



Caractérisation d'un modèle *in vitro* de réservoir spermatique porcin : vers une meilleure prédiction de la fertilité des verrats ?

Lorraine SCHMALTZ (1) (2), Isabelle MEROUR (2) Pascal MERMILLOD (1) Marie SAINT-DIZIER (1)

(1) INRAE, Université de Tours, PRC, 37380, Nouzilly, France

(2) YXIA, 35590, Saint-Gilles, France

lorraine.schmaltz@inrae.fr

Caractérisation d'un modèle *in vitro* de réservoir spermatique porcin : vers une meilleure prédiction de la fertilité des verrats ?

La semence des verrats d'insémination est qualifiée par la méthode du CASA (Computer Assisted Semen Analysis) sur des critères de concentration, de morphologie, et de mobilité. Néanmoins, bien que satisfaisant à ces critères, une sous-population de verrats s'avère hypofertile après insémination, soulignant l'insuffisance des techniques actuelles de qualification. L'objectif de ce projet est de développer un modèle *in vitro* de réservoir spermatique afin d'évaluer la capacité des spermatozoïdes à survivre dans les voies génitales femelles après insémination, avec l'hypothèse que ce modèle sera prédictif de la fertilité et/ou de la prolificité. Les résultats montrent que les sphéroïdes de cellules épithéliales d'oviducte de truie présentent des caractéristiques proches des cellules épithéliales *in vivo*, et que les spermatozoïdes s'y lient avec une densité comparable quel que soit le pool de femelles utilisé. Cependant, pour un même verrot, l'aptitude de liaison des spermatozoïdes diffère significativement d'un éjaculat à l'autre (28 % < coefficient de variation < 127 %), sans qu'il y ait de corrélation avec la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes ou la dilution de l'éjaculat. En conclusion, l'absence de répétabilité de la liaison entre éjaculats ne permet pas d'utiliser cet outil pour la qualification de la semence en routine. Cependant, ce modèle est intéressant pour l'étude des interactions entre les spermatozoïdes et les cellules maternelles dans l'oviducte, et la compréhension des mécanismes de liaison, pouvant déboucher sur des pistes d'amélioration de la fertilité mâle.

Characterization of an *in vitro* model of sperm storage in pigs: towards a better prediction of boar fertility?

Semen from insemination boars is qualified by the CASA (Computer Assisted Semen Analysis) method on the basis of concentration, morphology and mobility criteria. However, despite meeting these criteria, a sub-population of boars are hypofertile after insemination, highlighting the inadequacy of current qualification techniques. The aim of this project is to develop an *in vitro* sperm reservoir model to assess the ability of spermatozoa to survive in the female genital tract after insemination, with the hypothesis that this model will be predictive of fertility and/or prolificacy. The results show that the spheroids of sow oviduct epithelial cells have characteristics close to those of epithelial cells *in vivo*, and that spermatozoa bind to them at a comparable density whatever the pool of females used. However, for the same boar, the ability of spermatozoa to bind differed significantly from one ejaculate to another (28% < coefficient of variation < 127%), with no correlation with sperm mobility and viability) or ejaculate dilution. In conclusion, the lack of repeatability of ejaculate binding means that this tool cannot be used for routine semen qualification. However, this model is interesting for studying the interactions between spermatozoa and maternal cells in the oviduct, and understanding the binding mechanisms, which could lead to ways of improving male fertility.

INTRODUCTION

L'insémination artificielle (IA) est la biotechnologie la plus utilisée pour diffuser la valeur génétique des verrats sélectionnés pour l'amélioration des performances. Les verrats utilisés pour l'IA sont généralement collectés deux fois par semaine, un éjaculat fournissant des dizaines de doses d'IA qui

sont expédiées entre 16 et 19°C dans les élevages en multiplication et production pour être utilisées dans les 4 à 5 jours. Les méthodes traditionnelles utilisées pour évaluer les verrats et les éjaculats dans les centres d'IA comprennent l'évaluation systématique de la concentration en spermatozoïdes, de la motilité et des anomalies morphologiques. Cependant, certains éjaculats subfertiles passent à travers ces contrôles de qualité et des baisses de

fertilité attribuables aux doses d'IA sont encore enregistrées dans les élevages de production (Roca *et al.*, 2015). Il est donc nécessaire d'éliminer rapidement et avec précision les verrats et les éjaculats peu fertiles afin d'accroître la productivité et la durabilité de la production de viande de porc.

La capacité des spermatozoïdes à survivre dans le tractus femelle après l'IA est particulièrement cruciale chez les truies en raison de la grande variation de l'intervalle entre le début des chaleurs et les ovulations, et du nombre élevé d'ovocytes à féconder (Kemp et Soede, 2020 ; Soede et Kemp, 1997). L'un des principaux sites de survie des spermatozoïdes dans le tractus femelle est la partie caudale de l'oviducte, nommé isthme, où une sous-population de spermatozoïdes se lie fermement aux cellules épithéliales ciliées de l'oviducte (Saint-Dizier *et al.*, 2020 ; Suarez, 2008). La liaison des spermatozoïdes aux cils des cellules de l'oviducte prolonge la durée de vie des spermatozoïdes et augmente la fenêtre temporelle de fécondation grâce à la libération progressive de spermatozoïdes vers l'ampoule, où les ovocytes sont expulsés au moment de l'ovulation puis fécondés (Saint-Dizier *et al.*, 2020 ; Suarez *et al.*, 1991).

Par conséquent, en plus des méthodes traditionnelles d'analyse du sperme, des tests de liaison des spermatozoïdes aux explants épithéliaux de l'oviducte ou à des sucres spécifiques qui imitent la lumière de l'oviducte ont été proposés pour tenter de mieux prédire la fertilité mâle chez le verrat et le taureau (Waberski *et al.*, 2005 ; Petrunkina *et al.*, 2001). Des études antérieures chez le verrat ont mis en évidence des différences dans le nombre de spermatozoïdes liés aux explants d'oviducte entre les mâles (Waberski *et al.*, 2005 ; Winters *et al.*, 2018 ; Daigneault *et al.*, 2015 ; Petrunkina *et al.*, 2001). Cependant, les données sur la liaison des spermatozoïdes de verrats ont été rapportées en poolant plusieurs éjaculats de verrats individuels (Winters *et al.*, 2018 ; Waberski *et al.*, 2006 ; Petrunkina *et al.*, 2001) ou en évaluant un unique éjaculat par verrat (Daigneault *et al.*, 2015 ; Daigneault *et al.*, 2014). La répétabilité du test de liaison entre éjaculats d'un même verrat reste donc à évaluer.

En outre, la plupart des études portant sur les interactions entre spermatozoïdes et oviducte chez les mammifères ont utilisé des explants d'oviducte ou des monocouches de cellules d'oviducte (Waberski *et al.*, 2005 ; Waberski *et al.*, 2006 ; Petrunkina *et al.*, 2001 ; Sostaric *et al.*, 2008). Les explants d'oviducte présentent l'avantage d'être produits rapidement à partir d'oviductes d'abattoir, mais ils sont généralement hétérogènes en termes de forme et de taille et difficiles à standardiser entre les expériences (Suarez, 2008 ; Petrunkina *et al.*, 2001). D'autre part, les monocouches de cellules épithéliales d'oviducte offrent un nombre standardisé de cellules mais sont longues à établir (minimum 5-7 jours) et perdent leurs cils pendant la culture (Sostaric *et al.*, 2008), rendant non spécifique la liaison des spermatozoïdes.

Les objectifs de cette étude étaient donc 1) de caractériser un modèle *in vitro* de sphéroïdes épithéliaux d'oviducte porcine offrant une surface standardisée pour les essais de liaison des spermatozoïdes, et 2) d'évaluer la variabilité de la liaison des spermatozoïdes aux sphéroïdes entre les femelles, les mâles et leurs éjaculats.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Culture de cellules épithéliales d'isthmes de cochettes et caractérisation des sphéroïdes

Des oviductes de cochettes provenant de l'abattoir sont disséqués de manière à isoler les isthmes (environ 5 cm). Les

cellules épithéliales d'isthme sont mises en culture dans du milieu M199 contenant de la L-glutamine, 10 % de sérum de veau fœtal et de la gentamycine dans un incubateur à 38,8°C avec 5 % de CO₂. Après deux jours de culture, les sphéroïdes en suspension avec une forme homogène et sans replis sont sélectionnés en fonction de leur taille (100-200 µm ; Figure 1).

La caractérisation des sphéroïdes est faite le jour de leur sélection par un immunomarquage de la pan-cytokératine (marqueur de cellules épithéliales), de la vimentine (marqueur de cellules stromales) et de l' α -tubuline acétylée (marqueur des cils). Les sphéroïdes sont fixés (4 % de paraformaldéhyde dans du PBS) puis incubés avec les anticorps primaires (anti-pan-cytokératine, C2931 ; anti-vimentine, V6630 ; anti- α -tubuline acétylée, T7451 ; utilisés respectivement à une concentration finale de 40, 80, et 2 µg/mL) à 4°C pendant toute la nuit. Pour chaque marqueur, des groupes contrôles de sphéroïdes sont incubés avec un IgG1 (M9269) à la même concentration que les anticorps primaires associés. Après deux lavages, les sphéroïdes sont incubés avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488 (A11001, Invitrogen ; à 2 µg/mL), les noyaux sont marqués par le Hoechst (fluorochrome marquant l'ADN, B2261, 1 µg/mL) puis les sphéroïdes sont observés en microscopie confocale.

1.2. Préparation de la semence porcine

La semence fraîche de verrat Piétrain est fournie par la coopérative YXIA (Saint-Gilles, France). Elle est obtenue grâce à un collecteur de semence (CollectOr, Ecopor, France) puis diluée avec un dilueur commercial (KobiDil+, YXIA), à une concentration finale de 25 à 35. 10⁶ spermatozoïdes/mL. Les doses sont acheminées au laboratoire et conservées à 17°C avant leur utilisation. Le jour du test de liaison aux sphéroïdes, les noyaux spermatiques sont marqués au Hoechst (B2261, 1 µg/mL) puis lavés dans du milieu non-capacitant (MNC ; modifié d'après Parrish *et al.*, 1988) contenant 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 0,3 mM NaH₂PO₄.H₂O, 2,1 mM CaCl₂.H₂O, 0,4 mM MgCl₂.6H₂O, 1 mM sodium pyruvate, 27,4 mM lactate, 10 mM HEPES, 1 mg/mL d'alcool polyvinylique, et ajusté à un pH de 7,4 et une osmolarité de 300 mOsm. La mobilité (50 % minimum), la progressivité et la morphologie (> 80% normaux) sont évaluées par un analyseur CASA (IVOS II, IMV technologies).

1.3. Incubation des sphéroïdes avec les spermatozoïdes et évaluation de la liaison spermatique

Les sphéroïdes (20 par condition) sont co-incubés avec les spermatozoïdes à une concentration finale de 1,6. 10⁵ spermatozoïdes/mL dans un volume final de 80 µL. Cette incubation est effectuée en incubateur à atmosphère humide à 38,8°C avec 5 % de CO₂ pendant 30 minutes. Après l'incubation, les complexes sphéroïdes-spermatozoïdes sont lavés dans le MNC pour détacher les spermatozoïdes faiblement liés, puis fixés (2,5 % glutaraldéhyde dans 0,1 M de cacodylate) puis analysés en microscopie confocale (LSM 780, Zeiss). Deux images sont prises sur la face supérieure et inférieure des complexes avec de la lumière blanche et fluorescente (lex ~353 nm, lem ~483 nm). Le logiciel Image J est utilisé pour compter le nombre de spermatozoïdes liés (noyau marqué en bleu).

La densité spermatique est obtenue en divisant le nombre total de spermatozoïdes liés par la surface totale des sphéroïdes. Pour chaque essai, au moins trois répliques biologiques avec des pools différents de sphéroïdes sont effectuées.

1.4. Analyse statistique

Les résultats sont représentés avec la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les effets de la femelle sur la densité de liaison sont analysés par le test non paramétrique Kruskal-Wallis, suivi d'un test de Dunn pour les comparaisons deux à deux. Les effets du verrat et de l'éjaculat sur les densités de liaison sont analysés par une ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Tukey pour les comparaisons deux à deux. Les corrélations sont analysées par un test non paramétrique de Spearman. Les coefficients de variations sont calculés par le rapport de l'écart-type moyen sur la moyenne et sont représentés en pourcentage. Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme significative.

2. RESULTATS

2.1. Caractérisation des sphéroïdes d'oviducte

2.1.1. Morphologie des sphéroïdes

Les sphéroïdes sont formés d'une seule couche de cellules épithéliales d'isthme dont le pôle apical est à l'extérieur. Les battements ciliaires des sphéroïdes provoquent leur maintien en suspension dans le milieu. Des sphéroïdes de taille homogène (100-200 μm), sans replis et uni-cavitaires, sont sélectionnés pour les tests de liaison (Figure 1).

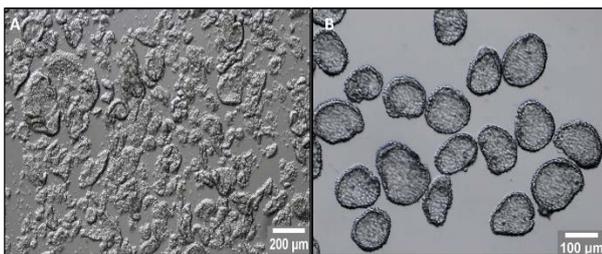


Figure 1 – Formation et sélection de sphéroïdes d'oviducte porcine. Les fragments d'épithélium d'isthmes de cochettes sont mis en culture (A) et après deux jours de culture, des sphéroïdes d'une taille et d'une forme homogène sont sélectionnés (B).

2.1.2. Propriétés épithéliales des sphéroïdes

La présence de la pan-cytokératine (marqueur épithélial) est observée au niveau du cytosol des cellules, tandis que la vimentine (marqueur de cellules stromales) n'est pas observée (données non illustrées). Les sphéroïdes conservent donc des propriétés de cellules épithéliales au cours de la culture.

2.1.3. Densité ciliaire des sphéroïdes entre répliques

Les sites de liaison des spermatozoïdes sont sur les cils des cellules épithéliales d'isthme : ces cils tournés vers l'extérieur sont visibles en vert sur la figure 2. Par ailleurs, sur cinq collectes de sphéroïdes provenant de différents pools de cochettes, la proportion de cellules ciliées moyenne est de 37 % et ne change pas significativement entre répliques (données non illustrées).

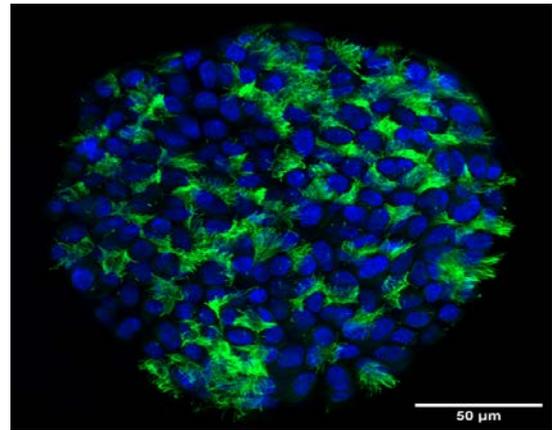


Figure 2 – Observation des cils auxquels se lient les spermatozoïdes à la surface des sphéroïdes. La densité ciliaire est évaluée par immunomarquage de l' α -tubuline acétylée, visible en vert (marqueur de cils) et du marquage des noyaux en bleu.

2.2. Caractérisation du modèle in vitro de réservoir spermatique

2.2.1. Caractérisation de la liaison spermatique aux sphéroïdes

Les spermatozoïdes de verrats se lient très majoritairement aux cellules ciliées des sphéroïdes (Figure 3). L'incubation d'un nombre stable de sphéroïdes avec des concentrations croissantes de spermatozoïdes met en évidence une augmentation linéaire de la densité de liaison (Figure 4). Par ailleurs, la densité de liaison (à $1,6 \times 10^5$ spermatozoïdes/mL) atteint un plateau au bout de 30 minutes de co-incubation et reste stable pendant 120 minutes (Figure 5).

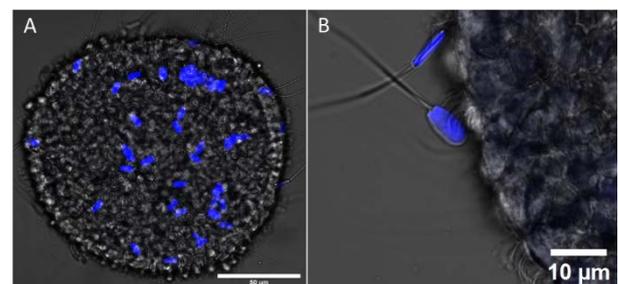


Figure 3 – Liaison des spermatozoïdes aux sphéroïdes. La liaison des spermatozoïdes aux sphéroïdes est évaluée en microscopie confocale avec les noyaux spermatiques marqués au Hoechst (visible en bleu ; (A)). Cette liaison se fait majoritairement au niveau des cellules ciliées (cils visibles en lumière blanche ; (B)).

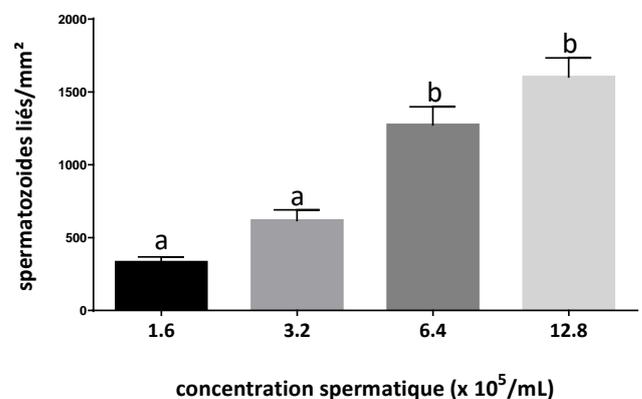


Figure 4 – Effet de la concentration spermatique sur la densité de liaison aux sphéroïdes. Des groupes de 20 sphéroïdes sont incubés avec des concentrations croissantes de spermatozoïdes pendant 30 minutes.

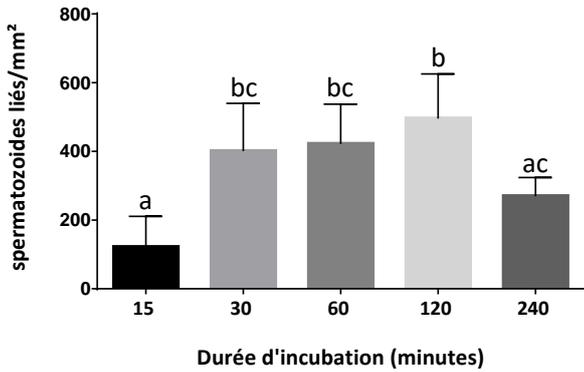


Figure 5 – Effet de la durée d’incubation sur la liaison aux sphéroïdes. Des groupes de 20 sphéroïdes sont incubés pendant des durées variables avec une concentration de $1,6 \times 10^5$ spermatozoïdes/mL.

2.2.2. *Evaluation de la liaison spermatique entre pools de femelles*

Afin de tester l’effet femelle sur la liaison spermatique, différents pools de cochettes sont utilisés pour produire des sphéroïdes co-incubés avec le même éjaculat d’un verrat donné. Sur les cinq verrats testés, les densités de liaison des spermatozoïdes aux sphéroïdes varient entre mâles ($P < 0.0001$) mais pas entre pools de femelles (données non illustrées). La liaison aux sphéroïdes semble donc répétable quel que soit le pool de femelles utilisé pour produire les sphéroïdes.

2.2.3. *Evaluation de la liaison spermatique entre verrats et entre éjaculats*

Cinq éjaculats successifs issus de cinq verrats ont été utilisés afin d’évaluer la variabilité de la liaison aux sphéroïdes entre éjaculats pour un mâle donné. Une forte variabilité de la densité de liaison spermatique aux sphéroïdes a été observé entre éjaculats pour quatre des cinq verrats testés ($28\% < CV < 127\%$; Figure 6). De plus, la densité de liaison n’est pas corrélée aux paramètres CASA de mobilité, de progressivité et de morphologie des spermatozoïdes, ni au facteur de dilution de l’éjaculat (données non illustrées).

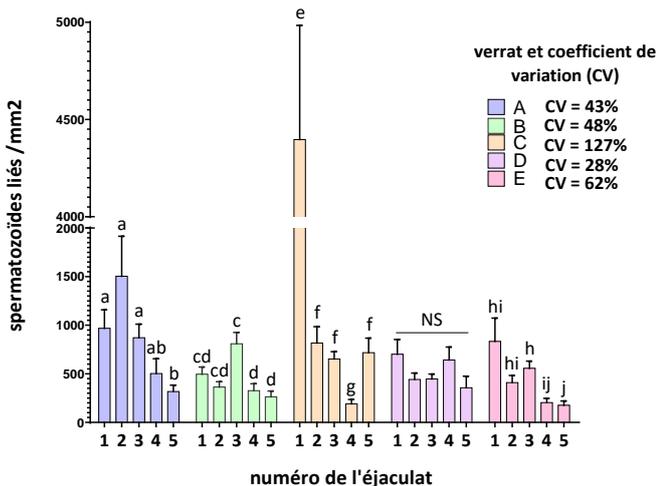


Figure 6 – Liaison de 5 verrats en fonction de l’éjaculat. Des groupes de 20 sphéroïdes provenant de différents pools d’isthmes de cochettes ont été incubés avec une concentration de $1,6 \times 10^5$ spermatozoïdes/ml provenant de 5 éjaculats successifs (1 éjaculat/semaine) pendant 30 min. Les verrats sont représentés par un code couleur associés à une lettre (A-E) accompagné des coefficients de variation associés à chaque mâle.

3. DISCUSSION

Le modèle de sphéroïdes mis au point préserve l’architecture des cellules épithéliales de l’oviducte ; c’est le premier test cellulaire en 3D disponible pour tester la liaison de spermatozoïdes porcins. Les sphéroïdes présentent une proportion de cellules ciliées de 37 %, comparable aux 34 % observés in vivo (Abe et Oikawa, 1992). De plus, les spermatozoïdes se lient très majoritairement aux cellules ciliées, se rapprochant ainsi des caractéristiques du réservoir spermatique in vivo.

C’est la première fois qu’un test in vitro évalue la variabilité de la liaison spermatique à l’oviducte entre femelles, entre mâles et entre éjaculats. Les résultats ont mis en évidence de fortes variations de la densité de liaison entre éjaculats, sans que cela puisse être expliqué par les paramètres de mobilité/morphologie de la semence ou par un effet femelle. En effet, pour un éjaculat donné, la densité spermatique ne variait pas entre pools de femelles donneuses de sphéroïdes. Ces résultats mettent en évidence une grande variabilité des capacités de liaison à l’oviducte des éjaculats, reflétant probablement une grande variabilité de la capacité de survie des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles après IA.

Il est possible que les variations observées proviennent de la composition du plasma séminal au moment de l’éjaculation. En effet, les spermadhésines d’origine séminale sont essentielles pour la liaison des spermatozoïdes aux cellules épithéliales de l’oviducte porcine (Ekhlasi-Hundrieser *et al.*, 2005). Il serait intéressant d’évaluer la concentration en spermadhésines des éjaculats testés.

Une étude récente chez le porc met en évidence une corrélation entre la densité de liaison à des explants d’oviducte et la fertilité après IA (Winters *et al.*, 2018). Dans notre étude, il aurait été intéressant de connaître la fertilité des éjaculats testés en termes de taux de gestation et de taille de portés. Cependant, la précision de cette évaluation est limitée par le faible nombre de doses d’IA habituellement produites par éjaculat (20 à 50) et par les pratiques d’IA en élevage, qui mixent plusieurs verrats (doses hétérospermiqes) pour améliorer la prolificité. Il serait néanmoins intéressant d’évaluer la valeur prédictive de la densité de liaison aux sphéroïdes sur la fertilité lorsque l’éjaculat est fortement dilué (nombreuses doses inséminantes à faible concentration) et pour la production d’embryons in vitro. Les sphéroïdes pourraient également être utilisés pour évaluer l’intégrité membranaire des spermatozoïdes après tri par cytométrie en flux ou cryoconservation.

CONCLUSION

La capacité de liaison des spermatozoïdes frais à des sphéroïdes d’oviducte varie entre mâles et entre éjaculats, ce qui ne permet pas d’utiliser ce test pour évaluer la fertilité d’un verrat à partir d’un seul éjaculat. Les sphéroïdes d’oviductes porcins constituent néanmoins un modèle in vitro accessible et prometteur pour mieux évaluer la qualité des spermatozoïdes et mieux comprendre leurs interactions avec le tractus femelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe H., Oikawa T., 1992. Examination by scanning electron microscopy of oviductal epithelium of the prolific Chinese Meishan pig at follicular and luteal phases. *Anat. Rec.*, 233, 399-408.
- Daigneault B.W. et al, 2015. Enhanced fertility prediction of cryopreserved boar spermatozoa using novel sperm function assessment. *Andrology*, 3, 558-568.
- Daigneault B.W. et al, 2014. Novel and traditional traits of frozen-thawed porcine sperm related to in vitro fertilization success. *Theriogenology*, 82, 266-273.
- Ekhlesi-Hundrieser M. et al, 2005. Spermadhesin AQN1 Is a Candidate Receptor Molecule Involved in the Formation of the Oviductal Sperm Reservoir in the Pig1. *Biol. Reprod.*, 73, 536-545.
- Kemp B., Soede N.M., 2020. Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 52, 79-89.
- Petrunkina A.M. et al, 2001. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction*, 131, 311-8
- Roca J. et al, 2015. Boar Differences In Artificial Insemination Outcomes: Can They Be Minimized? *Reprod. Domest. Anim.*, 50, 48-55.
- Saint-Dizier M. et al, 2020. Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 516, 110956.
- Soede N.M. et Kemp B, 1997. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 52, 91-103.
- Sostaric E. et al, 2008. Sperm binding properties and secretory activity of the bovine oviduct immediately before and after ovulation. *Mol. Reprod. Dev.*, 75, 60-74.
- Suarez S., Redfern K., Raynor P., Martin F., Phillips D.M., 1991. Attachment of Boar Sperm to Mucosal Explants of Oviduct In Vitro: Possible Role in Formation of a Sperm Reservoir. *Biol. Reprod.*, Volume 44, 998-1004.
- Suarez S.S., 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Dev. Biol.*, 52, 455-462.
- Waberski D. et al, 2006. Binding of boar spermatozoa to oviductal epithelium in vitro in relation to sperm morphology and storage time. *Reproduction*, 131, 311-318.
- Waberski D. et al, 2005. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology*, 63, 470-484.
- Winters R.A. et al, 2018. Porcine sperm binding to oviduct cells and glycans as supplements to traditional laboratory semen analysis. *J. Anim.Sci.*, 96, 5265-5275.

