	
			10 µM	OK			-93%					
			2 µM	OK			-81%					
			1 µM	OK			-55%					
			0,5 µM	OK			-77%					
			0,25 µM	OK			-27%					
			0.25 µM	OK			Pas d'effet		✓			
			0.13 µM	OK			Pas d'effet					
			0.063 µM	Faible			Pas d'effet		X			
			0.031 µM	Rien			non évalué		X			
			0.25 µM	OK			Pas d'effet	-43% (lot1) -13% (lot2)	✓			
			0.13 µM	OK			-17% (lot1)	-26% (lot1) -28% (lot2)				
			0.25 µM		OK					Oui/Syto Depp Red		
SYTO™ Deep Red (Invitrogen_S34900) + Chlorure de rhodamine B octadécyle (R18) (Invitrogen_O246) Double marquage	652/669 + 556/578	ADN/ARN + Lipides	0.25 µM			Tête + Tête et flagelle	< 20%		✓			
			3.7 µM				< 20%					
			0.25 µM		OK				✓	Oui/Syto Depp Red		
			1.8 µM									
			0.25 µM									
			1.8 µM									
CellTrace™ Far Red (Invitrogen_C34572)	630/661	Amine	5 µM			Tête + flagelle	Pas d'effet		X		Non validé	
			2 µM	Faible			Pas d'effet					
LBL-Dye 717 Proimagong_AA209	690/717	Lipides	0,05%			Tête et flagelle	-98%		X		Non validé	
			0,025%	Faible			-77%					
			0,0125%				-23%					
			0.0125%				Pas d'effet	48%				
			0.0063%		OK		Pas d'effet	8%	✓			
			0.0031%				Pas d'effet	4%				
			0.0063%		Faible					X		

Vybrant™ DiD (Invitrogen_V22887)	644/665	Lipides	0,5%	Rien	Faible	Tête et flagelle	Pas d'effet	X			Non validé
			0,1%				Pas d'effet				
CellTracker™ Deep Red (Invitrogen_C34565)	630/650	Lipides	5 µM	Faible	Faible	Tête et flagelle	Pas d'effet	X			Non validé
			2 µM				Pas d'effet				
			10µM				pas d'effet				
CellMask™ Deep Red (Invitrogen_C10046)	649/666	Lipides	0,5%	Rien			non évalué	X			Non validé
			0, 1%				Pas d'effet				
MemGlow™ 700 (Cytoskeleton_MG05-02)	689/713	Lipides	2 µM	OK		Tête et flagelle	-88%	-100%	X		Validé in vitro A tester après IA
			0,2 µM				-8%	-89%			
			0,02 µM	Faible			26%	2%	X		
			0,2 µM				Pas d'effet				
			0,1 µM	OK			Pas d'effet	✓			
			0,05 µM				Pas d'effet				
MemGlow™ 640 (Cytoskeleton_MG04-10)	650/673	Lipides	0.025		OK	Tête et flagelle	non évalué	X			Validation in vitro, détection très faibles après IA
		Lipides	0.025				Pas d'effet				
MitoTracker™ Deep Red FM (Invitrogen_M22426)	644/665	Mitochondrie s	12,5 µM	OK		Flagelle	-85%	X			Non validé
			6,25 µM				-74%				
			3,125 µM				-76%				
			1,5625 µM				-67%				
Tubulin Tracker Deep Red (Invitrogen_T34077)	652/669	Tubuline	1%	Rien			non évalué	X			Non validé
			0,4%				non évalué				
			0,2%				non évalué				
Methy green (Sigma_M8884)	388/633	ADN	100 µg/ml	Faible			non évalué	X			Non validé
		ADN	10 µg/mL				non évalué				
		ADN	1 µg/mL				non évalué				
FM™ 4-64 Dye (ThermoFisher_T13320,)	515/640	Lipides	50 µg/mL	OK		Tête et flagell	-100%	X			Non validé
			5 µg/mL				-100%				
			0.5 µg/mL	Rien			non évalué				
SIR-DNA (Spirochrome_SC007)	652/674	ADN	0.1 µM			Tête	-14%	✓			Validé in vitro et après IA mais diffusible
SIR-DNA + Chlorure de rhodamine B octadécyle (R18) Double marquage	652/674 + 556/578	ADN + Lipides	0.1 µM 1.88 µM			Tête + Tête et flagelle	-11%		✓	Oui/SIR-DNA	
Nile red (Fisher_1142) + Chlorure de rhodamine B octadécyle (R18) Double marquage	552/636 + 556/578	Lipides + Lipides	30 µM	OK		Tête et flagelle + Tête et flagelle	-16% (-52% à 15%)	✓			Validation à poursuivre en monomarquage
			3 µM	Faible			-13% (-26% à 15%)				
			0.3 µM				-12% (-94% à 15%)				

La validation des résultats *in vitro*, après IA et pour le marquage différentiel, ainsi que la présence de signal en microscopie sont indiquées par le sigle ✓ et un résultat négatif par le sigle X. Les résultats de mobilité sont exprimés en % de diminution du témoin et un seuil d'acceptabilité a été choisi à une diminution ≤ - 20 %.

Les concentrations des fluorochromes correspondant à une validation sont indiquées avec une couleur de police :

- **Police rouge** : validation *in vitro*, après IA et pour les marquages différentiels : CFSE et le R18.
- **Police violette** : validation *in vitro* et après IA : Hoechst, Mitotracker green*, Syto deep red et SIR-DNA (*marquage instable > 24 h après la collecte des échantillons).
- **Police bleue** : validés *in vitro* : Syto 16 green et Memglow 700 et LBL-Dye 7

Annexe 2 Evaluation du stade du cycle et dimensions des cornes utérines et des oviductes

Stade du cycle	Nombre cochettes	Nombre de follicules (Mean + SD [Min_Max])		Nombre d'ovulations (Mediane [Min_Max])		Longueur utérus (cm)		Longueur oviducte (cm)	
		Gauche	Droit	Gauche	Droit	Gauche	Droit	Gauche	Droit
Pré-ovulatoire	9	11,3±1,7 [9-14]	10,8±4 [4-12]			120±20,7 [85-160]	115±23 [78-160]	26,5±2 [23-30]	25,4±4,7 [19-36]
Pré-post-ovulatoire	1	9	5	9	9	130	128	25	24
Post-ovulatoire	5			11,8±2,2 [9-14]	8,6±2,8 [4-12]	120±16,5 [92-135]	119±27[90-160]	27± 6,9 [18-36,5]	26,7±6,1 [17-33,5]

Nombre de gros follicules et/ou de traces d'ovulation récentes et longueurs des cornes utérines et des oviductes après leur linéarisation. Pour 4 cochettes sur 15, le nombre de follicules et/ou ovulations peut être incomplet car il a été déterminé d'après des photos des ovaires (1 ou 2 plan maximum) et il est manquant pour 1 cochette de l'étude

Annexe 3 Données individuelles de comptage des spermatozoïdes pour les cornes utérines et la JUT

Comptage Utérus et JUT										
Lot semence	Cochette	Stade	Coté	réplicat	Fluides				Cellules	
					CaUT	MiUT	CrUT	JUT	JUT	JUT (tissu)
1	1	pré-ov	G	1	3.72E+06	3.46E+06	3.00E+06	11	0	
				2	2.85E+06	4.34E+06	3.01E+06	0	25	
	D	1	5.43E+06	4.03E+06	4.17E+05	109	1.50E+03			
		2	2.67E+06	4.73E+06	4.80E+05	126	1.83E+03			
	2	pré-ov	G	1	1.09E+06	1.32E+07	3.38E+07	5.88E+03	1.18E+03	
				2	1.06E+06	1.39E+07	2.72E+07	7.24E+03	644	
	D	1	4.35E+07	1.82E+07	2.44E+06	2.64E+04	6.19E+03			
		2	3.96E+07	1.71E+07	2.44E+06	2.24E+04	6.20E+03			
	3	pré-ov	G	1	5.85E+06	5.80E+06	6.93E+06	2.17E+03	1.19E+04	
2				4.90E+06	6.84E+06	6.54E+06	1.93E+03	9.75E+03		
D	1	2.24E+06	3.88E+06	2.09E+07	2.13E+03	0				
	2	2.32E+06	3.41E+06	2.00E+07	2.94E+03	20				
2	4	post-ov	G	1	8.12E+06	6.37E+06	1.17E+06	4.90E+03	2.13E+04	
				2	8.14E+06	7.32E+06	1.67E+06	4.21E+03	1.82E+04	
	D	1	3.16E+06	1.18E+07	7.40E+06	2.10E+04	5.15E+04	2.69E+04		
		2	4.03E+06	1.29E+07	8.40E+06	2.16E+04	5.58E+04			
	5	pre-ov	G	1	4.50E+05	9.51E+05	7.98E+06	6.18E+03	5.29E+03	
				2		1.11E+06	7.76E+06	5.79E+03	5.36E+03	
	D	1	4.49E+05	3.41E+04	4.57E+05	2.02E+04	8.76E+03	105		
		2	5.12E+05	3.72E+05	7.14E+05	2.14E+04	9.39E+03			
	6	Pré-post ov	G	1	1.12E+07	7.04E+06	2.11E+07	2.83E+03	5.33E+03	
2				1.33E+07	8.88E+06	1.89E+07		3.70E+03		
D	1	1.07E+07	1.12E+07	1.23E+06	4.61E+03	6.56E+03				
	2	1.29E+06	1.33E+07	1.06E+07	4.89E+03	7.79E+03				
3	7	pré-ov	G	1	5.98E+07	5.54E+07	2.49E+07	1.03E+04	0	
				2	5.13E+07	6.07E+07	2.68E+07	8.80E+03		
				D	1	3.82E+07	1.29E+07	2.17E+07	2.00E+04	2.97E+04
2	3.88E+07	1.35E+07	2.31E+07		2.14E+04					
4	8	pré-ov	G	1	6.51E+06	1.52E+07	1.46E+06	8.37E+03	165	
				2	6.42E+06	1.51E+07	1.42E+06			
	D	1	1.43E+04	6.38E+05	7.84E+05	3.70E+03	116			
		2	0	7.01E+05	7.50E+05					
	9	pré-ov	G	1	2.58E+05	6.85E+05	1.42E+05	2.50E+03	56	
				2	3.48E+05	6.01E+05	1.67E+05			
D	1	1.04E+05	2.90E+05	3.52E+06	2.23E+03	929	6.80E+04			
	2	1.08E+05	2.95E+05	4.16E+06						
5	10	pré-ov	G	1	2.43E+06	1.83E+06	6.21E+06	4.10E+03	1.78E+03	5.38E+04
				2	2.34E+06	1.93E+06	1.30E+06			
	D	1	1.11E+06	3.43E+06	1.44E+06	9.34E+03	738			
		2	1.22E+06	3.61E+06	1.43E+06					
	11	post ov	G	1	2.48E+06	2.64E+06	5.08E+06	2.34E+03	0	2.61E+04
				2	2.31E+06	4.67E+06	8.21E+06			
	D	1	1.11E+04	4.59E+05	7.86E+05	8.49E+03	0	1.32E+04		
		2	2.22E+05	4.04E+05	8.42E+05					
		3	1.88E+05							
6	12	pré-ov	G	1	2.55E+05	3.23E+05	9.16E+04	196	0	1.51E+05
				2	2.65E+05	6.01E+05	9.16E+04			
	D	1	3.37E+05	1.18E+06	5.03E+06	3.94E+03	0	7.00E+04		
		2	3.29E+05	9.92E+05	4.82E+06					
	13	post ov	G	1	2.05E+05	2.25E+05	7.44E+04	10	0	
				2	2.13E+05	2.35E+05				
D	1	2.14E+05	5.66E+04	7.65E+03	10	0	0			
	2	2.52E+05								
7	14	post ov	G	1	2.99E+05	2.42E+05	3.45E+05	1.74E+04	5.77E+04	8.38E+04
				2	3.43E+05	2.23E+05	3.66E+05			
	D	1	1.36E+07	2.25E+07	1.19E+07	1.87E+03	2.17E+04			
		2	1.37E+07	2.45E+07	1.25E+07					
	15	post ov	G	1	8.86E+05	8.29E+05	6.13E+06	3.90E+04	2.27E+03	
				2	9.60E+05	7.95E+05	6.49E+06			
D	1	6.00E+07	7.76E+07	4.26E+07	9.12E+03	3.39E+03				
	2	6.51E+07	8.05E+07	4.44E+07						

Annexe 4 Données individuelles de comptage des spermatozoïdes pour les oviductes

Comptage oviducte													
Lot semence	Cochettes	Stade	Coté	Fluides			Cellules			Total			Oviducte
				CaIS	CrIS	AM	CaIS	CrIS	AM	CaIS	CrIS	AM	
1	1	pré-ov	G										0
			D										0
	2	pré-ov	G	241	284					241	284		525
			D	2087	119					2087	119		2206
	3	pré-ov	G	647				59		647	59		706
			D	5						5			5
2	4	post-ov	G										0
			D	12						12			12
	5	pré-ov	G	266				1		266	1		267
			D	393		1		99		393	99	1	493
	6	Pré-post ov	G	1255			10	109	601	1265	109	601	1975
			D	12			10	73		22	73		95
3	7	pré-ov	G										0
			D				20			20			20
4	8	pré-ov	G			18						18	18
			D			87						87	87
	9	pré-ov	G			136						136	136
			D			14						14	14
5	10	pré-ov	G				1	4	6	1	4	6	11
			D	5				4		5	4		9
	11	post-ov	G				1	24	1	1	24	1	26
			D	10					21	10		21	31
6	12	pré-ov	G				2	104			2	104	106
			D	44	16	18	3	36	211	47	52	229	328
	13	post-ov	G										0
			D										0
7	14	post-ov	G					5	1		5	1	6
			D	10	1			5	9	10	6	9	25
	15	post-ov	G	184		1	213	16	80	397	16	81	494
			D	73	33	10	1	165	392	74	198	402	674
				Comptage sur amas tissu pour le fluide									

Annexe 5 Quantification des spermatozoïdes après IA hétérospermique de verrats résistants (-) et (+)

Régions	Coté	Nombre spz/image	Ratio Résistant(+)/résistant(-)	N° IA	MOY/région
Marquage			1		
CER		3994	1,26	1	
		18327	1,66	2	1,46
CUT		2538	0,9	1	
		881	2,57	2	1,74
CaUT	G	962	1,27	1	
	D	5266	3,21	2	
	G	7376	1,97	2	
	G	1125	1,2	3	1,91
MiUT	D	1551	1,02	1	
	G	5742	1,06	1	
	D	3085	1,78	2	
	G	2115	1,57	2	
	D	1880	1,08	3	
	G	1207	0,82	3	1,22
CrUT	D	771	1,07	1	
	G	4539	1,21	1	
	D	19895	1,42	2	
	G	5053	1,63	2	
	G	2239	0,88	3	1,24
JUT	G	2914	1,69	1	
	D	2015	1,34	2	
	G	5542	0,83	3	1,29

CER = cervix, CUT = corps utérin, CaUT = corne utérine caudale, MiUT = corne utérine milieu, CrUT = corne utérine crâniale, JUT = jonction utéro-tubaire.