

Rôle des cellules d'oviducte dans la fécondation équine et identification des protéines impliquées

Par :

- B Ambruosi¹³⁴⁵, S Mugnier¹³⁴⁵, C Douet¹³⁴⁵, G Pascal¹³⁴⁵, G Duchamp², E Venturi², G Goudet¹³⁴⁵
- ¹INRA, UMR 85, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, France
²INRA, Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière, 37380 Nouzilly, France
³CNRS, UMR 6175, 37380 Nouzilly, France
⁴Université François Rabelais, 37380 Tours, France
⁵IFCE, 37380 Nouzilly, France

Résumé

Notre objectif est de mieux connaître les mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine, en particulier le rôle des sécrétions de l'oviducte et les molécules impliquées. Nous avons d'abord co-incubé des ovocytes après maturation *in vitro* et des spermatozoïdes traités à l'ionophore calcique avec ou sans cellules d'oviductes porcins ou équins collectés 6 heures après ovulation. Les taux de fécondation sont plus élevés en présence de cellules d'oviducte qu'en absence de cellules, et ils ne sont pas différents en présence de cellules porcines ou équines. Nous avons ensuite co-incubé *in vitro* des ovocytes et des spermatozoïdes traités à la procaine en présence ou en absence de fluide ou de cellules d'oviductes porcins. La présence de cellules d'oviductes n'a pas d'effet sur les taux de fécondation. Par contre, la présence de fluide d'oviducte améliore significativement ces taux. Enfin, nous avons étudié des molécules potentiellement impliquées et nous avons montré que le gène de l'OGP a disparu au cours de l'évolution du génome équin, l'ANP A n'a pas d'effet sur la fécondation équine, l'osteopontine augmente les taux de fécondation de manière non significative, et DMBT1 pourrait avoir un effet significatif sur la fécondation.

Mots clés : ovocyte, spermatozoïde, fécondation, oviducte

Summary

Our aim is to clarify the mechanisms of fertilization in the equine, especially the role of oviductal secretions and the molecules involved. First, we co-incubated *in vitro* matured oocytes and spermatozoa treated with calcium ionophore with or without epithelial cells from equine or porcine oviducts collected 6 hours after ovulation. The presence of oviductal cells increases the fertilization rates. The fertilization rates were not significantly different between gametes co-incubated with equine vs porcine oviductal cells. Then, we co-incubated *in vitro* matured oocytes and spermatozoa treated with procaine with or without fluid or epithelial cells from porcine oviducts. The presence of oviductal cells has no effect on the fertilization rates, but the presence of oviductal fluid significantly increases the fertilization rates. Finally, we studied molecules that could be involved and we showed that the gene coding for OGP has become a pseudogene during evolution of horse genome, ANP A has no effect on equine fertilization, osteopontin increases the fertilization rates though the effect is not significant, and DMBT1 may have a significant effect on fertilization.

Key-words: oocyte, spermatozoa, fertilization, oviduct

Introduction

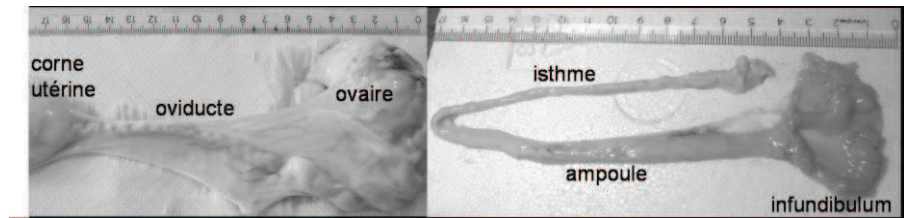
La fécondation est une étape clef de la fertilité car c'est le point de départ du développement embryonnaire et une étape critique pour la production d'un poulain en bonne santé. Il est donc nécessaire de maîtriser cette étape et d'en connaître les mécanismes. Notre objectif est d'améliorer la connaissance des mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine.

Une meilleure connaissance de ces mécanismes permettra d'optimiser la gestion des reproducteurs en maîtrisant les mécanismes impliqués dans la reproduction, de mieux gérer les problèmes de subfertilité et d'infertilité liés à un défaut de fécondation, de mieux comprendre l'origine des pertes embryonnaires précoces dues à des anomalies de fécondation, et ainsi les limiter. Ceci contribuera à optimiser les résultats techniques des exploitations. De plus, l'étude des mécanismes de la fécondation favorise le développement d'une technique efficace et répétable de fécondation et développement *in vitro*. Cette technique permettra de mettre au point un test *in vitro* de fertilité des gamètes mâles pour évaluer la qualité du sperme. Elle permettra aussi de produire un grand nombre de jeunes embryons équins utilisables pour la recherche, notamment concernant la congélation des embryons équins.

In vivo, la fécondation a lieu dans l'oviducte, un conduit sinueux reliant l'ovaire à l'utérus. Il est formé de 3 parties : l'infundibulum qui capte l'ovocyte lors de l'ovulation, l'ampoule où a lieu la fécondation, et l'isthme assurant le transport et le stockage des spermatozoïdes (figure I).

Figure I : photos d'un oviducte équin avant et après dissection

Figure I: photos of an equine oviduct before and after dissection



L'étude des mécanismes de la fécondation est difficilement réalisable *in vivo*, à moins de prélever des oviductes au moment de la fécondation par chirurgie ou après euthanasie. Pour des raisons éthiques et financières, l'approche *in vitro* est préférable. Des techniques de fécondation *in vitro* ont été développées. Elles permettent d'obtenir des fécondations, mais les taux de succès sont très faibles. La plupart des scientifiques obtiennent au maximum 30% d'ovocytes fécondés (Palmer *et al.* 1991 ; Dell'Aquila *et al.* 1996 ; Alm *et al.* 2001). Une technique permettant d'atteindre 60% de fécondation a été publiée, mais ces résultats n'ont pas pu être répétés (McPartlin *et al.* 2009). *In vitro*, les faibles taux de fécondation pourraient être dus à l'absence d'un environnement adéquat autour des gamètes. Ceci permet d'émettre l'hypothèse d'un rôle de l'oviducte dans les mécanismes de la fécondation.

Quelques molécules, exprimées dans l'oviducte et jouant un rôle dans la fécondation, ont déjà été identifiées chez d'autres mammifères : OGP (oviduct specific glycoprotein ; McCauley *et al.* 2003), osteopontine (Hao *et al.* 2006), Atrial Natriuretic Peptide A (ANP A ; Zhang *et al.* 2006). Leur rôle dans la fécondation équine n'a jamais été étudié. De plus, DMBT1 (Deleted in Malignant Brain Tumour 1) pourrait jouer un rôle dans la fécondation (Ligtenberg *et al.* 2010) mais aucune étude n'a été réalisée jusqu'à maintenant.

Afin de vérifier l'hypothèse d'un rôle de l'oviducte dans les mécanismes de la fécondation et d'identifier les molécules responsables, nous avons réalisé plusieurs études résumées dans cet article.

1. Matériel et méthodes

1.1. Collecte du fluide et des cellules d'oviducte

Le fluide et les cellules ont été collectés sur des oviductes équins et porcins. En effet, il est financièrement difficile de collecter un grand nombre d'oviductes équins à un stade précis du cycle, contrairement à une espèce de rente comme le porc. Nous voulions donc vérifier si les oviductes porcins donnaient des résultats similaires aux oviductes équins.

Les oviductes équins et porcins ont été collectés sur des femelles cycliques de l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière (UEPAO) de l'INRA de Nouzilly. Les femelles ont été abattues 6 heures après l'ovulation comme décrit par Mugnier et collaborateurs (2009). Les oviductes ont été disséqués afin de conserver uniquement l'ampoule, et grattés à l'aide d'une lame pour pousser le contenu de l'oviducte à l'extérieur. Ce dernier a été aspiré à l'aide d'une pipette puis centrifugé. Le fluide d'oviducte a été récupéré dans le surnageant et stocké à -20°C. Les cellules d'oviducte ont été récupérées dans le culot et mises en culture *in vitro* dans un milieu adapté (Tissue Culture Medium 199 + 10% de sérum de veau fœtal + 40µg/ml de gentamycine) pendant 1 ou 7 jours.

1.2. Préparation des gamètes

Les ovaires équins ont été collectés sur des femelles abattues dans des abattoirs commerciaux. Les ovocytes ont été récupérés par aspiration et placés dans un milieu de culture *in vitro* (Tissue Culture Medium 199 + 20% de sérum de veau fœtal + 50ng/ml d'Epidermal Growth Factor) pendant 30 heures à 38,5°C comme décrit par Mugnier et collaborateurs (2009). Après maturation *in vitro*, les cellules du cumulus entourant l'ovocyte ont été enlevées partiellement par des pipetages successifs. Le sperme équin a été collecté sur deux étalons de l'unité expérimentale de l'INRA de Nouzilly et soumis à un traitement à l'ionophore calcique (Palmer *et al.* 1991) ou à la procaine (Mac Partlin *et al.* 2009).

1.3. Fécondation *in vitro*

Dans l'expérience 1, les ovocytes ont été pré-incubés en présence ou en absence de cellules d'oviductes équins ou porcins pendant 2 heures. Les spermatozoïdes traités à l'ionophore calcique ont été ajoutés à la concentration finale de $2,5 \times 10^6$ /ml et les gamètes ont été co-incubés pendant 24 heures.

Dans l'expérience 2, les ovocytes ont été pré-incubés en présence ou en absence de fluide ou de cellules d'oviductes porcins pendant 30 minutes. Ils ont ensuite été placés dans le milieu contenant les spermatozoïdes (1×10^6 /ml) traités à la procaine. Les gamètes ont été co-incubés pendant 24 heures.

Dans l'expérience 3, nous avons étudié le rôle de l'OGP, l'osteopontine, l'ANP A et DMBT1. Les ovocytes ont été pré-incubés 1) en présence ou en absence d'osteopontine bovine purifiée ou d'ANP humain synthétique pendant 2 heures puis les spermatozoïdes traités à l'ionophore calcique ont été ajoutés, 2) en présence de fluide d'oviducte porcin avec ou sans anticorps anti-DMBT1 pendant 30 minutes puis les ovocytes ont été mis en présence des spermatozoïdes traités à la procaine. Les gamètes ont été co-incubés pendant 24 heures.

Les ovocytes ont ensuite été fixés dans du paraformaldehyde et l'ADN a été marqué afin d'observer la présence d'un pronoyau femelle et d'un pronoyau mâle, signe d'une fécondation, ou de plusieurs pronoyaux mâles, signe de polyspermie. Les pourcentages de fécondation et de polyspermie ont été comparés par le test Chi2. Les différences ont été considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

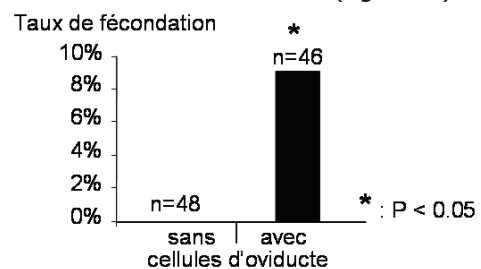
2. Résultats

2.1. Expérience 1

Les ovocytes ont d'abord été pré-incubés en présence ou en absence de cellules d'oviductes porcins pendant 2 heures. La pré-incubation améliore significativement les taux de fécondation (figure II).

Figure II : Taux de fécondation des ovocytes équins pré-incubés en présence ou en absence de cellules d'oviducte porcin (n=nombre d'ovocytes)

Figure II: fertilization rates of equine oocytes pre-incubated with or without porcine oviductal cells



Les ovocytes ont ensuite été pré-incubés en présence de cellules d'oviductes équins ou porcins. Nous n'avons pas observé de différence des taux de fécondation entre les cellules équines et porcines. Nous avons enfin comparé l'influence de cellules d'oviductes cultivées *in vitro* pendant 1 jour ou 7 jours, et nous n'avons pas observé de différence des taux de fécondation.

2.2. Expérience 2

Dans cette expérience, les ovocytes équins ont été pré-incubés en présence ou en absence de fluide ou de cellules d'oviductes porcins pendant 30 minutes. Nos résultats ont montré que dans ces conditions, la présence de cellules d'oviductes porcins n'a pas d'effet sur les taux de fécondation. Par contre, la présence de fluide d'oviducte améliore significativement les taux de fécondation (figure III).

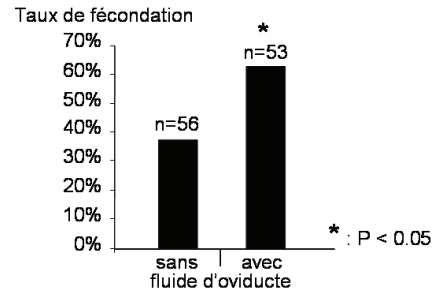
2.3. Expérience 3

Nous avons d'abord vérifié la présence des gènes codant l'OGP, l'osteopontine, l'ANP A et DMBT1 dans le génome équin et la présence de ces protéines dans le fluide d'oviducte équin comme décrit par

Mugnier et collaborateurs (2009). Nous avons ainsi identifié les gènes codant l'ostéopontine, l'ANP A et DMBT1 et nous avons montré leur expression dans l'oviducte équin. Nous avons montré que le gène codant l'OGP a subi des mutations au cours de l'évolution empêchant la synthèse de cette protéine.

Figure III : Taux de fécondation des ovocytes équins pré-incubés en présence ou en absence de fluide d'oviducte porcine (n=nombre d'ovocytes)

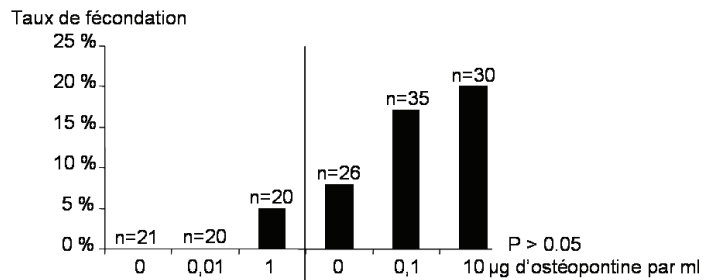
Figure III: fertilization rates of equine oocytes pre-incubated with or without porcine oviductal fluid



Ensuite, les ovocytes ont été pré-incubés en présence ou en absence d'ostéopontine ou d'ANP A pendant 2 heures. Nous n'avons pas observé de différence des taux de fécondation en présence ou en absence d'ANP A. Les taux de fécondation semblent plus élevés en présence d'ostéopontine mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence (figure IV).

Figure IV : Taux de fécondation des ovocytes équins pré-incubés avec différentes concentrations d'ostéopontine (n=nombre d'ovocytes)

Figure IV: fertilization rates of equine oocytes pre-incubated with several concentrations of osteopontin



Enfin, les ovocytes ont été pré-incubés en présence de fluide d'oviducte avec ou sans anticorps anti-DMBT1 puis mis en présence des spermatozoïdes. La présence de fluide d'oviducte améliore les taux de fécondation, mais la présence de l'anticorps annule cet effet positif. DMBT1 pourrait donc être impliqué dans les mécanismes de la fécondation équine.

Conclusion

Dans les différentes conditions testées, nous avons observé un effet bénéfique du fluide ou des cellules d'oviducte sur la fécondation équine. Les molécules impliquées n'ont pas été identifiées mais DMBT1 pourrait jouer un rôle. Des études sont en cours pour confirmer ce résultat.

Références

- Alm et al. 2001. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes. *Theriogenology* 56, 817-829
- Dell'Aquila et al. 1996. *In vitro* maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology* 45, 547-560
- Hao et al. 2006. Osteopontin reduces polyspermy during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *Biol Reprod* 75, 726-733
- Ligtenberg et al. 2010. Deleted in Malignant Brain Tumors-1 protein (DMBT1): a pattern recognition receptors with multiple binding sites. *Int J Mol Sci* 11, 5212-5233
- McCauley et al. 2003. Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 69, 828-834
- McPartlin et al. 2009. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful *in vitro* fertilization of equine oocytes. *Biol Reprod* 81, 199-206
- Mugnier et al. 2009. The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine *in vitro* fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reprod Biol Endocrinol* 7, 129
- Palmer et al. 1991. *In vitro* fertilization in horse, a retrospective study. *J Reprod Fertil suppl* 44, 375-384
- Zhang et al. 2006. The expression of atrial natriuretic peptide in the oviduct and its functions in pig spermatozoa. *J endocrinol* 189, 493-507