

Etude des mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine par une approche comparative entre les modèles équin et porcine

Par :

▪ S Mugnier^{1,2,3,4}, S Boittin^{1,2,3,4}, S Canepa^{1,2,3,4}, B Delaleu^{1,2,3,4},
C Douet^{1,2,3,4}, G Duchamp⁵, M Kervella^{1,2,3,4}, C Lebos³, M
Magistrini^{1,2,3,4}, P Mermillod^{1,2,3,4}, P Monget^{1,2,3,4}, G Pascal^{1,2,3,4}, PY
Sizaret³, E Venturi⁵, G Goudet^{1,2,3,4}

▪ ¹INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des
Comportements, F-37380 Nouzilly;

²CNRS, UMR6175, F-37380 Nouzilly;

³Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours;

⁴Haras nationaux, F-37380 Nouzilly;

⁵INRA, UE1297 Unité Expérimentale de Physiologie Animale de
l'Orfrasière, F-37380 Nouzilly

Résumé

Dans l'espèce équine, les mécanismes de la fécondation sont mal connus. Afin de mieux les comprendre, nous avons développé une approche comparative entre l'espèce équine (faibles taux de fécondation *in vitro* : 0-60%) et l'espèce porcine (forts taux de fécondation *in vitro* : 90-95%). Notre but était d'identifier les différences et les similitudes entre ces deux modèles opposés afin de mettre en évidence des éléments clés de la fécondation.

Nous avons montré que 1) la zone pellucide de l'ovocyte est un élément clé dans l'interaction des gamètes, 2) sa composition et sa structure sont différentes entre les espèces équine et porcine, 3) chaque vertébré a son propre « jeu de protéines » permettant l'interaction des gamètes, 4) la bêta-1,4-galactosyltransferase n'est pas nécessaire pour cette interaction dans les espèces équine et porcine, contrairement aux bovins, 5) les sécrétions de l'oviducte participent aux mécanismes de la fécondation équine, mais les protéines impliquées ne sont pas encore identifiées.

Mots clés : ovocyte, spermatozoïde, fécondation, oviducte, zone pellucide

Summary

In equine species, the mechanisms of fertilization remain largely enigmatic. In order to clarify these mechanisms, we have developed a comparative strategy between equine (low *in vitro* fertilization rates: 0-60%) and porcine (high *in vitro* fertilization rates: 90-95%) species. Our objective was to identify differences and similarities between these two opposite models in order to highlight key components of fertilization.

We showed that 1) the zona pellucida is a determining element in gamete interaction, 2) its composition and its structure are different between equine and porcine species, 3) each vertebrate has its own protein-set involved in gamete interaction, 4) the beta-1,4-galactosyltransferase is not necessary for gamete interaction in the horse and the pig, contrary to the bovine, 5) the secretions of oviduct cells take part in the mechanism of equine fertilization, but the proteins involved remain to be identified.

Key-words: oocyte, spermatozoa, fertilization, oviduct, zona pellucida

Introduction

Dans les systèmes de reproduction sexuée, la fécondation est l'étape qui assure la création d'un embryon à partir de deux gamètes, mâle et femelle. La fécondation est donc l'aboutissement de la maturation des spermatozoïdes et des ovocytes et le point de départ du développement embryonnaire. C'est une étape clé de la fertilité et un point de départ critique pour la production d'un poulain en bonne santé. Afin de maîtriser la fertilité mâle et femelle et d'assurer une bonne gestion de la jument et de l'étalon, il est nécessaire de maîtriser cette étape et donc d'en connaître les mécanismes. Or, dans l'espèce équine, les mécanismes de la fécondation sont encore très mal connus. Notre objectif scientifique à long terme est d'améliorer la compréhension de ces mécanismes.

L'étude des mécanismes de la fécondation aura des applications pratiques :

1) Les travaux concernant la conservation de la semence montrent qu'il est indispensable de développer un outil pour évaluer *in vitro* la qualité du sperme, c'est-à-dire l'aptitude des spermatozoïdes à féconder un ovocyte. Les laboratoires qui tentent de développer cet outil se heurtent au manque de connaissances des mécanismes de la fécondation. L'étude de ces mécanismes est donc une étape incontournable pour mettre en place des tests *in vitro* de fertilité des gamètes mâles.

2) Les pertes embryonnaires précoces sont une cause importante d'infertilité. Elles sont dues en partie à des anomalies de fécondation au niveau de l'oviducte. Une meilleure connaissance des mécanismes de la fécondation permettra de comprendre l'origine de ces pertes embryonnaires précoces et ainsi de les limiter.

3) Les problèmes de subfertilité ou d'infertilité peuvent être liés, entre autres, à un problème de fécondation au niveau de l'oviducte. Une meilleure connaissance du rôle de l'oviducte permettra de mieux gérer les problèmes de subfertilité et d'infertilité.

4) Une bonne gestion des reproducteurs passe par une bonne connaissance de leur physiologie et des mécanismes impliqués dans la reproduction. Or, les mécanismes de la fécondation sont très mal connus dans l'espèce équine. Une meilleure connaissance de ces mécanismes permettra de mieux maîtriser cette étape et donc d'optimiser la gestion des reproducteurs.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de la fécondation, dans le cadre de la thèse de Sylvie Mugnier (soutenue le 12 novembre 2009, cofinancée Haras nationaux – Région Centre et intitulée « Etude des mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine par une approche comparative entre les modèles équin et porcine ») nous avons développé une approche comparative entre les espèces équine et porcine. En effet, les taux de fécondation *in vitro* équine sont inférieurs à 60% et peu de spermatozoïdes traversent la zone pellucide (ZP), une enveloppe glycoprotéique entourant l'ovocyte. Au contraire, chez les porcins, ces taux sont très élevés (90 à 95%) et beaucoup de spermatozoïdes traversent la ZP. La comparaison entre ces deux modèles opposés est une approche originale pour mettre en évidence des différences et des similitudes qui pourraient être des éléments clés dans les mécanismes de la fécondation.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont été présentés dans plusieurs congrès internationaux et réunions techniques et font l'objet de plusieurs articles scientifiques (Mugnier et al., 2008, *Reproductive Biology and Endocrinology* 6, 51. <http://www.rbej.com/content/6/1/51>; Mugnier et al., 2009, *Biology of Reproduction* 81, 856-870; Mugnier et al., 2009, *Reproductive Biology and Endocrinology* 7, 129. <http://www.rbej.com/content/7/1/129>). Les principaux résultats sont résumés ci-dessous.

1. Composition et structure de la zone pellucide

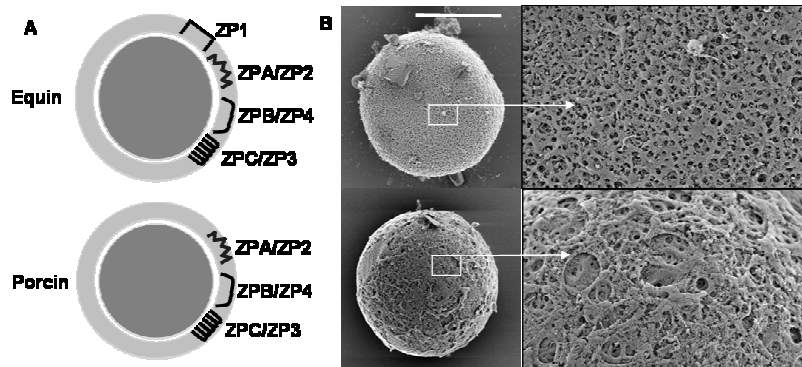
Nous avons comparé la compétence des gamètes équins et porcins au cours des étapes de la fécondation : 1) attachement des spermatozoïdes à la ZP des ovocytes, 2) réaction acrosomique des spermatozoïdes au contact de la ZP, 3) pénétration des spermatozoïdes à travers la ZP, 4) fusion des membranes du spermatozoïde et de l'ovocyte, 5) formation des pronoyaux mâle et femelle. Nos résultats ont montré que la ZP est un élément clé dans les mécanismes d'attachement et de pénétration des spermatozoïdes alors que la compétence des spermatozoïdes semble être un élément mineur. En revanche, la qualité des spermatozoïdes est un élément clé pour la réaction acrosomique.

Nous avons ensuite étudié la composition des ZP équine et porcine par des outils bioinformatiques, la localisation des glycoprotéines de la ZP par immunocytologie et microscopie confocale, et la structure de la ZP par microscopie électronique à transmission et à balayage. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des différences entre les ZP équine et porcine (figure I). Ils ont permis d'identifier la composition et la structure de la ZP équine, inconnues auparavant.

Figure I : A) Composition: la ZP équine contient 4 glycoprotéines, la ZP porcine en contient 3. B) Structure: la ZP équine a une structure compacte avec des petits pores, la ZP porcine a une structure en réseau avec de grands pores.

Observation en microscopie électronique à balayage au grossissement x750 et x3000.

Figure I: A) Composition: the equine ZP contains 4 glycoproteins, the porcine ZP contains 3. B) Structure: the equine ZP shows a compact structure with small pores, the porcine ZP shows a mesh-like structure with large pores. Observation by scanning electron microscopy at magnification x750 and x3000.



2. Identification des protéines impliquées dans la fécondation

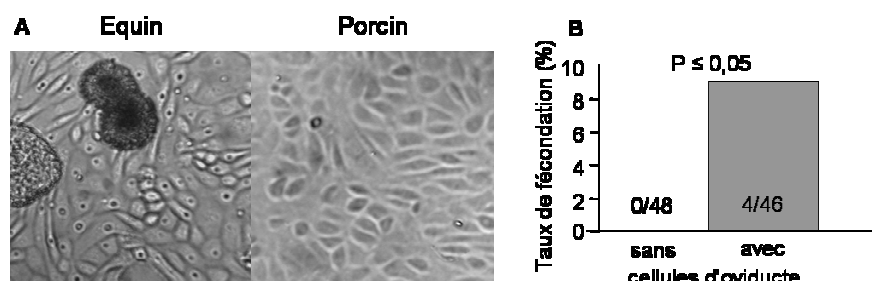
A l'aide d'outils bioinformatiques, nous avons identifié les protéines impliquées dans l'interaction des gamètes et présentes sur la ZP et sur les membranes des spermatozoïdes et des ovocytes pour 12 espèces dont le génome est séquencé, dont le cheval et le porc. Nous avons montré que chaque espèce semble avoir son propre « jeu de protéines » impliquées dans la fécondation. Nous avons identifié sur les gamètes équins des protéines présentes chez tous les mammifères, mais aussi des protéines exprimées chez quelques espèces seulement. Une étude plus approfondie de l'un de ces jeux de protéines a montré que l'enzyme bêta-1,4-galactosyltransférase, qui joue un rôle dans l'attachement des spermatozoïdes sur la ZP chez la souris et la vache, n'est pas nécessaire chez la jument et la truie.

3. Rôle de l'oviducte dans la fécondation

Afin de clarifier le rôle de l'oviducte dans le mécanisme de la fécondation, nous avons montré que les sécrétions des cellules d'oviducte équin et porcine participent aux mécanismes de la fécondation équine. Pour cela, nous avons montré que la présence de cellules d'oviducte lors de co-incubations *in vitro* de gamètes équins améliore les taux de fécondation (0% en l'absence de cellules d'oviducte, 9% en présence de cellules d'oviducte, figure II), mais ces taux restent faibles.

Figure II : A) Cultures de cellules d'oviductes équines et porcines observées en microscopie, grossissement x400. B) Pourcentage d'ovocytes fécondés après co-incubation d'ovocytes et de spermatozoïdes équins avec ou sans cellules d'oviductes porcines en culture.

Figure II: A) Equine and porcine cell monolayers observed by microscopy, magnification x400. B) Percentage of fertilized oocytes after equine oocytes and spermatozoa co-incubation with or without porcine oviductal cells.



Pour identifier les molécules sécrétées par l'oviducte et responsables de cette action, nous avons étudié 3 molécules qui jouent un rôle dans la fécondation chez les porcins, bovins et humains. Nous avons montré que 1) le gène codant pour l'oviductine a probablement subi des mutations entraînant la perte de la protéine dans l'espèce équine, 2) les gènes codant pour l'ostéopontine et l'ANP A sont présents dans le génome équin, ces deux protéines ont été identifiées dans le fluide d'oviducte équin, mais leur rôle dans la fécondation n'a pas pu être démontré dans nos conditions.

Conclusion

Ce travail de thèse a permis de clarifier les mécanismes de la fécondation chez les équins au niveau de la composition et de la structure de la zone pellucide des ovocytes, des protéines du spermatozoïde et de l'ovocyte impliquées dans l'interaction des gamètes, et du rôle joué par les sécrétions de l'oviducte dans la fécondation.