

Effet d'une infection intra-utérine avec des lipopolysaccharides bactériens (LPS) sur certains aspects de la fonction reproductive de la lapine

A. DAL BOSCO¹, G. BRECCHIA², R. CARDINALI¹, C. CASTELLINI¹, C. BOITI²

¹ Dip. Biologia Vegetale, Biotecnologie Agroambientali e Zootechniche, Borgo 20 Giugno, 74 - Perugia, Italie

² Dip. Scienze Biopatologiche Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Via S. Costanzo, 1 - Perugia, Italie

Résumé: L'objectif de cette expérimentation était de définir un protocole pour induire une inflammation subclinique de l'appareil génital des lapines et de déterminer le rôle du plasma séminal sur le transport des spermatozoïdes. Soixante heures après l'administration de 500 µg de lipopolysaccharides bactériens (LPS) de *E. coli*, les lapines étaient inséminées en inoculant près de la région cervicale, 0.2 ml d'un pool de semence (expérimentation 1) et 0.5 ml de semence diluée avec du dilueur TALP ou du plasma séminal (expérimentation 2). Douze heures plus tard les lapines étaient sacrifiées. Le nombre de spermatozoïdes remontés dans les différentes zones de l'appareil génital a été déterminé et des échantillons de l'utérus ont été soumis à un examen histologique. Le nombre de spermatozoïdes récupérés dans les cornes utérines est plus faible dans le groupe des lapines traitées avec LPS, tandis qu'il est nul dans les oviductes; le plasma séminal a donc favorisé le transport des spermatozoïdes, cependant leur nombre est plus faible que chez les lapines non traitées. L'examen histologique a démontré une inflammation semblable à une endométrite chez les lapines traitées avec LPS, et l'action immunoprotectrice du plasma séminal ne garantit le transport des spermatozoïdes.

Abstract. Effect of an intrauterine infection with bacterial lipopolysaccharids on some aspects of rabbit does reproduction. The aim of the trial was to define a protocol for obtaining sub-clinical inflammation in the genital tract of rabbit does and to assess the role of seminal plasma on spermatozoa transport. The does were inoculated 500 µg of bacterial lipopolysaccharids (LPS) of *E. Coli* close to the cervix region, 60 h before artificial insemination carried out by inoculating 0.2 ml of pooled semen (experiment 1) and 0.5 ml of sperm diluted in TALP or in seminal plasma (experiment 2); after 12 h, the does were sacrificed. The number of spermatozoa in the different genital tracts was counted and uterine tissue was examined by histological technique. The spermatozoa recovery was significantly lower in the uterine horn of LPS-treated does, and absent in the oviducts; the addition of seminal plasma helped the transport of spermatozoa, but their number was, in any case, lower than in non treated does. Histological examinations of LPS-does showed an endometritis-like inflammation. The immunoprotective action of seminal plasma is not strong enough to protect spermatozoa.

Introduction

Généralement les lapines sont inséminées pendant la lactation, la superposition de la lactation et de la gestation réduit la réceptivité sexuelle et la fertilité de même que la carrière reproductive. Les facteurs concourant au déterminisme d'une telle situation sont divers, et surtout liés à l'influence négative de la prolactine et aux conditions corporelles défavorables. Malgré l'élimination des principaux facteurs négatifs (par exemple avec l'insémination post-sevrage, Castellini *et al.*, 2003), nous observons encore environ 15 à 20% de cas d'infertilité. Parmi les éventuelles causes, il faut certainement mentionner le rôle essentiel des conditions sanitaires des lapines. En effet il faut souligner que dans les élevages intensifs, les pathologies de l'appareil reproducteur peuvent être très diffuses, celles-ci étant favorisées par les mauvaises conditions hygiéniques dont les animaux sont soumis durant les différentes procédures de l'insémination artificielle (IA).

Les lipopolysaccharides (LPS), des macromolécules constituant la paroi des bactéries Gram-négatif, sont de puissants stimulateurs de la synthèse des prostaglandines et sont largement employés pour provoquer l'inflammation de différents organes. L'objectif de cette étude est de mettre au point un modèle d'inflammation sub-clinique de l'appareil

reproducteur de la lapine (Expérience 1) et d'évaluer le rôle du plasma séminal sur la remontée des spermatozoïdes (Expérience 2).

1. Matériel et méthodes

1.1. Expérience 1

Cette expérience a été réalisée dans la section expérimentale du Département de Biologie Végétale et Biotecnologies Agro-Ambiant et Zootechniques sur 24 lapines de race Néo-Zélandaises blanches (sélectionnées par ANCI-AIA; poids vif 4 kg) non allaitantes: les animaux ont été répartis en deux groupes et soumis à l'administration intracervicale de: Soit 2 ml de sérum physiologique (Lot Témoin)

Soit 2 ml de sérum physiologique +500 µg de LPS (lot LPS)

Les endotoxines utilisées ont été produites par *Escherichia coli* (0127:B8, Sigma-Aldrich).

1, 2, 4, 8, 24, 48 et 72 heures après l'administration intra-utérine, des prises de sang (2 ml) ont été réalisées dans la veine marginale de l'oreille et le nombre total de leucocytes a été déterminé au moyen d'un hématimètre de Thoma.

Simultanément, la température rectale a été enregistrée. Soixante heures après le début du traitement, les lapines ont été inséminées en déposant près du cervix 0.2 ml de pool de semence diluée avec

du dilueur TALP (1:10) contenant environ 10×10^6 spermatozoïdes ayant une motilité progressive de 75%. L'ovulation a été induite avec l'injection de 10 µg de GnRH synthétique (Réceptal, Hoechst-Roussel Vet, Milan, Italy); 12 heures plus tard les lapines ont été sacrifiées en injectant un surdosage de Tanax (Hoechst, Frankfurt) par voie intraveineuse. Ensuite l'appareil génital a été prélevé et sectionné en séparant le cervix, les cornes utérines et les oviductes (Morton et Glover, 1974). Chaque côté du tractus a été perfusé avec 5 ml de sérum physiologique. La concentration des spermatozoïdes a été estimée avec un hématimètre de Thoma. Les ovaires ont été immédiatement séparés et les follicules pré ovulatoires, matures et hémorragiques ont été dénombrés. Des examens histologiques ont été effectués sur les échantillons utérins. Les échantillons ont été fixés dans le tampon de Bouin, déshydratés dans une série croissante d'alcool et inclus dans de la paraffine. Des sections de 6 µm ont été successivement colorées avec de l'hématoxiline-éosine et observées au microscope optique.

1.2. Expérience 2

Tenant compte des résultats de l'expérience 1, 12 autres lapines ont été traitées avec un dosage de 500 µg de LPS et autres 12 avec 2 ml de sérum physiologique (Témoin). Soixante heures après le début du traitement, les lapines ont été distribuées en deux lots, elles ont été inséminées avec:

- 10×10^6 de spermatozoïdes centrifugés, dépourvus du

plasma séminal et dilués dans 0.5 ml de dilueur TALP (lot TALP) ou:

- 10×10^6 de spermatozoïdes dilués dans 0.5 ml de plasma séminal (lot PS).

Le nombre total de spermatozoïdes dans les différentes fractions du tractus génital a été dénombré, comme décrit précédemment.

L'analyse statistique des données a été réalisée en utilisant un modèle linéaire qui évalue l'effet fixe de l'administration de LPS (Expérience 1) et de la présence du plasma séminal et les interactions (Expérience 2).

2. Résultats

2.1. Expérience 1 (définition d'un modèle d'inflammation sub-clinique).

Le traitement intra-utérin avec du LPS n'a modifié de façon significative ni la température corporelle, ni le nombre total de leucocytes (Figure 1). Même au niveau des ovaires il n'y a pas de modifications particulières induites par ce traitement (Tableau 1).

La remontée des spermatozoïdes est significativement freinée par la lésion inflammatoire tant au niveau des cornes utérines ($P < 0.01$) que des oviductes ($P < 0.05$). La lésion inflammatoire est confirmée par l'examen histologique (Figure 2). En effet, le traitement avec du LPS a induit une augmentation du volume et du nombre des glandes utérines. Une hyperémie et une infiltration leucocytaire sont également mises en évidence.

Figure 1 – Courbe de la température corporelle (a) et de la concentration des leucocytes (b) (n=24)

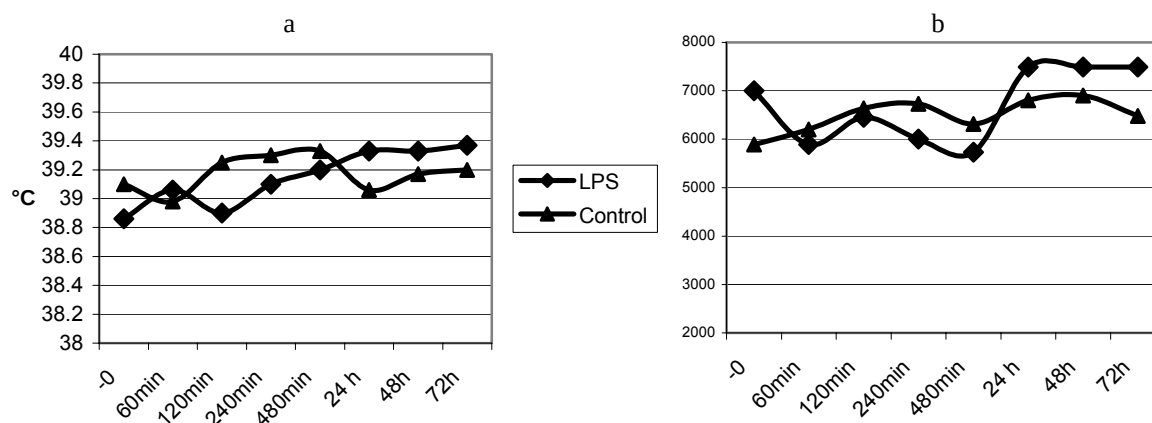


Tableau 1. Spermatozoïdes récupérés dans l'appareil génital et aspect des ovaires 12 h après l'IA (n=24)

		Témoin	LPS	DSE
Spermatozoïdes récupérés (%)				
Corne utérine	"	9.33 ^B	0.43 ^A	0.45
Oviducte	"	1.41 ^b	0.00 ^a	0.05
Aspect des ovaires				
Nombre de follicules préovulatoires	n.	5.4	5.1	0.8
Nombre de follicules ovulatoires	"	4.5	5.2	0.9
Nombre de follicules hémorragiques	"	0.2	0.4	0.2

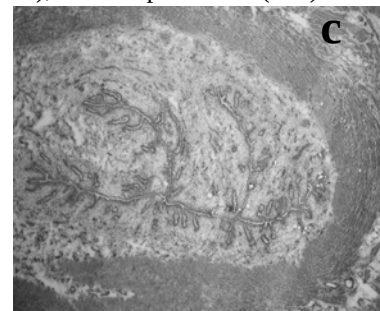
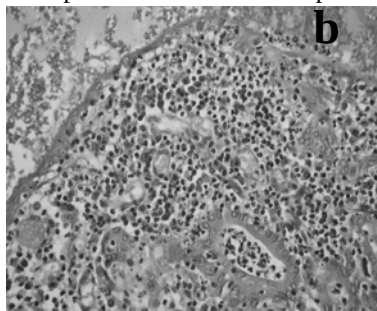
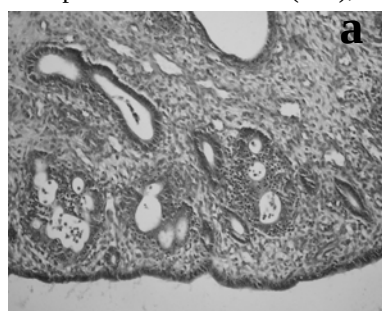
A..B: $P < 0.01$; a.b: $P \leq 0.05$

Figure 2 – Examen histologique de l'utérus

a: Lapine traitée avec LPS(20x);

b: Lapine avec endométrite spontanée(40x);

c: Lapine saine (20x).



2.2. Expérience 2 (évaluation du rôle du plasma séminal sur la remontée des spermatozoïdes)

Un effet positif du plasma séminal sur l'aptitude au déplacement des spermatozoïdes est mis en évidence. En effet, surtout chez les femelles traitées avec du LPS, le plasma séminal a déterminé une augmentation significative de la remontée des spermatozoïdes au niveau des cornes utérines. Cet effet n'est pas observé au niveau des oviductes, là où chez les même lapines les spermatozoïdes ne sont pas arrivés (Tableau 2).

3. Discussion

L'absence de symptômes évidents chez les lapines (fièvre, anorexie, prostration) démontre que le dosage employé et surtout la voie d'inoculation peuvent être en accord avec les objectifs préconisés. En effet, dans cette étude l'objectif était de créer un modèle d'étude comparable à celui des lapines qui ne présentent pas d'anomalies particulières visibles que l'éleveur peut relever, mais qui présentent une très faible fertilité. Au contraire, au cours de nos recherches précédentes (Castellini *et al.*, 2005), une administration intra-péritonéale de 100 µg/kg PV de LPS, a déterminé une augmentation de la sévérité de l'inflammation chez les femelles, surtout dans les premières 24-48 heures avec une augmentation significative de la température rectale tandis que la concentration des leucocytes a présenté une courbe biphasique. De même Yamashiro *et al.* (1993), à travers l'inoculation intra-veineuse de 5 µg/kg PV de LPS à des lapines, ont observé une brusque augmentation de la température corporelle

(d'environ 1°C/heure pendant 3 heures) avec une courbe leucocytaire identique à celle observée dans la précédente expérimentation (Castellini *et al.*, 2005).

Au niveau de l'utérus, même si les lésions étaient de faible intensité, par rapport à celles observées chez les lapines présentant une endométrite spontanée, le traitement a de même fortement influencé la remontée des spermatozoïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kaushik *et al.* (2004), qui ont observé chez des femelles de souris gestantes traitées avec du LPS une baisse du pourcentage d'implantation embryonnaire, due à l'infiltration massive leucocytaire, à la dégénération des glandes épithéliales et à l'hyperplasie utérine. Chez les lapines témoin, la remontée des spermatozoïdes a présenté des valeurs semblables à celles trouvées dans la littérature (Morton et Glover (1974). Chez les lapines, les lésions inflammatoires attirent les prostaglandines, probablement préviennent la régulière luthéolyse des corps jaunes, ce qui favorise le maintien d'une progestéronémie élevée (> 1 ng/ml) (Boiti *et al.*, 1999) et la diminution de la fertilité (Facchin *et al.*, 1999). La progestéronémie, observée les premiers jours après la mise-bas, pourrait être due à l'altération de la luthéolyse ou à des ovulations spontanées anormales (Theau-Clément *et al.*, 2000); chez les lapines non allaitantes. Les données bibliographiques (Facchin *et al.*, 1998) indiquent comme plus probable la première cause. Dans ce contexte il faut souligner le rôle de l'insémination artificielle et en particulier

Tableau 2: Effet du plasma séminal sur la remontée des spermatozoïdes (n=24)

	Témoin		LPS		SDE
	TALP	PS	TALP	PS	
Spermatozoïdes récupérés (%)					
Corne utérine	4.06 ^{ab}	6.59 ^b	2.62 ^a	5.93 ^b	1.58
Oviducte	1.32 ^b	1.71 ^b	0 ^a	0 ^a	0.05
Aspect des ovaires					
Nombre de follicules préovulatoires	5.2	5.3	5.0	5.2	0.5
Nombre de follicules ovulatoires	4.0	4.9	4.1	4.6	0.9
Nombre de follicules hémorragiques	0.3	0.1	0.5	0.4	0.1

a.b: P ≤ 0.05

celui du plasma séminal. En effet, une fois la semence inséminée dans le tractus génital de la femelle, quelques composants du liquide séminal (prostaglandine PGE₂) peuvent moduler la réponse immunitaire (Kelly, 1997). Plusieurs auteurs, (Mackler *et al.*, 2003; Katsuki *et al.*, 1997), constatent que les LPS augmentent l'activation de macrophages et la production de prostaglandines qui ont à leur tour provoquent les contractions utérines. Selon Rozeboom *et al.* (2000), les modifications de l'environnement utérin et la réabsorption des spermatozoïdes sont les causes principales de l'échec du transport de gamètes. Les PGE contrôlent les phénomènes immunodépresseurs à travers une répartition différente des cytokines (augmentation de l'IL-10, inhibition de la synthèse et réduction des IL-12, facteur stimulant des Natural Killer). Quand le rapport IL-10/IL-12 augmente, la concentration des PGE se réduit. Dans cette étude, l'inoculation intra-utérine a pu provoquer une inflammation sub-clinique sans provoquer de modifications substantielles des paramètres physiologiques de la lapine. Seul l'examen histologique a démontré les altérations inflammatoires, toutefois modérées, semblables à celles décrites chez les lapines avec endométrite, causées par des fécondations répétées, quand la réponse immunitaire de l'appareil reproducteur de la femelle est diminuée grâce à sa tolérance pour les spermatozoïdes considérés des antigènes. Si ce phénomène d'une part favorise les fonctions des spermatozoïdes, il crée d'autre part, les conditions nécessaires pour la diffusion de certaines maladies vénériennes. De même, au cours de l'infection, l'action immunodépresseuse du plasma séminal devient insuffisante pour la protection des spermatozoïdes (Kelly, 1997). En cas de lésions inflammatoires, il est possible que suite à l'insémination artificielle, il y ait une réabsorption excessive des spermatozoïdes par les leucocytes d'origine utérine (Rozeboom *et al.*, 2000) puisque le plasma est fortement dilué.

Conclusions

Des recherches ultérieures seront nécessaires pour vérifier l'effet de l'inflammation locale sur le fonctionnement de l'appareil génital de la lapine et sur les spermatozoïdes éjaculés. L'infection sub-clinique (latente) pourrait, en association avec d'autres facteurs, réduire la fertilité dans les élevages. Bien que modestes, les altérations observées sont probablement suffisantes pour empêcher ou freiner la remontée des spermatozoïdes sur le lieu de fécondation.

Remerciements:

Cette recherche a été financée par le MURST 40%.

Références

- BOITI, C., CANALI, C., BRECCHIA, G., ZANON, F., FACCHIN, E. 1999. Effects of induced endometritis on the life-span of corpora lutea in pseudopregnant rabbits and incidence of spontaneous uterine infections related to fertility of breeding does. *Theriogenology*. 52: 1123-1132.
- CASTELLINI C., DAL BOSCO A., MUGNAI C. 2003. Comparison of different reproductive protocols for rabbit doe: effect of litter size and re-mating interval. *Livest. Prod. Sci.*, 83: 131-139.
- CASTELLINI C., CARDINALI R., BRECCHIA G., DAL BOSCO A. 2005. Effect of LPS-induced inflammatory state on some aspects of reproductive function of rabbit does. *Proc. XVI ASPA Congress*, Torino, 532-534.
- FACCHIN E., CASTELLINI C., ZANON F., CANALI C., BOITI C. 1998. Infertilità della coniglia: effetto del trattamento associato alfaprostol + PMSG sulle performances riproduttive delle coniglie "ritorno". *Rivista di Zootecnica e Veterinaria* 26: 3-7.
- FACCHIN E., ZANON F., CASTELLINI C., BOITI C., 1999. Hypofertilità chez la lapine; étude sur les causes possibles et les traitements. 8^{èmes} J. Rech. Cun. 159-161.
- KATSUKI, Y., KAGA, N., KAKINUMA, C., TAKAGAKI, K., KAJIKAWA, S., SHIBUTANI, Y. 1997. Ability of intrauterine bacterial lipopolysaccharide to cause in situ uterine contractions in pregnant rabbits. *Acta Obs. Gyn. Scan.* 76: 26-32.
- KAUSHIK, D., CHATURVEDI, M., JAISWAL, K.A 2004. A "minimum dose" of lipopolysaccharide required for implantation failure: assessment of its effect on the maternal reproductive organs and interleukin-1 expression in the mouse. *Reproduction*. 1470-1626.
- MACKLER, A.M., DUCSAY, T.C., DUCSAY, C.A., YELLON, S.M. 2003. Effects of endotoxin and macrophage-related cytokines on the contractile activity of the gravide murine uterus. *Biol. Repr.* 69: 1165-1169.
- MORTON D.B., GLOVER T.D., 1974. Sperm transport in the female rabbit: the effect of inseminate volume and sperm density. *J. Reprod. Fertil.*, 38: 139-146.
- YAMASHIRO, O., MORIMOTO A., SAKATA, Y., WATANABE, T., MURAKANI, N., 1993. Febrile and metabolic tolerance to endotoxin and human recombinant interleukin-1 in rabbits. *Am. J. Physiol.* 33: R1180-1185.
- ROZEBOOM, K.J., TROEDSSON, M.H., HODSON, H.H., SHURSON, G.C., CRABO, B.G. 2000. The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. *J Anim Sci.* 78:443-448.
- THEAU-CLEMENT M., BOITI C., MERCIER P., FALIERES J., 2000. Description of the ovarian status and fertilising ability of primiparous rabbit does at different lactation stages. 7th World Rabbit Congress, A, 259-266.