



Mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine : approche comparée entre les modèles équin et porcin

Sylvie Mugnier

► To cite this version:

Sylvie Mugnier. Mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine : approche comparée entre les modèles équin et porcin. Sciences du Vivant [q-bio]. Université François Rabelais (Tours), 2009. Français. NNT : . tel-02317715v1

HAL Id: tel-02317715

<https://hal.inrae.fr/tel-02317715v1>

Submitted on 6 Jun 2020 (v1), last revised 16 Oct 2019 (v2)

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.

Copyright

ÉCOLE DOCTORALE SST

UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, Nouzilly

THÈSE présentée par :

Sylvie MUGNIER

soutenue le : **12 novembre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : **Sciences de la vie/ Biologie de la Reproduction**

**MÉCANISMES DE LA FÉCONDATION
DANS L'ESPÈCE ÉQUINE :**

Approche comparée entre les modèles équin et porcin

THÈSE dirigée par :

Mme GOUDET-GUITTON Ghylène Ingénieur de Recherche, HDR, INRA, Nouzilly

RAPPORTEURS :

Mme CHASTANT Sylvie
M. MARNET Pierre-Guy

Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort
Professeur, Agrocampus-Ouest, Rennes

JURY :

Mme CHASTANT Sylvie
Mme CLÉMENT Françoise
Mme GOUDET-GUITTON Ghylène
M. MARNET Pierre-Guy
M. ROYÈRE Dominique
M. WOLF Jean-Philippe

Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort
Docteur, Haras Nationaux, Arnac Pompadour
Ingénieur de Recherche, HDR, INRA, Nouzilly
Professeur, Agrocampus-Ouest, Rennes
Professeur, Université François Rabelais, Tours
Professeur, Université Paris Descartes, Paris

Je dédie cette thèse
à mes parents,
à mes frères et mes belles-sœurs,
à mes neveux et nièces

Remerciements

Cette étude a été réalisée dans l'unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Nouzilly, dans l'équipe «Follicule, Ovocyte, et Développement».

Je tiens à remercier sincèrement :

M. Dominique Royère, Mme Sylvie Chastant, Mme Françoise Clément, M. Pierre-Guy Marnet, M. Jean-Philippe Wolf qui ont accepté d'être membres de mon jury.

M. Philippe Chemineau, M. Benoît Malpaux et M. Pascal Mermillod qui m'ont acceptée au sein de l'INRA.

Les Haras Nationaux et la Région Centre pour le financement de ma thèse.

Les membres de mon comité de thèse qui m'ont conseillée et ont suivi mes travaux.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse Mme Ghylène Goudet-Guitton pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa confiance, sa patience, ses conseils et l'efficacité de son encadrement.

Je tiens à remercier M. Philippe Monget pour ses conseils et pour m'avoir initiée à la bioinformatique et à « l'évolution des gènes ».

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements à celles et ceux qui :

- ont su guider ma réflexion et m'ont écoutée, critiquée, conseillée,
- m'ont accueillie dans leur laboratoire en France et en Italie pour me faire découvrir de nouvelles techniques et thématiques,
- m'ont aidée et/ou ont participé à la réalisation des différents projets,
- se sont levés tôt pour aller dans les abattoirs et ont permis la collecte des ovaires et oviductes indispensables,
- ont pris soin des étalons, ponettes et truies,
- ont préparé, lavé, rincé, rangé, stérilisé le matériel,
- m'ont aidée en informatique et statistiques,
- ont lu, relu, corrigé et recorrecté, m'ont soutenue et encouragée et ont rendu mon travail agréable,
- m'ont permis d'arriver jusqu'en thèse par leur confiance, leur enseignement, et leurs conseils.

Merci à ma famille et mes amis pour leur présence et leur soutien tout au long de cette thèse.

Résumé

Les mécanismes de la fécondation sont encore mal connus chez les mammifères, et dans l'espèce équine en particulier. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, nous avons développé une approche comparative entre les modèles équin et porcin. En effet, les taux de fécondation *in vitro* (FIV) équine sont inférieurs à 60% et peu de spermatozoïdes traversent la zone pellucide. Au contraire, les taux de FIV porcine sont très élevés (80 à 90%) et beaucoup de spermatozoïdes traversent la zone pellucide. La comparaison entre ces deux espèces pourrait mettre en évidence des différences et/ou des similitudes dans les mécanismes de la fécondation qui seraient des éléments clés de la fécondation.

Nous avons comparé la compétence des gamètes équins et porcins pour 1) l'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide des ovocytes 2) la réaction acrosomique 3) la pénétration à travers la zone pellucide, 4) la fusion de l'oolemma et des membranes du spermatozoïde et 5) la décondensation et l'activation, en utilisant la FIV hétérologue et homologue. Nos résultats ont montré que la zone pellucide 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. Au contraire, la qualité des spermatozoïdes est un élément clé pour la réaction acrosomique. Nos résultats ont montré que le nombre et la localisation des glycoprotéines de la zone pellucide ainsi que la structure de la zone pellucide sont différents entre les espèces équine et porcine.

A partir des protéines dont le rôle dans l'interaction des gamètes a été montré expérimentalement chez une espèce, nous avons réalisé une étude phylogénétique. Cette étude a permis de lister l'ensemble des protéines impliquées dans l'interaction gamétique, présentes sur la zone pellucide, l'oolemma et les membranes des spermatozoïdes chez douze vertébrés (entre autres les espèces équines et porcines), dont le génome est séquencé. Nos résultats ont montré que chez les mammifères, chaque espèce semble avoir sa propre composition en protéines et son propre «jeu de protéines» impliquées dans la fécondation.

Une étude plus approfondie de l'un de ces jeux de protéines a montré que l'enzyme β -1,4-galactosyltransférase qui joue un rôle dans l'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide chez la souris et la vache, ne semble pas nécessaire pour cette étape de la fécondation chez la jument et la truie.

Afin de clarifier le rôle dans la fécondation des molécules sécrétées par l'oviducte, nous avons montré que les sécrétions des cellules d'oviducte équin et porcine améliorent les taux de FIV équine. Les molécules sécrétées par ces cellules participent donc aux mécanismes de la fécondation équine. Dans l'espèce porcine, l'oviductine, l'ostéopontine et l'ANP A, trois protéines sécrétées par l'oviducte, améliorent les taux de FIV et jouent un rôle dans le mécanisme de la fécondation. Nos résultats ont montré que le gène codant pour l'oviductine n'est pas présent dans le génome équin. L'ostéopontine et l'ANP A sont présentes dans le fluide d'oviducte équin mais ne semblent pas améliorer les taux de FIV équine dans nos conditions expérimentales. Les molécules de l'oviducte impliquées dans le mécanisme de la fécondation dans l'espèce équine restent donc encore à identifier.

En conclusion, cette approche comparative entre les espèces équine et porcine a permis de mettre en évidence de nouveaux éléments dans les mécanismes de la fécondation chez les équins, mais également chez les mammifères. Elle a ouvert de nouvelles pistes pour l'amélioration de la technique de FIV équine.

Mots-clés : Ovocyte, spermatozoïde, Cellule d'oviducte, interaction gamétique, étapes de la fécondation, zone pellucide, FIV, gènes de la reproduction, β -1,4-galactosyltransférase, N-acétylglucosamine, oviductine, osteopontine, ANP A

Abstract

The mechanisms of fertilization remain largely enigmatic in mammals and particularly in equine species. In order to clarify these mechanisms, we developed a comparative strategy between equine and porcine models. In the horse, *in vitro* fertilization (IVF) rates are lower than 60% and few spermatozoa penetrate the zona pellucida. In contrast, in the pig, IVF rates are higher than 80% and many spermatozoa penetrate the zona pellucida. The identification of divergences between these two models could allow us to highlight key components in the mechanism of fertilization.

We compared the ability of equine and porcine gametes for 1) ZP binding, 2) acrosome reaction, 3) penetration through the zona pellucida, 4) gametes fusion, 5) pronucleus formation, using intraspecific and interspecific *in vitro* fertilization. We showed that the zona pellucida is a determining element in sperm-zona pellucida attachment and penetration, whereas the capacity of the spermatozoa is of less importance. In contrast, the capacity of the spermatozoa is a key component of the acrosome reaction step. Then, we showed that the number and localization of zona pellucida glycoproteins and the structure of the zona pellucida are different between equine and porcine species.

Using proteins which were experimentally shown to take part in gamete interaction at least in one species, we performed a phylogenetic analysis. This study allowed us to establish a list of proteins involved in gamete interactions and localised on zona pellucida, oolemma or sperm membranes in whole sequenced genome of twelve species including equine and porcine. We showed that in mammals, each species has its own protein-set involved in sperm-oocyte interaction.

Following that, we studied one of these proteins, the β -1,4-galactosyltransferase. We showed that this enzyme, which plays a role in sperm-zona pellucida binding in mouse and bovine, does not seem to be necessary for this step of fertilization in equine and porcine.

In order to clarify the role of oviductal molecules in fertilization, we showed that the secretions of equine or porcine oviduct cells improve the equine IVF rates. Thus, oviductal molecules take part in the mechanism of fertilization. In porcine, three oviductal proteins, oviductin, osteopontin and ANP A have been shown to improve IVF rates and take part in the mechanisms of fertilization. Our results showed that the gene encoding oviductin is not present in the equine genome. We showed that osteopontin and ANP A are present in the

equine oviductal fluid but do not seem to improve the equine IVF rates in our experimental conditions. The oviductal molecules involved in the mechanisms of fertilization in equine species remained to be identified.

In conclusion, this comparative approach between the pig and the horse has revealed new determining elements to understand the mechanisms of fertilization in equine species, but also in mammal. This approach leads to new directions to improve the equine IVF techniques.

Keywords : Oocyte, spermatozoa, Oviduct cells, Gamete interaction, IVF, steps of fertilization, zona pellucida, reproductive genes, β -1,4-galactosyltransferase, N-acetylglucosamine, oviductin, osteopontin, ANP A

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	4
Abstract	6
Table des matières	8
Introduction	10
1. Fécondation <i>in vivo</i> dans l'espèce équine : Etat des connaissances.....	13
1.1. Maturation des ovocytes.....	14
1.1.1. Description de l'ovocyte mature	14
1.1.2. Modifications des cellules du cumulus	14
1.1.3. Modifications nucléaires	15
1.1.4. Modifications cytoplasmiques.....	15
1.1.5. Modifications de l'ovocyte dans l'oviducte	16
1.2. Préparation des spermatozoïdes	17
1.2.1. Description d'un spermatozoïde.....	17
1.2.2. Mécanismes de la capacitation chez les mammifères	17
1.2.3. Rôle de l'oviducte dans la préparation des spermatozoïdes.....	18
1.3. Etapes de la fécondation.....	19
1.3.1. Traversée du cumulus par les spermatozoïdes	19
1.3.2. Attachement des spermatozoïdes sur la zone pellucide de l'ovocyte	20
1.3.3. Induction de la réaction acrosomique.....	21
1.3.4. Pénétration de la zone pellucide.....	22
1.3.5. Fusion des gamètes.....	22
1.3.6. Formation des pronoyaux mâle et femelle	23
2. Fécondation <i>in vitro</i> dans l'espèce équine	25
2.1. Maturation de l'ovocyte	25
2.1.1. Maturation <i>in vivo</i>	25
2.1.2. Maturation <i>in vitro</i>	26
2.2. Préparation des spermatozoïdes	26
2.3. Co-incubation des gamètes dans le milieu de fécondation	28
3. Conclusion.....	30
Objectif de l'étude.....	31
Première partie : Approche mécanique	34

Article 1	35
Deuxième partie : Approches évolutive et moléculaire	56
Article 2	57
Article 3	72
Article 4	102
Article 5	136
Discussion et conclusions générales	141
Bibliographie	149
Annexe	163
Résumé	168
Abstract	168

Introduction

En France, les travaux de recherche dans l'espèce équine ont commencé à se développer réellement au milieu des années 1970, en particulier par la mise en place d'un programme commun à l'INRA et aux Haras Nationaux. Les recherches se sont axées en partie sur la reproduction, dont l'objectif était d'augmenter le nombre de poulains par jument et d'intensifier la sélection. Dans ce cadre, certaines études ont porté sur les techniques de procréation assistée. A l'heure actuelle, l'insémination artificielle, le transfert embryonnaire et la congélation des spermatozoïdes sont des techniques disponibles sur le terrain. La cryoconservation des embryons équins n'est pas suffisamment maîtrisée pour être considérée comme une technique de routine. La technique de fécondation *in vitro* (FIV) est encore à l'état de recherche. Cette technique consiste à co-incuber des spermatozoïdes avec des ovocytes dans un milieu favorisant la fécondation et les premiers stades de développement embryonnaire. Elle aurait plusieurs applications susceptibles d'améliorer la conduite de l'élevage équin.

La technique de FIV permettrait de reproduire des animaux subfertiles : étalons qui ont une semence peu concentrée en spermatozoïdes ou une forte proportion de spermatozoïdes anormaux, juments qui n'ovulent pas à cause d'une lutéinisation précoce du follicule (il se remplit de sang et de fibrine sans ovuler). En effet, on estime à 8% le nombre d'étalons subfertiles (Clément, 1995), et à 5% le taux de lutéinisation (Ginther et Pierson, 1989).

Par ailleurs, la technique de FIV serait un test pour évaluer la qualité des spermatozoïdes, c'est-à-dire leur aptitude à féconder un ovocyte. Elle permettrait d'évaluer la qualité des spermatozoïdes après leur conservation (à 4°C, à 15°C ou dans l'azote liquide) et faciliterait l'amélioration des techniques de conservation de la semence. Ces dernières permettent de différer dans le temps et dans l'espace la reproduction des étalons et donc d'améliorer la conduite d'élevage.

De même, la technique de FIV pourrait être utilisée pour évaluer la compétence des ovocytes à être fécondés par un spermatozoïde. Ainsi, elle servirait de test pour évaluer la qualité des ovocytes après leur conservation (à 4°C ou dans l'azote liquide) et permettrait la mise au point de techniques de conservation des ovocytes. Ceci donnerait la possibilité de constituer un stock d'ovocytes pour tester la qualité du sperme et de différer dans le temps et dans l'espace la reproduction des juments de compétition.

Enfin, la technique de FIV permettrait l'étude des mécanismes de la fécondation. Chez la jument, la fécondation *in vivo* et le développement embryonnaire précoce ont lieu dans l'oviducte entre 6 et 12 heures après ovulation. Les techniques pour les étudier sont donc très invasives et difficiles d'un point de vue économique et éthique. La technique de FIV permet d'observer la fécondation *ex vivo*, et par conséquent, d'accéder facilement aux différentes étapes de la fécondation pour les étudier *in vitro*. Une meilleure connaissance des mécanismes de la fécondation permettrait d'identifier et d'étudier les anomalies de la fécondation afin de les corriger. En effet, certaines anomalies de fécondation peuvent induire des pertes embryonnaires précoces. Dans les élevages, les pertes embryonnaires précoces détectées par l'absence d'embryon dans l'oviducte ou l'utérus sont une cause importante d'infertilité, puisqu'elles peuvent atteindre 9% dans les 15 premiers jours de gestation (Ball, 1988). Chez la jument âgée et/ou subfertile, le taux de pertes embryonnaires peut atteindre 60 à 70% dans les 15 premiers jours.

Cependant, dans l'espèce équine, aucune technique de FIV n'est efficace et les bons taux de FIV obtenus auparavant avec ces techniques ne peuvent être répétés. Les travaux concernant la mise au point de la FIV se heurtent à un manque de connaissances sur les mécanismes de la fécondation. Une meilleure connaissance de ces mécanismes facilitera la mise au point d'une technique de FIV efficace.

Dans une première partie, nous ferons un bilan des connaissances sur les mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine. Dans une deuxième partie, nous décrirons les différentes techniques de FIV qui ont été testées.

1. Fécondation *in vivo* dans l'espèce équine : Etat des connaissances

Chez les mammifères, la fécondation est le processus de fusion d'un ovocyte et d'un spermatozoïde d'où naîtra un nouvel individu muni des potentialités génétiques des deux parents. Elle se déroule en cinq étapes (Yanagimachi *et al.*, 1994) :

- a) traversée du cumulus par les spermatozoïdes,
- b) attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide de l'ovocyte,
- c) induction de la réaction acrosomique,
- d) pénétration des spermatozoïdes à travers la zone pellucide,
- e) fusion du spermatozoïde avec la membrane plasmique de l'ovocyte et
- f) formation et rapprochement des pronoyaux.

La fécondation a lieu dans l'oviducte et plus particulièrement dans l'ampoule. Plusieurs études ont montré une participation des sécrétions de l'oviducte dans les mécanismes de la fécondation. Ces sécrétions agiraient au niveau des gamètes avant, pendant et après la fécondation.

Pour permettre le bon déroulement de la fécondation, les spermatozoïdes et l'ovocyte doivent subir des modifications pour être aptes à fusionner.

1.1. Maturation des ovocytes

1.1.1. Description de l'ovocyte mature

Dans l'espèce équine, comme chez les autres mammifères, l'ovocyte possède un cytoplasme qui est entouré d'une membrane plasmique appelée l'oolemma puis d'une enveloppe appelée la zone pellucide. L'espace situé entre l'oolemma et la zone pellucide est appelé l'espace périvitellin.

Le cytoplasme de l'ovocyte équin possède beaucoup de gouttelettes lipidiques et ne contient pas de réticulum endoplasmique granulaire ni d'appareil de Golgi (Vogelsang *et al.*, 1987).

La zone pellucide équine est une enveloppe translucide composée de glycoprotéines. Les premiers travaux ont montré la présence de trois glycoprotéines de 60, 80 et 100 kDA (Miller *et al.*, 1992) dans la zone pellucide équine. Au cours de la croissance folliculaire, les cellules du cumulus et l'ovocyte participent à la synthèse des glycoprotéines de la zone pellucide (Kölle *et al.*, 2007). La formation de la zone pellucide est terminée avant le déclenchement de la maturation de l'ovocyte.

L'ovocyte équin est entouré d'un cumulus qui est composé de cellules folliculaires et d'une matrice riche en acide hyaluronique comme chez les autres mammifères (Grondahl *et al.*, 1995b).

Quelques heures avant l'ovulation, à l'intérieur du follicule pré-ovulatoire, le complexe cumulus-ovocyte va subir plusieurs modifications nucléaires et cytoplasmiques pour permettre par la suite la fécondation et le développement embryonnaire.

1.1.2. Modifications des cellules du cumulus

L'expansion des cellules de cumulus se caractérise par un accroissement des espaces entre les cellules du cumulus et l'ovocyte (Bézar *et al.*, 1995) ainsi qu'entre les cellules du cumulus elles mêmes suite à la production d'une matrice riche en acide hyaluronique. Les jonctions entre les projections des cellules du cumulus et l'oolemma se rompent lors de l'expansion du cumulus (Grondahl *et al.*, 1995b).

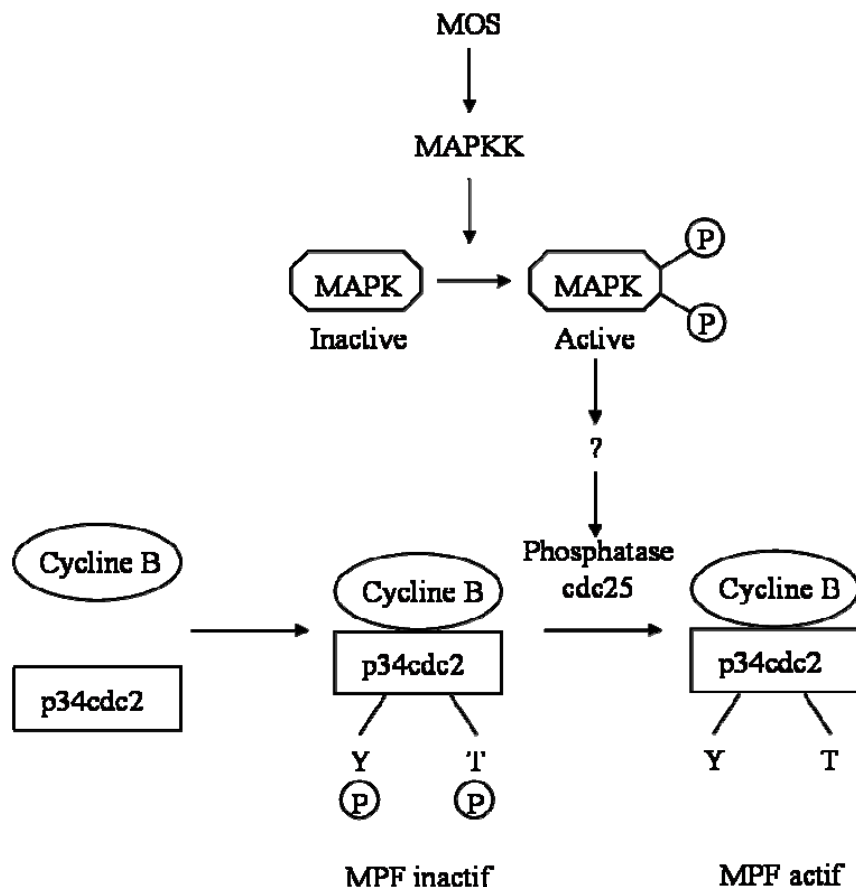


Figure 1: Schéma du cycle d'activation du MPF et de la voie de contrôle par la MAPK

(source : Goudet, 1998a)

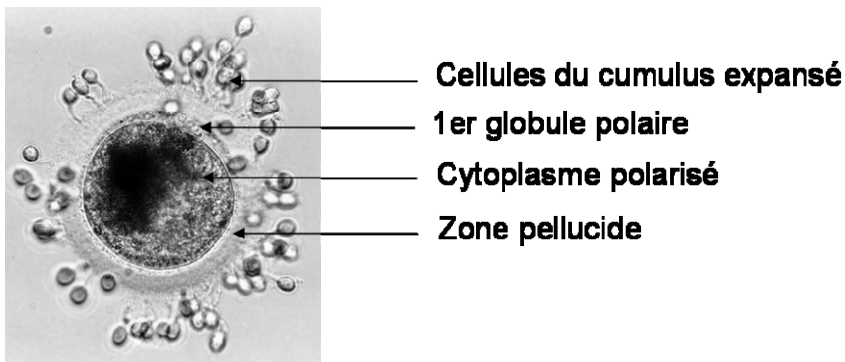


Figure 2 : Ovocyte équin mature présentant une polarisation du cytoplasme

(source : Photo prise au laboratoire de l'INRA de Nouzilly)

1.1.3. Modifications nucléaires

Dans l'espèce équine, l'ovocyte bloqué en début de première division méiotique va reprendre la méiose. Ces modifications sont caractérisées par la rupture de l'enveloppe nucléaire, la condensation de la chromatine, la formation du fuseau de méiose et la progression jusqu'au stade de la métaphase II localisée près de l'oolemma (Enders *et al.*, 1987, King *et al.*, 1987 ; Bézard *et al.*, 1995).

Chez les mammifères, les modifications nucléaires sont contrôlées par des phosphorylations / déphosphorylations de protéines (Figure 1). Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) est une sérine-thréonine kinase qui est activée par une cascade de kinases, dont la MAPK kinase et Mos (produit du proto-oncogène *cmos*). MAPK active la phosphatase *cdc25* qui va activer le Maturation-Promoting Factor (MPF) formé de deux sous-unités *p34cdc2* et cycline B. Le MPF va déclencher entre autres, la phosphorylation des histones H1, protéines permettant l'enroulement de l'ADN, ce qui va provoquer la condensation de la chromatine en chromosomes. La MAPK provoque de plus la rupture de la vésicule germinale, s'associe aux microtubules et régule leur activité.

Dans l'espèce équine, la présence du MPF et de la MAPK ont été confirmées dans les ovocytes aux cours de la maturation et ces deux facteurs sont actifs au cours de la maturation (Goudet *et al.*, 1998b, Goudet *et al.*, 1998c). Les mécanismes chez les équins semblent similaires à ceux observés chez les autres mammifères (décrits ci-dessus et par Eichenlaub-Ritter et Peschke, 2002).

1.1.4. Modifications cytoplasmiques

Parallèlement aux modifications nucléaires dans l'ovocyte équin, des remaniements cytoplasmiques s'opèrent. Les ovocytes équins en métaphase II avec un cumulus expansé présentent le plus souvent une polarisation du cytoplasme (Figure 2, Ambruosi *et al.*, 2009). En effet, les gouttelettes lipidiques se rassemblent sur un côté du cytoplasme, ce qui donne l'aspect polarisé à l'ovocyte équin (Gröndhal *et al.*, 1995b). Les granules corticaux migrent vers la périphérie du cytoplasme tout le long de la membrane plasmique de l'ovocyte équin (Goudet *et al.*, 1997, Carneiro *et al.*, 2002). Les mitochondries sont regroupées vers le centre de l'ovocyte équin et leur activité métabolique augmente au cours de la maturation nucléaire (Torner *et al.*, 2007). Avant la maturation, l'ovocyte synthétise et stocke en grande quantité

des acides ribonucléiques messagers (ARNm) et des protéines qui seront utilisés lors du développement embryonnaire (Alm *et al.*, 1998) comme chez les autres mammifères (Crozet *et al.*, 1981 ; Crozet *et al.*, 1986).

Chez les équins, la quantité de glutathion augmente au cours de la maturation *in vivo* (Luciano *et al.*, 2006). Chez les mammifères, cette molécule permet la décondensation du spermatozoïde après la fécondation (Sawai *et al.*, 1997). C'est aussi un anti-oxydant qui protège du stress oxydatif. De même, l'enzyme Glutathion peroxydase est traduite en grande quantité dans le cytoplasme des ovocytes équins (Luciano *et al.*, 2006). Cette enzyme catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , qui est néfaste pour la cellule) pour former de l' H_2O et oxyder le glutathion.

1.1.5. Modifications de l'ovocyte dans l'oviducte

L'ovocyte mature est ovulé dans l'oviducte par rupture du follicule au niveau de la fosse ovulatoire. Des études ont montré que les sécrétions de l'oviducte se fixent sur les ovocytes des humains et des babouins (O'Day-Bowman *et al.*, 1996) et sur la zone pellucide des ovocytes bovins (Wegner *et al.*, 1991, Gonçalves *et al.*, 2008). Un effet bénéfique des sécrétions a été observé sur la zone pellucide, la membrane plasmique et les granules corticaux des ovocytes porcins (Buhi *et al.*, 1993, Kidson *et al.*, 2003, Romar *et al.*, 2005). La structure de la zone pellucide de l'ovocyte porcin est modifiée pendant son trajet dans l'oviducte (Familiari *et al.*, 2008). Dans l'espèce équine, les modifications des ovocytes dans l'oviducte entre l'ovulation et la fécondation n'ont jamais été étudiées.

En conclusion, lors de la maturation, les ovocytes équins subissent des modifications nucléaires et cytoplasmiques et des modifications au niveau des cellules du cumulus, comme chez les autres mammifères. Cependant, l'influence des sécrétions de l'oviducte sur les ovocytes ovulés n'a jamais été étudiée.

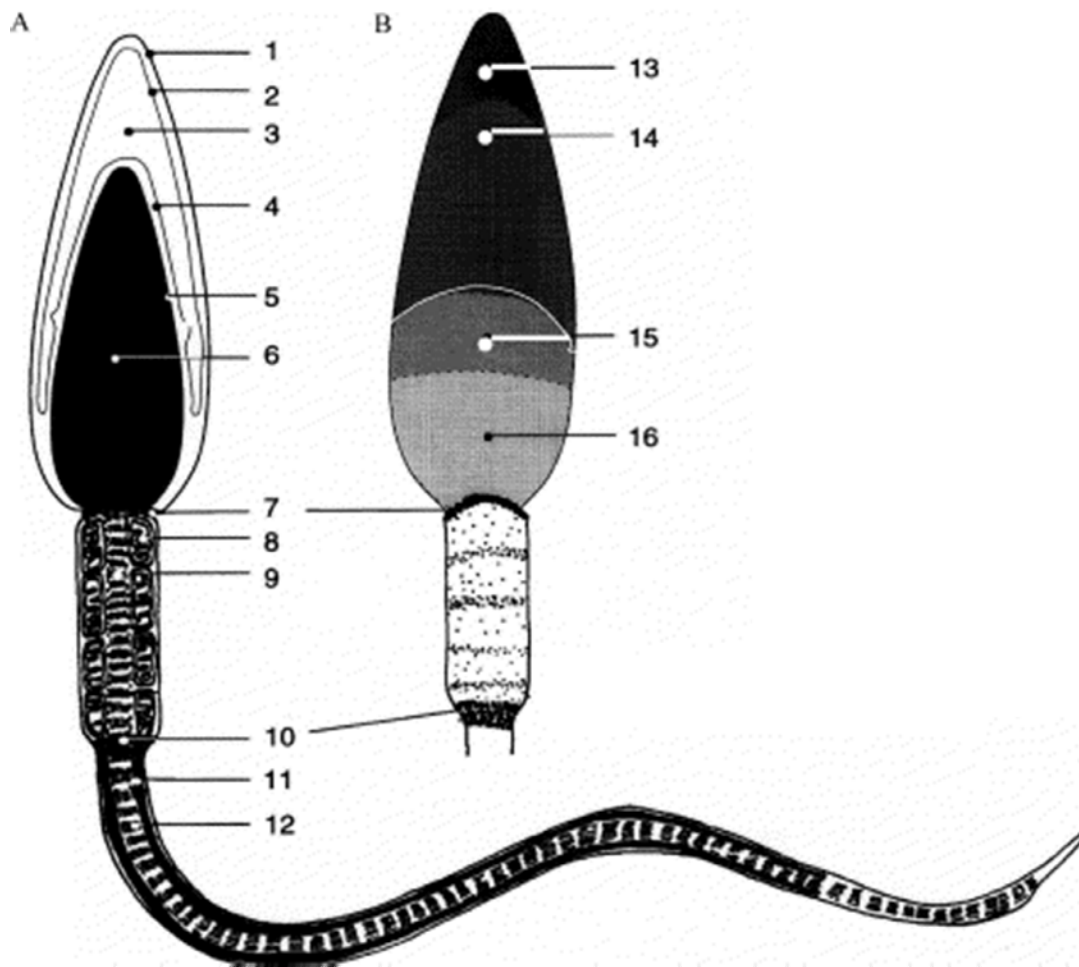


Figure 3: Schéma d'un spermatozoïde équin.

A) spermatozoïde entier. B) Tête et partie intermédiaire du spermatozoïde présentant les segments de la membrane plasmique (une vue de surface). Ligne pleine et foncée représente les membranes bicouches : (1) membrane plasmique ; (2) membrane acrosomique externe ; (3) contenu de l'acrosome ; (4) membrane acrosomique interne ; (5) enveloppe nucléaire ; (6) noyau ; (7) espace nucléaire supérieur ; (8) mitochondrie ; (9) partie proximale du flagelle (pièce intermédiaire) ; (10) annulus ; (11) partie distale du flagelle (pièces principale et terminale) ; (12) fibres denses ; (13) segment apicale ; (14) segment pré-équatorial ; (15) segment équatorial ; (16) segment post-équatorial (cape post-equatorial). (Source : Gadella *et al.*, 2001).

1.2. Préparation des spermatozoïdes

1.2.1. Description d'un spermatozoïde

Chez les chevaux comme chez les autres mammifères, les spermatozoïdes, entourés de leur membrane plasmique, sont formés de trois parties (Figure 3): 1) la tête, 2) la pièce intermédiaire et 3) le flagelle.

1.2.2. Mécanismes de la capacitation chez les mammifères

Dans le tractus génital femelle, les spermatozoïdes vont subir des modifications qui vont leur permettre de féconder l'ovocyte. Ce processus d'acquisition de la fécondance est nommé capacitation (Chang, 1951). La capacitation est caractérisée par des remaniements au niveau de la membrane plasmique des spermatozoïdes et par l'hyperactivation des spermatozoïdes (Travert *et al.*, 2009). Les spermatozoïdes hyperactivés ont des battements flagellaires intenses et un mouvement circulaire (« en toupie »).

Au cours de la capacitation, différentes modifications ont été observées (Travert *et al.*, 2009).

1) Dans le fluide d'oviducte, des molécules comme les accepteurs de stérol (par exemple : l'albumine) captent le cholestérol présent dans la membrane plasmique des spermatozoïdes. Ceci provoque une redistribution des lipides au niveau de la membrane et une concentration du cholestérol restant, dans la zone antérieure de la tête du spermatozoïde.

2) La réorganisation des phospholipides va entraîner la perte de l'asymétrie de la membrane plasmique. Ceci va faire apparaître des zones membranaires fusiogènes et une externalisation des récepteurs spermatiques intervenant dans la liaison primaire avec la zone pellucide.

3) En parallèle, des molécules comme les glycosaminoglycanes dans le fluide d'oviducte, vont réguler l'entrée du calcium et stimuler les phospholipases A2. Ceci va aussi modifier l'organisation des lipides et des protéines dans la membrane plasmique du spermatozoïde. (Graham, 1996).

Pour cela, les molécules de l'oviducte vont activer différentes voies de signalisation. Les deux voies principales sont la voie «AMP cyclique et des substrats de PKA» et la voie «ERK». Elles aboutissent à la phosphorylation de protéines correspondant pour la plupart, à des

canaux ioniques, des enzymes métaboliques ou des protéines structurales localisées sur le flagelle. Elles vont préparer les spermatozoïdes à la réaction acrosomique et les rendre hyperactifs.

Dans l'espèce équine, certains mécanismes de la capacitation ont été identifiés :

- 1) l'augmentation du calcium intracellulaire dans le spermatozoïde (McPartlin *et al.*, 2009),
- 2) la perte du cholestérol dans la membrane plasmique (Gadella *et al.*, 2001) qui va activer les tyrosines kinases. Cela va donc provoquer la phosphorylation des protéines spécifiques de la membrane plasmique du spermatozoïde au niveau de la tête et du flagelle (Colenbrander *et al.*, 2002).
- 3) l'activation de plusieurs voies de signalisation qui va provoquer le remaniement des phospholipides dans la membrane plasmique du spermatozoïde (Rathi *et al.*, 2001, Gadella *et al.*, 2001).

Toutes ces étapes vont permettre le remaniement de la membrane plasmique du spermatozoïde et son hyperactivation.

1.2.3. Rôle de l'oviducte dans la préparation des spermatozoïdes

Les premiers spermatozoïdes équins arrivent dans l'oviducte entre 2 heures et 4 heures après la copulation ou l'insémination (Bader *et al.*, 1982). L'une des fonctions bien connues de l'oviducte est le stockage des spermatozoïdes en les maintenant viables et intacts dans l'isthme jusqu'au moment de la fécondation chez la vache (Kölle *et al.*, 2009), la truie (Töpfer-Peterson *et al.*, 2008) et la jument (Thomas *et al.*, 1994a,b). Certaines molécules du plasma séminal fixées sur la membrane plasmique du spermatozoïde permettraient l'attachement des spermatozoïdes aux cellules d'oviducte comme les protéines Horse Seminal Proteins ou les Galactose-Binding Protein dans l'espèce équine (Töpfer-Petersen *et al.*, 2005, Sabeur et Ball, 2007) et les spermadhesines chez les porcins (Töpfer-Petersen *et al.*, 2008). Dans l'espèce équine, l'attachement des spermatozoïdes à la paroi de l'oviducte serait maintenu par un taux faible de calcium intracellulaire dans le spermatozoïde (Dobranski *et al.*, 1996).

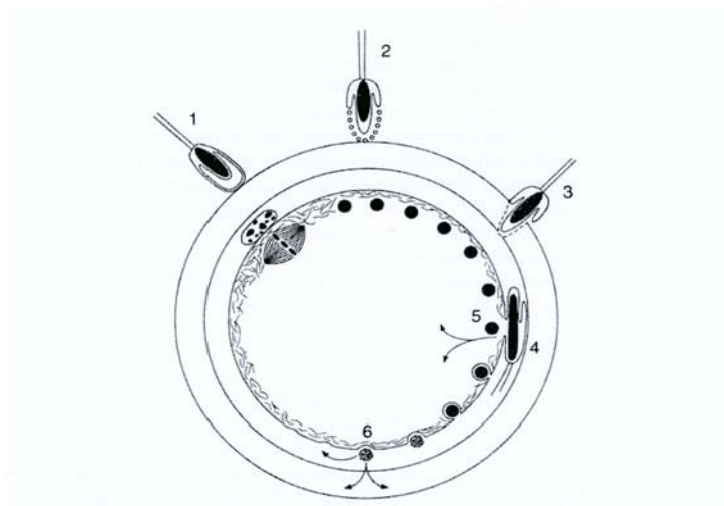


Figure 4 : Interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte lors de la fécondation.

(1): fixation du spermatozoïde à la zone pellucide de l'ovocyte

(2): réaction acrosomique

(3): pénétration du spermatozoïde à travers la zone pellucide de l'ovocyte

(4): fusion des membranes du spermatozoïde avec la zone pellucide.

(5): activation de l'ovocyte

(6): réaction corticale

(source : Gadella *et al.*, 2001)

Différentes protéines permettraient le décrochage des spermatozoïdes et le déclenchement de la capacitation des spermatozoïdes, comme la progestérone sécrétées par le follicule de Graaf ou les glycosaminoglycanes sécrétés par l'oviducte ou le fluide folliculaire produit lors de l'ovulation chez les mammifères (Graham 1996, Hunter et Rodriguez-Martinez, 2004). Les spermatozoïdes équins décrochés ne peuvent pas s'attacher à nouveau aux cellules s'ils ont été capités car ils ont alors un taux de calcium élevé dans leur cytoplasme (Dobranski *et al.*, 1997). Dans l'espèce équine, les molécules intervenant dans le décrochage des spermatozoïdes ou le déclenchement de la capacitation ne sont pas encore connues. Il reste une ambiguïté sur le déclenchement de la capacitation. On peut se demander si la capacitation est induite par le décrochage des spermatozoïdes ou si la capacitation se déclenche avant le décrochage des spermatozoïdes et par conséquent entraîne ce décrochage.

1.3. Etapes de la fécondation

Dans l'espèce équine, *in vivo*, la fécondation a lieu entre 6 heures et 12 heures après l'expulsion de l'ovocyte dans l'oviducte (Bézar *et al.*, 1989, Grondahl *et al.*, 1993). La figure 4 présente les différentes interactions entre les spermatozoïdes et l'ovocyte au cours de la fécondation.

1.3.1. Traversée du cumulus par les spermatozoïdes

Avant l'interaction des spermatozoïdes avec l'ovocyte, les spermatozoïdes doivent traverser le cumulus. Chez la souris, l'enzyme hyaluronidase appelée PH-20 ou glycerolphosphatidylinositol-linked hyaluronidase située sur le spermatozoïde, hydrolyse l'acide hyaluronique, un glycosaminoglycane présent dans la matrice extracellulaire liant les cellules du cumulus. Elle disperse les cellules du cumulus et crée un passage pour le spermatozoïde mobile (Primakoff et Myles, 2002 ; Baba *et al.*, 2002). Dans l'espèce équine, cette enzyme a été identifiée sur les spermatozoïdes équins (Meyers, 2001), mais son rôle dans la dispersion des cellules du cumulus n'a pas encore été démontré. Bézar *et al.*, (1989) ont observé que 6 heures après ovulation, l'ovocyte collecté dans l'oviducte avait un cumulus expansé mais n'était pas fécondé. En revanche, 12 heures après ovulation, l'ovocyte n'avait plus de cellules du cumulus et présentait deux pronoyaux. Chez certains mammifères comme les bovins, les cellules du cumulus favorisent la fécondation (Tanghe *et al.*, 2003). Cependant, dans l'espèce équine, le rôle des cellules du cumulus dans la fécondation n'a pas été démontré.

1.3.2. Attachement des spermatozoïdes sur la zone pellucide de l'ovocyte

La membrane plasmique du spermatozoïde se fixe sur la zone pellucide de l'ovocyte, mais le mécanisme moléculaire mis en jeu n'est pas encore connu dans l'espèce équine. Chez les mammifères, la première protéine étudiée dans le mécanisme de l'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide est la β 1,4-galactosyltransférase qui est présente sur le spermatozoïde. Chez la souris et le bovin, elle vient se lier au résidu β N-acétylglucosamine de la protéine ZPC de la zone pellucide (Shur et Hall, 1982 et Tengowski *et al.*, 2001), ce qui permet au spermatozoïde de s'attacher à la zone pellucide. Dans l'espèce équine, la membrane plasmique du spermatozoïde équin contient l'enzyme β 1,4-galactosyltransférase (Fayrer-Hosken *et al.*, 1991 ; Larson et Miller, 1997). Le résidu β N-acétylglucosamine a été aussi mis en évidence sur la zone pellucide équine (Kölle *et al.*, 2007). Mais le rôle de ces deux molécules dans cette étape de la fécondation n'a pas été démontré.

Chez les mammifères, d'autres molécules ont été identifiées sur les spermatozoïdes. Elles pourraient jouer un rôle dans les mécanismes d'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide. Ces molécules peuvent être des protéines, des sucres présents sur la membrane plasmique des spermatozoïdes et sur la zone pellucide (Tanphaichitr *et al.*, 2007, Okabe et Cummins, 2007, Nixon *et al.*, 2007, Töpfer-Petersen *et al.*, 2007, Van Gestel *et al.*, 2007). Parmi ces molécules, deux protéines ont été identifiées sur les spermatozoïdes équins : la protéine Horse Seminal Protein 7 (HSP-7) (Reinert *et al.*, 1996) et la zonadhésine (Breazeale *et al.*, 2002).

Chez les mammifères, l'oviducte faciliterait l'interaction des spermatozoïdes à la zone pellucide. Dans l'espèce humaine, les glycoprotéines du fluide d'oviducte s'associent à la zone pellucide de l'ovocyte et améliorent la fixation des spermatozoïdes à l'ovocyte (O'Day-Bowmann *et al.*, 1996). Dans l'espèce porcine, les glycoprotéines de l'oviducte se fixent sur la zone pellucide des ovocytes (Buhi *et al.*, 1993). Elles modulent l'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide afin de diminuer la polyspermie (McCauley *et al.*, 2003 ; Coy *et al.*, 2008). Dans l'espèce équine, le rôle de l'oviducte dans cette étape n'a pas encore été démontré.

1.3.3. Induction de la réaction acrosomique

La troisième étape est l'induction de la réaction acrosomique qui permettra au spermatozoïde de traverser la zone pellucide.

Chez la souris, la réaction acrosomique est déclenchée par la fixation du spermatozoïde à la glycoprotéine ZPC de la zone pellucide des ovocytes. La protéine ZPC entraîne la dépolarisation de la membrane du spermatozoïde. Cette dépolarisation active les protéines G ce qui entraîne une élévation du pH, une activation des phospholipases C et une ouverture des canaux calciques (Wassarman *et al.*, 2005). Ceci augmente de façon transitoire la quantité d'ions calcium dans le spermatozoïde. Ces événements entraînent la fusion entre la membrane plasmique et la membrane acrosomique externe du spermatozoïde. Ceci forme des fenestrations au travers de la membrane de l'acrosome, provoquant la libération du contenu de l'acrosome et l'exposition de la membrane acrosomique interne face à la zone pellucide (Shapiro, 1984 ; Lawrence *et al.*, 1997).

Dans l'espèce équine, la fixation du spermatozoïde à la zone pellucide déclenche la réaction acrosomique (Meyers *et al.*, 1995 et 1996). La fusion des membranes du spermatozoïde et la formation des fenestrations ainsi que la libération du contenu de l'acrosome ont été observées sur le spermatozoïde équin (Varner *et al.*, 1987). En revanche, les molécules de la zone pellucide induisant la réaction acrosomique des spermatozoïdes ne sont pas encore identifiées. Au niveau du spermatozoïde équin, des candidats de la famille protéique SNARE localisés sur l'acrosome, plus précisément sur la cape acrosomique, pourraient participer aux mécanismes de la réaction acrosomique. Il s'agit des protéines t-SNARE syntaxin, v-SNARE synaptobrevin/VAMP, calcium sensor synaptotagmin et ATPase NSF ainsi que caveolin-1 qui est un composant des lipid rafts (Gamboa et Ramalho-Santos, 2005).

Chez les bovins, les porcins et les humains, l'Atrial Natriuretic Peptide A (ANP A), une glycoprotéine sécrétée par les cellules de l'oviducte, favorise la réaction acrosomique des spermatozoïdes (Anderson *et al.*, 1994 ; Zamir *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 2006). L'oviducte pourrait donc participer à la réaction acrosomique des spermatozoïdes au contact de la zone pellucide. Dans l'espèce équine, le rôle de l'oviducte dans cette étape n'a jamais été étudié.

En conclusion, le mécanisme d'induction de la réaction acrosomique, ainsi que les molécules impliquées, sont mal connus chez les mammifères.

1.3.4. Pénétration de la zone pellucide

Chez la souris, l'acrosine, une protéine localisée dans la membrane acrosomique interne, va se fixer sur la ZPA, glycoprotéine composant la zone pellucide de souris. Elle va hydrolyser partiellement certaines glycoprotéines présentes dans la zone pellucide (Howes *et al.*, 2001). Ainsi la texture de la zone pellucide va être modifiée. Le spermatozoïde peut alors traverser la zone pellucide. Chez le porc, la zonadhésine semblerait intervenir dans la traversée de la zone pellucide après la réaction acrosomique (Lea *et al.*, 2001). Dans l'espèce équine, le rôle de la zonadhésine détectée sur la tête des spermatozoïdes (Breazeale *et al.*, 2002) n'a pas été encore clairement défini.

Le mécanisme permettant la traversée de la zone pellucide par un spermatozoïde est encore inconnu chez les mammifères. Cette traversée pourrait se faire par digestion enzymatique ou/et par la force du spermatozoïde grâce à ses mouvements hyperactifs (Bedford 2008).

Après avoir passé la zone pellucide, le spermatozoïde arrive dans l'espace péri-vitellin, puis entre en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte.

1.3.5. Fusion des gamètes

Après avoir traversé la zone pellucide, le spermatozoïde va s'immobiliser contre la membrane plasmique de l'ovocyte puis fusionner avec celle-ci pour entrer dans l'ovocyte. Chez les mammifères, l'association des molécules présentes sur le segment équatorial du spermatozoïde et l'olemma permet la fusion et l'entrée du spermatozoïde à l'intérieur de l'ovocyte (Nixon *et al.*, 2007). Dans l'espèce équine, les protéines appartenant à la famille SNARE (t-SNARE syntaxin, v-SNARE synaptobrevin/VAMP, le calcium sensor synaptotagmin, l'ATPase NSF et la caveolin-1) sont aussi localisées sur le segment équatorial (Gamboa et Ramalho-Santos, 2005). Elles pourraient aussi participer aux mécanismes de fusion entre les gamètes mâle et femelle. Après la fusion, le spermatozoïde équin entre entièrement dans le cytoplasme. La pièce intermédiaire et la queue du spermatozoïde ont été observées à côté du pronoyau mâle nouvellement formé dans le cytoplasme de l'ovocyte fécondé (Enders *et al.*, 1987, Bézard *et al.*, 1989, Grondahl *et al.*, 1993, revue : Bézard *et al.*, 1997).

Dans l'espèce bovine, le fluide d'oviducte participerait à la fusion des gamètes. Gabler *et al.* (2003) ont montré que l'ostéopontine, glycoprotéine sécrétée par les cellules d'oviducte, augmente le taux de fécondation dans l'espèce bovine. Ils ont observé qu'elle se fixait *in vitro*

sur le segment équatorial du spermatozoïde. Dans l'espèce porcine, les glycoprotéines sécrétées par les cellules d'oviducte sont présentes dans l'espace périvitellin et sur la membrane plasmique de l'ovocyte (Bui *et al.*, 1993). Ces protéines pourraient favoriser la fusion des gamètes. Dans l'espèce équine, le rôle de l'oviducte dans la fusion n'a pas été démontré. De même, les molécules sécrétées par l'oviducte n'ont pas été identifiées.

1.3.6. Formation des pronoyaux mâle et femelle

Chez les mammifères, l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte va déclencher l'exocytose du contenu des granules corticaux dans l'espace péri-vitellin. Chez la souris, la libération du contenu et notamment des protéinases va modifier la ZPA (Moller et Wassarman, 1989). Cette modification constitue une barrière à la polyspermie. Parallèlement à cette libération des granules, l'ovocyte achève sa seconde division méiotique et expulse son deuxième globule polaire. Ensuite, le noyau du spermatozoïde se décondense sous l'influence de facteurs cytoplasmiques de l'ovocyte mature (Perreault, 1988). Une enveloppe nucléaire se forme autour de la chromatine mâle et une autre autour de la chromatine femelle. La chromatine femelle se décondense progressivement. Les pronoyaux migrent vers le centre de l'œuf. Les nouvelles enveloppes nucléaires disparaissent. La chromatine se condense pour former des chromosomes qui viennent s'aligner sur le fuseau de division mitotique. La cellule-œuf va se préparer pour une première division mitotique (Yanagimachi *et al.*, 1994).

Dans l'espèce équine, l'activation de l'ovocyte serait déclenchée par des facteurs qui sont des molécules présentes sur les spermatozoïdes (Guignot *et al.*, 1998). Ces facteurs libérés dans le cytoplasme entraîneraient une mobilisation massive des ions Ca^{++} à partir des réservoirs intracellulaires de l'ovocyte (Bedford *et al.*, 2003). Cette élévation en ions calciques durerait pendant environ 60 minutes et semblerait activer la voie de signalisation des phosphoinositides dans l'ovocyte, ce qui initierait l'activation de l'ovocyte (Bedford *et al.*, 2003). Les observations au microscope électronique à transmission ont montré que les ovocytes équins fécondés avaient peu de granules corticaux dans le cytoplasme près de la membrane plasmique (Grondahl, 1993). En effet, en réponse à l'élévation en ion Ca^{++} dans le cytoplasme, les granules corticaux présents dans le cytoplasme vont déverser par exocytose leur contenu dans l'espace péri-vitellin (Carneiro *et al.*, 2002). Cette libération empêche l'entrée d'un autre spermatozoïde à l'intérieur de l'ovocyte.

Parallèlement à la libération des granules corticaux, les pronoyaux mâle et femelle se forment dans l'ovocyte équin comme chez les mammifères (Enders *et al.*, 1987). Douze heures après ovulation, les ovocytes équins présentent deux pronoyaux mâle et femelle (Grondalh, 1993). Ensuite, 19 heures après ovulation, les deux pronoyaux ont migré l'un vers l'autre (Bézar *et al.*, 1997). Chez les équins, comme chez les autres mammifères, les chromosomes se forment et viennent s'aligner sur le fuseau de division mitotique pour entamer la première division cellulaire. Dans l'oviducte équin, 24 heures après l'ovulation, un embryon à 2 cellules s'est formé (Bézar *et al.*, 1997). C'est le début du développement du nouvel individu.

Chez les mammifères, au cours du développement embryonnaire, l'oviducte fournit à l'embryon un environnement propice à sa croissance. Dans l'espèce porcine, les glycoprotéines sécrétées par l'oviducte ont été localisées sur la zone pellucide et dans l'espace périvitellin du jeune embryon (Buhi *et al.*, 1993). Des cultures d'embryons sur cellules d'oviducte favorisent leur développement comme décrit chez les ovins (Gandolfi et Moor, 1987), les bovins (Eyestone et First, 1989), les cervidés (Locatelli *et al.*, 2005) et les équins (Battut *et al.*, 1991).

Tableau 1 : Présentation des différents essais de fécondation *in vitro* dans l'espèce équine.

LH : Luteinising Hormone, CEG: Crude Equine Gonadotropine, FSH : Follicle Stimulating Hormone, SJC : Sérum de Jument en Chaleur, SVC : Sérum de Vache en Chaleur, BSA : Bovine Serum Albumin, TCM : Tissue Culture Medium, TALP: Tyrode Albumine Lactate Pyruvate, SVF : Sérum de Veau Fœtal.

Maturation des ovocytes	Sperme	Capacitation	Concentration finale	Milieu de fécondation	Taux de fécondation	Auteurs
<i>In vitro</i>	Frais	Caféine + milieu de Brackett et Oliphant + BSA ou Ionophore calcique	18.10 ⁶ spz/ml	Milieu des spermatozoïdes	BSA : 11% Ionophore : 17%	Del Campo <i>et al.</i> , 1990
<i>In vitro</i>	Frais	Ionophore calcique + TALP + BSA	5.10 ⁶ spz/ml	Milieu B2 Ménézo + SVF	33%	Zheng <i>et al.</i> , 1990
<i>In vivo</i> Incubation 3 h dans le milieu de fécondation	Frais	Ionophore calcique + Hank's salt Hepes + BSA	5.10 ⁶ spz/ml	Milieu B2 Ménézo + SVF	30% 2 poulains nés	Palmer <i>et al.</i> , 1991 Bézar <i>et al.</i> , 1992
<i>In vitro</i>	Frais	Ionophore calcique ou Héparine + Hank's salt + BSA	5.10 ⁶ spz/ml	TCM 199 + LH ou CEG + SVC + Oestradiol 17 Bêta + Na Pyruvate + Ca Lactate	Ionophore : 28% Héparine : 2%	Grondahl <i>et al.</i> , 1995a
<i>In vitro</i>	Congelé	Héparine + TALP modifié	10 ⁶ spz/ml à 10 ⁷ spz/ml	TCM 199 + Na bicarbonate, Na pyruvate + Ca lactate + glutamine + gentamycine + SJC ou SVC + FSH + LH + Estradiol 17 bêta + Hépés	32%	Dell'Aquila <i>et al.</i> , 1996 Dell'Aquila <i>et al.</i> , 1997a,b
<i>In vitro</i>	Frais	Ionophore calcique ou Héparine + TALP	10 ⁶ spz/ml	TALP modifié	Ionophore : 21% Héparine : 9%	Aim <i>et al.</i> , 2001
	Congelé	Ionophore calcique ou Héparine + Milieu Ca ²⁺ _ Free_ Tyrod's		TALP modifié	Ionophore : 0% Héparine : 15%	
<i>In vitro</i>	Frais	Ionophore calcique + TALP	10 ⁶ spz/ml	TCM199 + EGF ou TCM199 + des sels + FSH gentamycine	4 à 17%	Hinrichs <i>et al.</i> , 2002
<i>In vitro</i>	Frais	Procaine + BSA + NaHCO ₃ + Milieu de Whitten modifié	10 ⁶ spz/ml	Milieu des spermatozoïdes pendant 18 h Puis milieu de culture des embryons	60%	McPartlin <i>et al.</i> , 2009

2. Fécondation *in vitro* dans l'espèce équine

Pour permettre la pénétration de l'ovocyte par un spermatozoïde *in vitro*, il est nécessaire de trouver un milieu et des conditions adéquates pour la préparation et la co-incubation des gamètes mâle et femelle. Plusieurs laboratoires ont testé différentes conditions et milieux pour réaliser la fécondation *in vitro* (FIV).

Les étapes de cette technique comprennent :

- a) la collecte des ovocytes et leur préparation pour être fécondables
- b) la préparation du sperme pour rendre les spermatozoïdes fécondants
- c) la co-incubation des gamètes dans des conditions propices à la fécondation

Le tableau 1 présente les taux de fécondation obtenus pour chaque protocole de FIV développés ci-dessous.

2.1. Maturation de l'ovocyte

Pour être fécondé, l'ovocyte doit être mature. Pour cela, les ovocytes peuvent être soit collectés après maturation *in vivo*, soit mis en maturation *in vitro*.

2.1.1. Maturation *in vivo*

Palmer *et al.* (1991) et Bézard *et al.* (1992) ont utilisés des ovocytes issus de maturation *in vivo*, collectés dans les follicules préovulatoires, pour leurs essais de FIV. La croissance folliculaire a été suivie chaque jour par échographie. L'induction de l'ovulation a été réalisée en injectant, par voie intraveineuse, un extrait d'hypophyses équine (3% FSH et 6% LH) quand le follicule préovulatoire atteint le diamètre de 33 à 36 mm. L'ovulation devant se produire 36 heures à 40 heures après l'injection, les ovocytes matures sont collectés par ponction du follicule préovulatoire via le flanc de l'animal 35 heures après cette induction. Les ovocytes sont incubés dans le milieu B2 Ménézo (composé de sels minéraux, acides aminés, albumine, cholestérol, vitamine C, antibiotiques, sucres et dérivés métaboliques,

bases puriques, pyrimidiques et Rouge de Phénol (Ménézo, 1976)) et additionné de 15% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), sous air enrichi avec 5% de CO₂ à 38,5°C pendant 6 heures ou 12 heures.

2.1.2. Maturation *in vitro*

Del Campo *et al.* (1990), Zhang *et al.* (1990), Grondahl *et al.* (1995a), Dell Aquila *et al.* (1996, 1997a, b), Alm *et al.* (2001), Hinrichs *et al.* (2002) et McPartlin *et al.* (2009) ont utilisé des ovocytes maturés *in vitro* pour leurs essais de FIV.

Les ovocytes sont collectés par aspiration du liquide folliculaire et grattage de la paroi des follicules d'ovaires provenant de juments abattues dans des abattoirs commerciaux.

Les ovocytes collectés sont incubés dans un milieu et dans des conditions (température et durée d'incubation) permettant de poursuivre leur maturation *in vitro*. Les milieux de culture sont constitués d'un milieu Tissue Culture Medium 199 (TCM 199, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) ou B2 Ménézo. Puis, ils sont complétés avec des hormones (Follicle Stimulating Hormone (FSH), Luteinising Hormone (LH), oestradiol (E₂)), avec 20% de SVF, des facteurs de croissance (Epidermal Growth Factor) et des cellules de la granulosa qui sont des cellules folliculaires entourant l'ovocyte et la cavité liquidienne du follicule de l'ovaire. Les quantités et le type de milieu varient selon l'auteur des publications (Tableau 1).

Les ovocytes sont incubés dans le milieu de culture en goutte de 50µl sous huile minérale ou en puits de 500µl et sous air enrichi avec 5% de CO₂, à 38,5°C. Le temps d'incubation varie de 24 heures à 42 heures selon les essais réalisés.

2.2. Préparation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes équins ne sont pas aptes à féconder après l'éjaculation. Pour la technique de FIV, les spermatozoïdes équins doivent être préparés pour pouvoir féconder l'ovocyte. Ils doivent être «capacités». Différents traitements de capacitation ont été testés (Tableau 1).

1) Del Campo *et al.* (1990) ont dilué les spermatozoïdes issus de semence fraîche dans le milieu Bracket et Oliphant (composés de sels minéraux) additionné de 5 mmol/l de caféine. Ils ont ensuite centrifugé les spermatozoïdes dans un gradient de Percoll qui permet d'avoir un gradient de densité afin de séparer les spermatozoïdes morts des vivants. Les

spermatozoïdes vivants récupérés après la centrifugation sont dilués dans le milieu Bracket et Oliphant additionné d'albumine bovine (Bovine Serum Albumine, BSA) ou de 0,1 $\mu\text{mol/l}$ d'ionophore calcique A23187 pendant 60 secondes. Ensuite, ils sont dilués dans le milieu Bracket et Oliphant additionné de BSA. La BSA est un accepteur de cholestérol et donc élimine le cholestérol présent dans la membrane plasmique du spermatozoïde. Ceci provoque une réorganisation des lipides et des protéines dans la membrane plasmique, ce qui prépare les spermatozoïdes pour la fécondation. La caféine active différentes voies de signalisation dans le spermatozoïde ce qui va déclencher l'hyperactivation des spermatozoïdes (Pommer *et al.*, 2003). L'ionophore calcique ouvre les canaux calciques du spermatozoïde ce qui provoque l'élévation de la concentration d'ions calcium dans le cytoplasme du spermatozoïde (Simpson *et al.*, 1987). Ceci active plusieurs voies de signalisation dans le spermatozoïde, ce qui va entraîner la capacitation des spermatozoïdes et les préparer à la fécondation (Bennet *et al.*, 1987).

2) Zhang *et al.* (1990) ont dilué les spermatozoïdes issus de semence fraîche dans le milieu Tyrode Albumine Lactate Pyruvate (TALP, composé d'Hépès, de sels minéraux, d'albumine, de lactate et de pyruvate, de rouge de phénol) additionné de BSA pendant 5 minutes à 37,5°C puis ont traité les spermatozoïdes avec 7,14 $\mu\text{mol/l}$ d'ionophore calcique A23187 pendant 5 à 10 minutes.

3) Palmer *et al.* (1991) et Bézard *et al.* (1992) ont dilué les spermatozoïdes issus de semence fraîche dans un milieu composé de sels (sels de Hank et Hépès) et de BSA et incubé à 37° C en anaérobiose pendant 30 minutes. Puis, les spermatozoïdes ont été traités avec 16 $\mu\text{mol/l}$ d'ionophore calcique A23187 pendant 5 minutes.

4) Grondahl *et al.* (1995a) ont centrifugé les spermatozoïdes équins issus de semence fraîche dans un gradient de Percoll. Les spermatozoïdes vivants récupérés après la centrifugation sont ensuite dilués dans des sels de Hank supplémentés avec de l'Hépès et de la BSA, puis co-incubés avec 3 $\mu\text{mol/l}$ d'ionophore calcique A23187 pendant 1 ou 5 minutes.

5) Dell'Aquila *et al.* (1996, 1997a,b) ont réalisé un «swim up» du sperme issus de semence fraîche dans le milieu TALP. Cette technique consiste à déposer les spermatozoïdes au fond du tube dans le milieu de dilution. Au cours du « swim up », les spermatozoïdes mobiles migrent en haut du tube dans le milieu où ils sont collectés. Ils sont ensuite traités avec 1 $\mu\text{g/ml}$ d'héparine. L'héparine fait partie de la famille des glycosaminoglycanes qui initient la

capacitation en stimulant l'activité des Phospholipase A2 et en régulant l'entrée du calcium dans le spermatozoïde. Ceci favorise l'instabilité des membranes et la préparation à la fusion des membranes qui se déroule lors de la réaction acrosomique (Parrish *et al.*, 1988).

6) Alm *et al.* (2001) ont co-incubé les spermatozoïdes issus de semence fraîche d'étalon pendant 45 minutes à 38,5°C sous 5%CO₂ dans du milieu à base de lait puis dans le milieu TALP. Ils ont en parallèle réalisé un «swim up» du sperme issus de semence congelé dans du milieu Tyrode sans ion calcium (Milieu Ca²⁺_Free_Tyrod's). Les spermatozoïdes issus de semence fraîche ou de semence congelé ont ensuite été traités les spermatozoïdes avec 200µg/ml d'héparine ou 7,14 µmol/l d'ionophore calcique A23187 pendant 10 minutes. Alm *et al.* (2001) ont montré que lors de l'utilisation de semence fraîche, le traitement des spermatozoïdes avec du ionophore calcique donnait de meilleurs taux de FIV que le traitement avec l'héparine. Au contraire, lors de l'utilisation de semence congelée, le traitement des spermatozoïdes avec de l'héparine a donné de meilleurs taux de FIV.

7) Hinrichs *et al.* (2002) ont incubé les spermatozoïdes issus de semence fraîche dans le milieu TALP pendant 15 minutes puis ont été traité avec 3µmol/l d'ionophore calcique A23187 pendant 3 minutes ou 7,14µmol/l d'ionophore calcique pendant 10 minutes. Les taux de fécondation n'étaient pas différents entre les deux concentrations d'ionophore calcique.

8) McPartlin *et al.*, (2009) ont dilué les spermatozoïdes issus de semence fraîche dans le milieu Modified Whitten's (MW, composé de sels minéraux, Hépes, lactate et pyruvate) additionné de BSA et de bicarbonate de sodium. Les spermatozoïdes sont incubés 6 heures dans ce milieu à 37°C. Les spermatozoïdes sont ensuite traités avec 5 mmol/l de procaine. Cette molécule déclenche l'hyperactivation des spermatozoïdes.

2.3. Co-incubation des gamètes dans le milieu de fécondation

Les ovocytes matures et les spermatozoïdes préparés pour la fécondation doivent être co-incubés ensemble dans un milieu permettant leur fusion. Dans la plupart des techniques de fécondation, les gamètes sont co-incubés à 38,5°C sous air enrichi avec 5% de CO₂ et avec 100% d'humidité (Tableau 1). Del Campo *et al.* (1990) et McPartlin *et al.* (2009) ont ajouté les ovocytes dans le milieu contenant les spermatozoïdes pendant 18 heures. Zhang *et al.* (1990), Palmer *et al.* (1991) et Bézard *et al.* (1992) ont co-incubé les spermatozoïdes avec les ovocytes dans le milieu B2 Ménézo. Le milieu utilisé pour la co-incubation des gamètes par

Dell'Aquila *et al.* (1996, 1997a,b) et Alm *et al.* (2001) était le milieu TALP modifié. Grondahl *et al.* (1995a) et Hinrichs *et al.* (2002) ont co-incubé les gamètes dans le milieu TCM 199 où étaient mis en maturation les ovocytes. Différentes concentrations finales de spermatozoïdes dans le milieu de culture ont été testées : 5.10^5 , 10^6 , 5.10^6 , 10^7 spermatozoïdes/ml.

Les taux obtenus avec la plupart des techniques mises au point jusqu'en 2002 n'ont jamais dépassé les 33% d'ovocytes fécondés. De plus, les différentes techniques de FIV publiées ont été testées dans notre laboratoire sans succès. Aucune fécondation n'a pu être obtenue même lors de collaborations avec les laboratoires où avaient été mises au point les techniques de FIV. De plus, le laboratoire a tenté de reproduire les techniques mises au point dans les espèces bovine et caprine. Peu de fécondations ont été observées (technique caprine : 3% (Goudet *et al.*, 2003), technique bovine : 6% (Deleuze *et al.*, 2008)) alors que ces techniques de FIV permettent d'obtenir 90 % d'ovocytes fécondés dans les espèces bovine et caprine (Carolan *et al.*, 1995, Cognié *et al.*, 2003).

Récemment, McPartlin *et al.* (2009) ont mis au point une technique de FIV qui permet d'obtenir 60% d'ovocytes fécondés (Tableau 1).

3. Conclusion

Aucune technique de FIV n'est efficace et ne peut être répétée pour l'instant dans l'espèce équine. Le taux de FIV (60%) obtenu avec la nouvelle technique de FIV (McPartlin *et al.*, 2009) n'atteint pas les 90-95% d'ovocytes fécondés obtenus chez les autres ongulés.

Dans l'espèce équine, les modifications des gamètes équins qui ont lieu avant la fécondation et les étapes de la fécondation semblent se dérouler comme chez les autres mammifères.

Cependant, les mécanismes mis en jeu lors de la fécondation ne sont pas entièrement connus dans l'espèce équine, ainsi que chez les autres mammifères. Les molécules intervenant dans chacune des étapes ne sont pas toutes identifiées. Le rôle de l'oviducte dans la fécondation n'est pas complètement étudié.

Objectif de l'étude

L'objectif principal de ma thèse était d'étudier les mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine. Cependant, l'étude de la fécondation *in vivo* est difficile car la fécondation a lieu dans l'oviducte. Une approche *in vitro* est donc nécessaire. Or, dans l'espèce équine, les techniques de FIV sont peu efficaces. Lors des différents essais de FIV que nous avons réalisés en collaboration avec les équipes travaillant dans ce domaine, nous avons observé que les spermatozoïdes équins s'attachaient à la zone pellucide sans la traverser. De plus, lorsque l'on crée un passage dans la zone pellucide par des techniques chimique (zona-drilling) ou mécanique (zona-dissection), les ovocytes équins sont fécondés par les spermatozoïdes équins (Choi *et al.*, 1994, Li *et al.*, 1995, Azuma *et al.*, 1995). La zone pellucide équine semble donc être une barrière pour les spermatozoïdes équins.

Pour clarifier les mécanismes de la fécondation et en particulier l'interaction des spermatozoïdes avec la zone pellucide, nous avons développé une approche comparative entre les espèces équine et porcine. En effet, dans l'espèce porcine, les taux de FIV sont très élevés (80 % à 90 %, Abeydeera and Day, 1997) et les spermatozoïdes porcins traversent très facilement et en grand nombre la zone pellucide. Les taux de polyspermie *in vitro* sont donc très élevés (50 à 70 %, Funahashi and Day, 1997).

La comparaison entre l'espèce équine (faible pénétration de la zone pellucide) et l'espèce porcine (forte pénétration de la zone pellucide) devrait mettre en évidence des similitudes et/ou des différences dans les mécanismes d'interaction des spermatozoïdes avec la zone pellucide. Ceci permettra de révéler les éléments clefs de ces mécanismes. Ces éléments permettront de mieux comprendre les mécanismes de la fécondation chez les équins et plus généralement chez les mammifères. De plus, ces éléments ouvriraient alors des pistes à suivre pour améliorer la technique de FIV dans l'espèce équine mais aussi dans l'espèce porcine.

Notre étude comparative a été réalisée selon deux approches :

- une approche mécanique (Article 1) :

Nous avons d'abord comparé les étapes de la fécondation entre les espèces équine et porcine. Pour cela, nous avons évalué l'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide, l'induction de la réaction acrosomique au contact de la zone pellucide, la pénétration de la zone pellucide et de la membrane plasmique par les spermatozoïdes et enfin, la formation des pronoyaux mâle et femelle.

Nous avons ensuite comparé la composition et la structure de la zone pellucide entre les espèces équine et porcine.

- une approche évolutive et moléculaire (Articles 2, 3, 4, 5) :

Nous avons d'abord identifié les protéines impliquées dans l'interaction des gamètes mâle et femelle chez les mammifères 1) sur la zone pellucide (Article 2) et 2) sur les membranes des gamètes mâle et femelle (Article 3).

Puis, nous avons étudié *in vitro* le rôle d'une protéine connue chez plusieurs mammifères, l'enzyme β -1,4-Galactosyltransferase, dans l'attachement des spermatozoïdes équins à la zone pellucide équine (Article 4).

Enfin, nous avons étudié *in vitro* l'influence des protéines sécrétées par les cellules d'oviducte équin et porcine sur la fécondation (Article 5).

Première partie :

Approche mécanique

Article 1: *New insights into the mechanisms of fertilization: comparison of the fertilization steps, the composition and the structure of the zona pellucida between horses and pigs.*

Mugnier S, Dell'Aquila E, Pelaez J, Douet C, Ambruosi B, De Santis T, Lacalandra GM, Lebos C, Sizaret P-Y, Delaleu B, Monget P, Mermillod P, Magistrini M, Meyers SA, Goudet G. *Biology of Reproduction*, 81, 856-870.

Article 1

Comparaison des étapes de la fécondation, de la composition et de la structure de la zone pellucide entre les modèles équin et porcin.

Nous avons émis l'hypothèse que la différence des taux de FIV entre les espèces équine et porcine pourrait être liée à une divergence des éléments clefs impliqués dans l'interaction des spermatozoïdes avec la zone pellucide. L'objectif de l'article 1 était de révéler ces éléments divergents entre ces deux modèles opposés.

Nous avons évalué la capacité des spermatozoïdes équins ou porcins :

- a) à se fixer sur la zone pellucide d'ovocytes équins ou porcins en mesurant le nombre de spermatozoïdes attachés à la zone pellucide après co-incubation des gamètes,
- b) à faire leur réaction acrosomique au contact de la zone pellucide équine ou porcine en mesurant le taux de réaction acrosomique des spermatozoïdes fixés sur la zone pellucide,
- c) à traverser la zone pellucide et la membrane plasmique des ovocytes équins ou porcins, en mesurant le taux de fécondation des ovocytes avec ou sans zone pellucide,
- d) à se décondenser dans l'ooplasmé équin ou porcin en mesurant le taux de fécondation après injection d'un spermatozoïde dans l'ooplasmé.

Nos résultats ont montré que, dans nos conditions expérimentales :

- a) Les spermatozoïdes équins et porcins s'attachent en aussi grand nombre à la zone pellucide équine, alors que peu de spermatozoïdes équins s'attachent à la zone pellucide porcine. La zone pellucide équine est donc moins sélective que la zone pellucide porcine.
- b) les spermatozoïdes équins sont moins compétents à faire leur réaction acrosomique que les spermatozoïdes porcins, quel que soient les zones pellucides.
- c) les spermatozoïdes équins ne traversent pas la zone pellucide équine ou porcine alors que les spermatozoïdes porcins ne traversent que la zone pellucide porcine.

Les spermatozoïdes équins ou porcins traversent la membrane plasmique des ovocytes équins et porcins, mais le taux de fusion est plus faible pour l'oolemma équin que pour l'oolemma porcin.

- d) les spermatozoïdes équins ou porcins se décondensent mieux dans les ovocytes équins que dans les ovocytes porcins.

Cette étude a montré que la zone pellucide est un élément clé lors de l'attachement et de la pénétration du spermatozoïde, alors que la capacité des spermatozoïdes est un élément mineur.

Nous avons donc comparé :

- a) la composition de la zone pellucide,
- b) la localisation des différentes glycoprotéines dans la zone pellucide,
- c) la structure de la zone pellucide,

entre les espèces équine et porcine, avant et après maturation *in vivo* et *in vitro*.

Nos résultats ont montré que :

- a) la zone pellucide équine est composée de 4 glycoprotéines alors que la zone pellucide porcine ne possède que trois de ces glycoprotéines.
- b) la localisation des trois glycoprotéines communes aux deux espèces est différente entre les zones pellucides équine et porcine.
- c) la structure des zones pellucides équine et porcine est différente : celle de l'espèce équine présente un réseau compact avec de petits pores alors que celle de l'espèce porcine présente un réseau lâche avec de grands pores.

En conclusion, la composition et la structure de la zone pellucide sont différentes entre ces deux espèces. Ceci pourrait avoir un lien avec les taux de pénétration des spermatozoïdes équins et porcins à travers la zone pellucide.

Deuxième partie :

Approches évolutive et moléculaire

Article 2: *Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates.* Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P. *Biology of Reproduction*, 2008, 78, 796-806

Article 3: *The genes involved in sperm-oocyte interactions in vertebrates: an evolutionary analysis.* Mugnier S, Meslin C, Pascal G, Callebaut I, Goudet G, Monget P, en préparation.

Article 4: *The involvement of β -1,4-Galactosyltransferase and N-Acetylglucosamine residues in fertilization has been lost in the horse.* Mugnier S, Boittin S, Douet C, Monget P, Magistrini M, Goudet G. *Reproductive Biology & Endocrinology*, 2008, 6, 51

Article 5: *The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: Are Osteopontin, Atrial Natriuretic Peptide A and Oviductin involved?* Mugnier S, Kervella M, Douet C, Canepa S, Deleuze S, Duchamp G, Monget P, Goudet G. *Reproductive Biology & Endocrinology* Accepté.

Article 2

Certains gènes *ZP* codant pour les glycoprotéines de la zone pellucide ont été progressivement perdus au cours de l'évolution.

L'approche mécanique a montré des différences de composition et de structure de la zone pellucide entre les espèces équine et porcine qui pourraient être liées à des différences dans les mécanismes d'interaction des spermatozoïdes avec la zone pellucide. Lors de cette étude, nous nous sommes heurtés à des problèmes de nomenclature des gènes de la famille *ZP*, qui créent de nombreuses confusions lors des études de la zone pellucide chez les mammifères.

L'objectif de l'article 2 était de clarifier la nomenclature des gènes de la famille *ZP* chez les vertébrés et d'en étudier l'évolution phylogénétique.

Pour cela, les séquences des différentes glycoprotéines composant la zone pellucide de 18 vertébrés ont été recherchées dans les banques de séquences protéiques ou nucléiques et comparées entre elles à l'aide d'outils bio-informatiques.

Cette analyse a permis d'identifier, chez les vertébrés, six familles de gènes : *ZPA/ZP2*, *ZPB/ZP4*, *ZPC/ZP3*, *ZP1*, *ZPAX* et *ZPD*. Chez les mammifères, la zone pellucide est composée :

- a) des 3 glycoprotéines *ZPA/ZP2*, *ZPC/ZP3* et *ZP1* chez la souris,
- b) des 3 glycoprotéines *ZPA/ZP2*, *ZPB/ZP4* et *ZPC/ZP3* chez le chien, le bovin et le porcin,
- c) des 4 glycoprotéines *ZPA/ZP2*, *ZPB/ZP4*, *ZPC/ZP3* et *ZP1* chez les primates et le rat.

Nous avons aussi montré la perte de gènes et l'apparition de pseudogènes : *ZP1* chez les bovins, les porcins et le chien, *Zpb/Zp4* chez la souris et *ZPAX* chez les mammifères.

En conclusion, la composition en glycoprotéines de la zone pellucide varie entre les mammifères. Ces différences de composition pourraient être responsables de divergences dans les mécanismes de reconnaissance des gamètes

Article 3

Analyse de l'évolution des gènes impliqués dans l'interaction des ovocytes avec les spermatozoïdes chez les vertébrés.

L'article 2 présentait l'évolution phylogénétique des glycoprotéines de la zone pellucide. Or, lors de la fécondation, la zone pellucide interagit avec les membranes et le contenu de l'acrosome du spermatozoïde. De plus, après la traversée de la zone pellucide par les spermatozoïdes, la membrane du spermatozoïde et celle de l'ovocyte fusionnent. Les molécules portées par les membranes du spermatozoïde et de l'oolemma doivent donc aussi être analysées.

L'objectif de l'article 3 était d'effectuer un inventaire des gènes codant pour les protéines impliquées dans les mécanismes d'interaction des spermatozoïdes avec la zone pellucide et avec l'oolemma et d'en étudier l'évolution phylogénétique.

Pour cela, nous avons listé à partir de la littérature les protéines pour lesquelles un rôle dans les mécanismes de la fécondation a été montré expérimentalement. Puis, nous avons recherché la présence des gènes codant pour ces protéines dans le génome de douze vertébrés à l'aide d'outils bioinformatiques.

Les résultats ont montré que la composition des membranes, de l'acrosome et de la zone pellucide est différente entre les espèces. Certaines protéines ont disparu ou sont apparues chez certaines espèces. En particulier, nous avons observé une différence entre les spermatozoïdes équin et porcin : les spermadhésines sont au nombre de 5 dans l'espèce porcine et de 2 dans l'espèce équine. En conclusion, chaque espèce a son propre jeu de protéines permettant la reconnaissance des gamètes.

Ce travail va se poursuivre en cherchant parmi ces gènes ceux qui évoluent sous sélection positive. Cette partie du travail sera réalisée en collaboration avec Camille Meslin, Isabelle Callebaut et Géraldine Pascal.

Article 4

La fonction de la β -1,4-galactosyltransférase et du résidu N-acétylglucosamine dans la fécondation a été perdue dans l'espèce équine

L'article 3 a montré que l'enzyme β -1,4-galactosyltransférase, localisée sur la membrane plasmique du spermatozoïde, est présente chez tous les vertébrés. Chez la souris et le bovin, cette protéine participe au mécanisme d'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide, en se fixant sur le résidu N-acétylglucosamine porté par la protéine ZPC/ZP3 de la zone pellucide. En revanche, chez le porc, elle n'est pas nécessaire pour l'attachement des spermatozoïdes.

L'objectif de l'article 4 était de vérifier si cette enzyme participait aux mécanismes d'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide dans l'espèce équine.

Pour cela, nous avons réalisé différents blocages de l'enzyme en co-incubant *in vitro* les spermatozoïdes équins avec un anticorps dirigé contre cette enzyme ou son substrat. D'autre part, nous avons bloqué son récepteur, le résidu N-acétylglucosamine, en co-incubant les ovocytes équins avec l'enzyme purifiée ou avec un anticorps dirigé contre la glycoprotéine ZPC/ZP3. Le nombre de spermatozoïdes fixés sur la zone pellucide était ensuite comptabilisé.

Les résultats ont montré que l'enzyme et son récepteur ne semblent pas nécessaires pour l'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide dans l'espèce équine comme dans l'espèce porcine.

Le rôle de cette enzyme diffère donc entre les espèces, même si elle est présente chez plusieurs mammifères. La fonction de cette protéine semble perdue chez les espèces équine et porcine au cours de l'évolution. Dans l'espèce équine, d'autres molécules sont donc responsables de l'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide.

Research

Open Access

The involvement of beta-1,4-galactosyltransferase and N-acetylglucosamine residues in fertilization has been lost in the horse

Sylvie Mugnier, Stéphane Boittin, Cécile Douet, Philippe Monget, Michèle Magistrini and Ghylène Goudet*

Address: INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, CNRS, Haras Nationaux, IFR 135, Université de Tours, F-37380 Nouzilly, France

Email: Sylvie Mugnier - sylvie.mugnier@tours.inra.fr; Stéphane Boittin - stephanebtt@hotmail.com; Cécile Douet - cecile.douet@tours.inra.fr; Philippe Monget - philippe.monget@tours.inra.fr; Michèle Magistrini - michele.magistrini@tours.inra.fr; Ghylène Goudet* - ghylene.goudet@tours.inra.fr

* Corresponding author

Published: 14 November 2008

Received: 9 September 2008

Reproductive Biology and Endocrinology 2008, 6:51 doi:10.1186/1477-7827-6-51

Accepted: 14 November 2008

This article is available from: <http://www.rbej.com/content/6/1/51>

© 2008 Mugnier et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: In human and rodents, sperm-zona pellucida binding is mediated by a sperm surface Galactosyltransferase that recognizes N-Acetylglucosamine residues on a glycoprotein ZPC. In large domestic mammals, the role of these molecules remains unclear: in bovine, they are involved in sperm-zona pellucida binding, whereas in porcine, they are not necessary. Our aim was to clarify the role of Galactosyltransferase and N-Acetylglucosamine residues in sperm-zona pellucida binding in ungulates. For this purpose, we analyzed the mechanism of sperm-zona pellucida interaction in a third ungulate: the horse, since the Galactosyltransferase and N-Acetylglucosamine residues have been localized on equine gametes.

Methods: We masked the Galactosyltransferase and N-Acetylglucosamine residues before the co-incubation of gametes. Galactosyltransferase was masked either with an anti-Galactosyltransferase antibody or with the enzyme substrate, UDP Galactose. N-Acetylglucosamine residues were masked either with a purified Galactosyltransferase or with an anti-ZPC antibody.

Results and discussion: The number of spermatozoa bound to the zona pellucida did not decrease after the masking of Galactosyltransferase or N-Acetylglucosamine. So, these two molecules may not be necessary in the mechanism of in vitro sperm-zona pellucida interaction in the horse.

Conclusion: The involvement of Galactosyltransferase and N-Acetylglucosamine residues in sperm-zona pellucida binding may have been lost during evolution in some ungulates, such as porcine and equine species.

Background

The enzyme Beta-1,4-galactosyltransferase I (GalTase) was one of the first molecules involved in sperm-egg interac-

tion that was studied [1,2]. GalTase was originally characterized for its role in oligosaccharide synthesis in the Golgi complex. At this location, GalTase adds galactose from

uridine diphosphate galactose (UDP-Galactose) to N-acetylglucosamine (GlcNAc) residues on growing glycoprotein chains. GalTase was localized to the surface of spermatozoa as a plasma membrane protein [3]. It binds to terminal GlcNAc residues on O-linked oligosaccharides of ZPC [4,3].

GalTase was identified and localized in acrosome region in the plasma membrane of spermatozoa from human [5], rodents (mouse, rat, guinea pig), rabbit and ungulates (bull, boar, stallion) [6]. In human, mouse, and hamster, *in vitro*, when the GalTase or GlcNAc are masked, the number of spermatozoa bound to the zona pellucida decreases [7,1,2,8]. Thus, in these species, GalTase and GlcNAc are involved in the mechanism of *in vitro* sperm-zona pellucida binding. In ungulates, the role of GalTase and GlcNAc remains unclear. In bovine, *in vitro* GalTase masking inhibits the binding of spermatozoa to the zona pellucida [9]. On the contrary, in porcine species, Rebeiz and Miller [10] showed that masking of GalTase and GlcNAc did not disturb the binding of spermatozoa to the zona pellucida. So, the involvement of GalTase and GlcNAc in sperm-zona pellucida binding in ungulates has to be clarified.

In another ungulate, the horse, few studies were performed to identify the molecules that play a role in sperm-egg binding. GalTase was localized on the equine sperm head [6] and GalTase activity was mostly confined to the plasma membrane of equine spermatozoa [11]. GlcNAc residues were also observed on the equine zona pellucida and co-localized with the glycoprotein ZPC [12]. The GalTase on the sperm head and GlcNAc residues on the ZPC glycoprotein could bind during equine sperm-zona pellucida interaction. However, in the horse, no data are available about the role of these molecules in sperm-zona pellucida binding.

Our aim was to study the role of GalTase and GlcNAc during *in vitro* sperm-zona pellucida interaction in equine, in order to clarify the role of these molecules in fertilization in ungulates.

Methods

Chemical products were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France) unless otherwise specified.

Equine oocytes collection and maturation

Equine ovaries collected from a local slaughterhouse were transported at 30–37°C to the laboratory in 0.9% (w/v) NaCl diluted in H₂O. Cumulus-oocyte-complexes (COCs) were aspirated from follicles using a 18.5 gauge needle at 50 mm Hg vacuum pressure before and after ovarian slicing.

In vitro maturation was performed in 500 µl of tissue culture medium 199 (TCM 199) supplemented with 50 ng ml⁻¹ Epidermal Growth Factor (EGF) [13] and 20% (v/v) Fetal Calf Serum (FCS). Maturation took place in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5°C for 30 hours. After *in vitro* culture, COCs were stripped of their cumulus cells with small glass pipettes in 500 µl Dulbecco's phosphate buffered saline solution (DPBS, Dulbecco A, Paris, France). The denuded oocytes were incubated in the IVF medium (see below).

Preparation of semen

In each experiment, we first tested fresh semen, then frozen semen.

Preparation of fresh semen

Fresh equine semen was collected from a Welsh pony stallion from our experimental stud using an artificial vagina. It was prepared according to Palmer et al. [14], because these conditions allow the best IVF rate when using fresh semen. Briefly, immediately after collection, sperm was filtered and diluted to 25 × 10⁶ spermatozoa ml⁻¹ in Hank's solution supplemented with 1% (w/v) BSA and 20 mmol l⁻¹ Hepes at pH 7.1 (HHBSA) [15]. It was preincubated at 37°C for 30 minutes in anaerobic conditions. Spermatozoa were then incubated with 6 µmol l⁻¹ of calcium ionophore A23187 (free acid) at 37°C for 5 minutes [16]. Spermatozoa were centrifuged for 3 minutes at 500 × g. The pellet was resuspended in HHBSA (25 × 10⁶ spermatozoa ml⁻¹). The motility was visually evaluated using an inverted epifluorescent microscope (Olympus, IMT-2, Paris, France).

Preparation of frozen semen

Two straws of semen (100 × 10⁶ spermatozoa ml⁻¹) from three Welsh pony stallions from our experimental stud were rapidly thawed during 30 seconds in a water bath at 37°C. Sperm was prepared according to Dell'Aquila et al. [17], because these conditions allow the best IVF rate when using frozen semen. Briefly, sperm cells were prepared using the swim-up procedure in Tyrode-lactate medium modified for sperm treatment (Sp-TALP). The chemical composition of Sp-TALP was Tyrode medium supplemented with 1 mmol l⁻¹ Pyruvate, 6 mg ml⁻¹ BSA (fatty acid free), 21 mmol l⁻¹ Lactate, 50 µg ml⁻¹ Gentamicine and 10 mmol l⁻¹ Hepes. Semen was layered (0.2 ml/tube) in a tilted Falcon tube under 1 ml Sp-Talp and incubated at 38.5°C for 1 hour in 5% CO₂ in air. The top (0.4 to 0.5 ml of medium) from each tube containing motile spermatozoa was removed, and the contents were pooled and centrifuged at 300 × g for 10 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in Sp-Talp for a total of 100 µl, then the concentration was calculated. The spermatozoa were diluted in Sp-TALP medium to 25 × 10⁶ spermatozoa ml⁻¹. The motility was

visually evaluated with an inverted epifluorescent microscope (Olympus, IMT-2).

IVF media

For fresh semen, the IVF medium was Synthetic Oviductal Fluid (SOF, for details of chemical composition, refer to Takahashi and First, [18] supplemented with 15% (v/v) FCS and 3.2 µg ml⁻¹ Gentamicine.

For frozen semen, the IVF medium was Tyrode-lactate medium modified for IVF treatment (Fert-TALP) as follows: Tyrode medium (100 mmol l⁻¹ NaCl, 3.1 mmol l⁻¹ KCl, 0.3 mmol l⁻¹ NaH₂PO₄·2H₂O, 2.1 mmol l⁻¹ CaCl₂, 0.4 mmol l⁻¹ MgCl₂·6H₂O, 10 mg ml⁻¹ Red Phenol, 25 mM NaHCO₃) supplemented with 1 mmol l⁻¹ Pyruvate, 6 mg ml⁻¹ fatty acid free Bovine Serum Albumine (BSA), 21 mmol l⁻¹ Lactate, 50 µg ml⁻¹ Gentamicine, 1 µg ml⁻¹ Heparine [17].

Experiment 1: GalTase masking with anti-GalTase antibodies

Assessment of the fixation of the anti-GalTase antibodies on spermatozoa

After spermatozoa preparation as previously described, diluted fresh or frozen spermatozoa were dried on slides at 37°C for 2 hours and fixed in ethanol/glacial acetic acid (95/5 v/v) for 10 minutes at -20°C in a humidified chamber. After fixation, each slide was dried at 37°C, covered with PBS-BSA solution (1% (w/v) fatty acid free BSA diluted in DPBS) for 1 hour and then, covered with anti-GalTase antibodies (Rabbit antiserum raised against bacterially expressed recombinant murine Beta-1,4-Galactosyltransferase I kindly donated by Dr. Barry Shur, [1]) or preimmune serum diluted 1/100 (as described by Larson and Miller [6]) in PBS-BSA solution for 2 hours.

Slides were washed with 1 ml PBS-BSA solution and covered with Fluoprobes 488-conjugated goat anti-rabbit antibodies (Goat anti-rabbit IgG F(AB')₂, Interchim, Montluçon, France) diluted 1/100 in PBS-BSA solution for 2 hours in a covered humidified chamber to reduce the light exposure. Each slide was washed with 1 ml PBS-BSA solution and covered with Moviol V4-88 (133 mg ml⁻¹, Hoechst, Frankfurt, Germany) and finally with a coverslip. Slides were kept in darkness at 4°C till examination using an inverted epifluorescent microscope (Olympus, IMT-2) at magnification ×400.

GalTase masking with anti-GalTase antibodies

After spermatozoa preparation as previously described, fresh or frozen spermatozoa were incubated with anti-GalTase antibodies or preimmune serum diluted 1/100 in Sp-TALP (frozen semen) or HHBSA (fresh semen) or no additive. The spermatozoa were incubated for 30 minutes at 38.5°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

In parallel, the *in vitro* matured oocytes (10 to 20 per well) were incubated with anti-GalTase antibodies or preimmune serum diluted 1/100 in the IVF medium (Fert-TALP or SOF) or no additive

Experiment 2: GalTase masking with UDP Galactose

After spermatozoa preparation as previously described, diluted fresh or frozen spermatozoa were incubated in HHBSA or sp-TALP with 10 mmol l⁻¹ UDP Galactose (substrate of GalTase) or 10 mmol l⁻¹ UDP Glucose (sugar which is not a substrate of GalTase) or no additive at 38.5°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air for 10 minutes.

In parallel, the *in vitro* matured oocytes (10 to 20 per well) were incubated in 500 µl IVF medium (Fert-TALP or SOF) with 10 mmol l⁻¹ UDP Galactose or 10 mmol l⁻¹ UDP Glucose or no additive for 10 minutes.

Experiment 3: GlcNAc masking with purified GalTase

Assessment of the GalTase fixation on the zona pellucida

After 30 hours of maturation, oocytes were incubated with 500 µg ml⁻¹ GalTase (Beta-1,4-galactosyltransferase I human, Sigma, Biochemika, Fluka, Switzerland) or no additive in Fert-TALP or SOF medium for 1 hour at 38.5°C in humidified atmosphere of 5% CO₂. The oocytes were fixed in 500 µl paraformaldehyde 2% in DPBS for 20 minutes at 37°C. After fixation, oocytes were washed with DPBS and incubated in PBS-BSA solution (5% (w/v) BSA in DPBS) for 1 hour at room temperature. The oocytes were incubated with anti-GalTase antibodies or preimmune serum diluted 1/50 in PBS-BSA solution for 2 hours at room temperature. After incubation, oocytes were washed with PBS-BSA solution and incubated in Fluoprobes 488-conjugated goat anti-rabbit antibodies diluted 1/100 in PBS-BSA for 2 hours in darkness at room temperature. Oocytes were washed with PBS-BSA solution, layed on a slide and covered with Moviol V4-88 and then, with a coverslip. Oocytes were kept in darkness at 4°C until examination using an inverted epifluorescent microscope (Olympus, IMT-2) at magnification ×400.

GlcNAc masking with purified GalTase

After 30 hours of maturation, oocytes (10 to 20 per well) were incubated in the IVF medium (Fert-TALP or SOF) with 500 µg ml⁻¹ GalTase or no additive for 1 hour at 38.5°C in humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. They were then transferred in IVF medium (Fert-TALP or SOF).

Experiment 4: ZPC masking with anti-ZPC antibodies

After 30 hours of maturation, oocytes (10 to 20 per well) were washed in PBS-BSA (2% (w/v) fatty acid free BSA in DPBS), and then incubated with anti-ZPC antibodies (chicken anti-ZPC antibodies against porcine ZPC diluted 1/100 in PBS-BSA; kindly donated by Dr Sabine Kölle;

[19]) or no additive for 1 hour at 38.5°C in humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

The oocytes were then transferred in IVF medium (Fert-TALP or SOF).

Gametes co-incubation and assessment of sperm-zona pellucida binding

After GalTase, GlcNAc or ZPC masking, the spermatozoa (final concentration of 5×10^5 cells ml⁻¹) and the oocytes (10 to 20 per well) with similar treatments were co-incubated in 500 µl IVF medium for 20 minutes at 38.5°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

After gametes co-incubation, oocytes were washed four times in DPBS in order to remove any unbound spermatozoa on the zona pellucida. Using an inverted microscope (Olympus IMT-2), the spermatozoa bound to the zona pellucida were counted in all focal plans at magnification $\times 400$ by a blinded observer.

Statistical analysis

For each experiment, due to the limited number of oocytes available on a single day, two to three replicates were performed. The mean and SEM of the number of spermatozoa bound to the zona pellucida per oocyte were

calculated in each group of oocytes (controls and masking). Depending on the experiment, we compared the mean number of spermatozoa between groups (3 groups in experiments 1 and 2, 2 groups in experiment 3 and 4). When a significant effect between groups was observed then we compared the groups in pairs. Statistical difference between group means was determined using an analysis of variance (ANOVA). The alpha level was 5% and P-values < 0.05 were considered significant.

Results

Experiment 1: GalTase masking with anti-GalTase antibodies

Assessment of the fixation of the anti-GalTase antibodies on spermatozoa

In order to ascertain the binding of anti-GalTase antibodies on the spermatozoa, equine spermatozoa were incubated with anti-GalTase antibodies or preimmune serum. On the spermatozoa incubated with antibodies, staining was intense on the acrosomal region (figure 1A). The spermatozoa incubated with preimmune serum did not exhibit any staining (figure 1B). Thus, anti-GalTase antibodies are able to bind to the plasma membrane in the acrosomal region of spermatozoa.

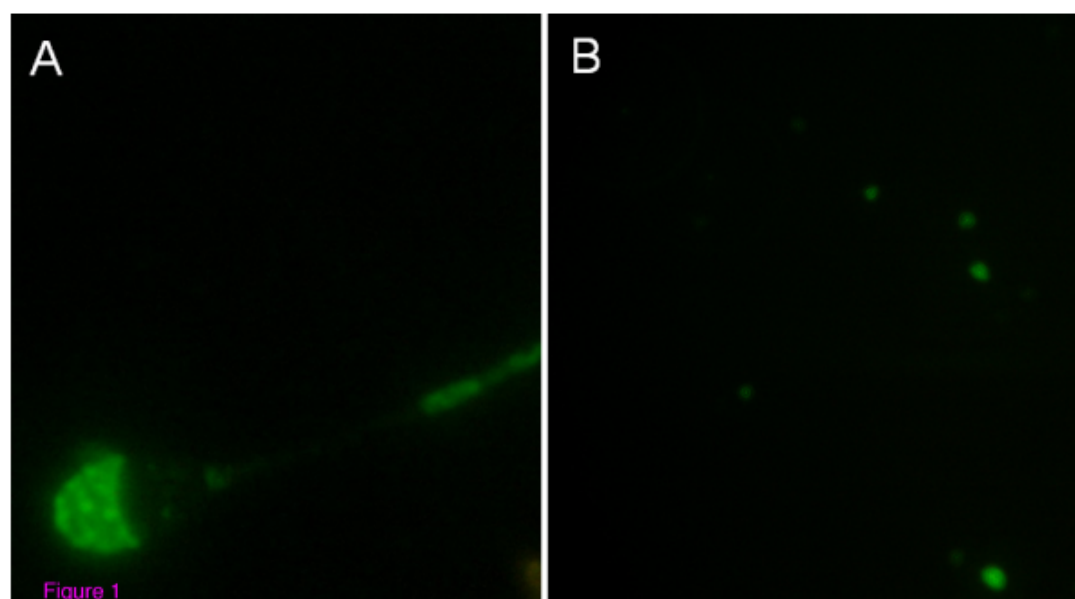


Figure 1
Spermatozoa incubated with anti-GalTase antibodies (A) or with preimmune serum (B). (Observation with an epifluorescent microscope at 400 $\times$ magnification).

GalTase masking with anti-GalTase antibodies

Table 1 shows that, when using fresh semen, the number of spermatozoa bound to the zona pellucida was not different between the three groups : anti-GalTase antibody, preimmune serum or no additive ($P > 0.05$).

When using frozen semen, fewer spermatozoa were fixed on the zona pellucida in the presence of anti-GalTase antibodies or no additive than in the presence of preimmune serum ($P < 0.001$; Table 1). However, the number of spermatozoa bound to the zona pellucida was not different between the oocytes incubated with the antibodies and those incubated without any additive ($P > 0.05$; Table 1).

Experiment 2: GalTase masking with UDP Galactose

The number of spermatozoa bound to the zona pellucida was not different after incubation with UDP Galactose or UDP Glucose or without any additive, when using fresh or frozen semen ($P > 0.05$; Table 2).

Experiment 3: GlcNAc masking with purified GalTase**Assessment of the GalTase fixation on the zona pellucida**

In order to ascertain the binding of GalTase on the zona pellucida, equine oocytes were incubated with GalTase or no additive and then, with anti-GalTase antibodies or preimmune serum. On the oocytes incubated with GalTase and anti-GalTase antibodies, the staining was intense on the zona pellucida (figure 2A). For the other conditions, no staining was observed on the oocytes (figure 2B, C, D). Thus, GalTase binds to the zona pellucida of oocytes.

GlcNAc masking with purified GalTase

The number of spermatozoa bound to the zona pellucida was not different after incubation with Galactosyltransferase or without any additive using fresh or frozen semen ($P > 0.05$; Table 3).

Experiment 4: ZPC masking with anti-ZPC antibodies

Table 4 shows that the number of spermatozoa bound to the zona pellucida was not different after incubation with anti-ZPC antibody or without any additive, when using fresh or frozen semen ($P > 0.05$; Table 4).

Discussion

As GalTase and GlcNAc are involved in sperm-zona pellucida binding in bovine, but not in porcine, our aim was to clarify the role of GalTase and GlcNAc in another ungulate. Our hypothesis was to know if GalTase and GlcNAc are involved in sperm-zona pellucida interaction in the horse. Our results show that these molecules are not essential for *in vitro* equine sperm-zona pellucida binding.

In the large domestic mammals, such as bull, boar and stallion, GalTase was localized on the plasma membrane of periacrosomal region of the sperm head [6,11]. Our experiments confirmed the GalTase localization on equine sperm. In order to investigate the role of GalTase, we analyzed sperm- zona pellucida binding when masking GalTase. The GalTase masking was performed with UDP Galactose as previously described in the mouse and in the pig or with anti-murine GalTase antibodies as previously described in the mouse and in the bull [2,10,9]. The percentage of sequence identity between horse and murine GalTase is 88%. We checked that in our *in vitro* conditions, the anti-GalTase antibodies previously used by Larson and Miller [6] in the equine, Lopez et al. [2] and Tengowski et al. [9] were actually able to bind the plasma membrane of the equine spermatozoa. Our results showed that, in our *in vitro* conditions, when using fresh or frozen semen, the GalTase masking did not modify sperm- zona pellucida binding, suggesting that GalTase alone is not necessary for the binding of spermatozoa to the zona pellucida in the horse. Previous reports demonstrated that, in porcine, blocking GalTase did not affect sperm- zona pellucida binding [10]. Thus, GalTase may not be essential for sperm- zona pellucida binding in equine and porcine species. On the contrary, in bovine, during *in vitro* gametes co-incubation, GalTase plays a role in the sperm-zona pellucida binding: GalTase masking with anti-GalTase antibodies decreased the number of spermatozoa bound to the zona pellucida [9]. Thus, the involvement of GalTase in sperm-zona pellucida binding may be different between species within the ungulates.

Table 1: Number of fresh or frozen spermatozoa bound to the zona pellucida per oocyte after incubation of spermatozoa with anti-GalTase antibodies, preimmune serum or without any additive.

Groups		Anti-Galactosyltransferase antibodies	Preimmune serum	No additive
Fresh semen	No. Oocytes	31	28	28
	Spermatozoa/oocyte (mean $\pm$ SEM, n = 3)	99 $\pm$ 10	97 $\pm$ 9	112 $\pm$ 9
Frozen semen	No. Oocytes	37	37	36
	Spermatozoa/oocyte (mean $\pm$ SEM, n = 2)	10 $\pm$ 1 ^a	19 $\pm$ 2 ^b	7 $\pm$ 1 ^a

a, b: statistical difference between the columns in the same line (for fresh semen $F = 0.72$ and $p = 0.49$, for frozen semen $F = 19.78$ and $p < 0.001$)
n: number of replicates

Table 2: Number of fresh or frozen spermatozoa bound to the zona pellucida of oocytes incubated with UDP Galactose, UDP Glucose or without any additive.

Groups		UDP Galactose	UDP Glucose	No additive
Fresh semen	No. Oocytes	35	34	33
	Spermatozoa/oocyte (mean $\pm$ SEM, n = 3)	42 $\pm$ 6	47 $\pm$ 7	64 $\pm$ 11
Frozen semen	No. Oocytes	37	38	38
	Spermatozoa/oocyte (mean $\pm$ SEM, n = 2)	29 $\pm$ 3	30 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2

No statistical difference was observed between the columns in the same line (for fresh semen $F = 1.97$ and $p = 0.14$, for frozen semen $F = 0.17$ and $p = 0.84$)

n: number of replicates

In the horse, we showed previously that GlcNAc residues were present on the equine zona pellucida and co-localized with the glycoprotein ZPC [12]. These data suggest that GlcNAc may be linked to ZPC as observed in the mouse [3,4]. In order to investigate the role of GlcNAc in sperm-zona pellucida binding, we masked these residues with purified GalTase as previously described in the mouse [2]. In our *in vitro* conditions, we ascertained the binding of purified GalTase to the ZP. We also masked the ZPC protein with anti-ZPC antibodies, in order to decrease the accessibility of the GlcNAc residues. We ascertained previously the binding of anti-porcine ZPC antibodies on the equine zona pellucida [12]. Moreover, the percentage of sequence identity between horse and porcine ZPC is 76%. Our results showed that, in our *in vitro* conditions, when using fresh or frozen semen, the GlcNAc masking did not modify the binding of spermatozoa to the zona pellucida. Similar results were observed in the porcine species: removal of the GlcNAc residues by incubation of oocytes with N-Acetylglucosaminidase did not affect sperm-zona pellucida binding [10]. Thus, in horse and pig, GlcNAc residues are not essential for gametes interaction. On the contrary, in the mouse, incubation of oocytes with N-Acetylglucosaminidase decreased the number of spermatozoa bound to the zona pellucida

[1]. In addition, the presence of purified GalTase produced a dose-dependant inhibition of sperm binding to the zona pellucida [2]. In human and hamster, the presence of GlcNAc before or during *in vitro* male and female gametes co-incubation, reduced the ability of spermatozoa to bind to the zona pellucida [7,8]. Thus, in human and rodents, GlcNAc participates in the *in vitro* sperm-zona pellucida binding, whereas in horse and pig, GlcNAc may not be essential.

In summary, GalTase and GlcNAc residues are involved in sperm-zona pellucida binding in human and rodents, as well as bovine. On the contrary, GalTase and GlcNAc residues are not essential in porcine and equine species. A schematic tree of life (according to [20]) showing the involvement of GalTase and/or GlcNAc in sperm-zona pellucida binding in mammals is presented in Figure 3. In human and rodents, the role of GalTase and GlcNAc in sperm-zona pellucida binding seems to be maintained during evolution. Among ungulates, the role of GalTase and GlcNAc may have been lost during evolution in pigs and horses, but not in cattle. To our knowledge, no data are available about the involvement of GalTase and GlcNAc in sperm-zona pellucida binding in dog and cat. If GalTase and GlcNAc residues are not essential in dog and

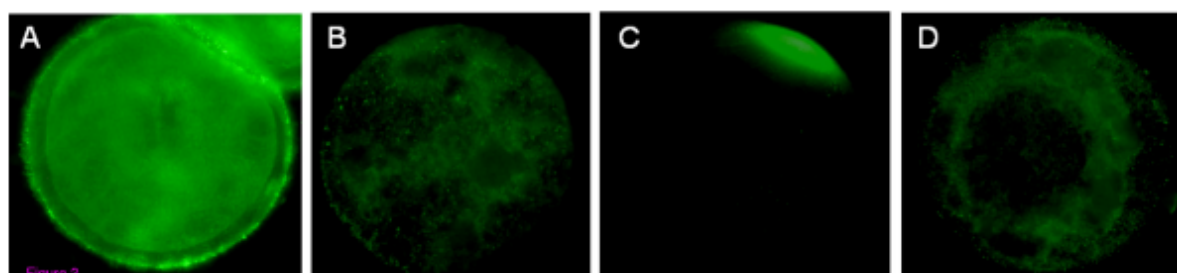


Figure 2
Equine oocytes incubated with GalTase and with anti-GalTase antibodies (A) or preimmune serum (B); equine oocytes incubated without GalTase and with anti-GalTase antibodies (C) or preimmune serum (D). (Observation with an epifluorescent microscope at 400 $\times$ magnification).

Table 3: Number of fresh or frozen spermatozoa bound to the zona pellucida per oocyte incubated with or without purified GalTase.

Groups		Galactosyltransferase	No additive
Fresh semen	No. Oocytes	43	42
	Spermatozoa/oocyte (mean $\pm$ SEM, n = 3)	99 $\pm$ 6	104 $\pm$ 12
Frozen semen	No. Oocytes	40	40
	Spermatozoa/oocyte (mean $\pm$ SEM, n = 2)	89 $\pm$ 5	91 $\pm$ 7

No statistical difference was observed between the columns in the same line (for fresh semen $F = 0.14$ and $p = 0.70$, for frozen semen $F = 0.06$ and $p = 0.80$)

n: number of replicates

cat, the involvement of these molecules would have been maintained only in cattle. Further studies are necessary to clarify this point. Whether GalTase gene is subjected to positive selection during evolution remains to be investigated. Of note, genes involved in reproduction and in sperm-egg interaction such as sperm-specific genes are under fast evolution [21].

In equine species, GalTase and GlcNAc are not essential for sperm-zona pellucida interaction, but other molecules could be involved. For example, in the equine spermatozoa, HSP-7 could play a potential role in sperm-zona pellucida interaction. This 14 kDa protein, isolated from stallion seminal plasma, belongs to the spermadhesin protein family, sharing 98% sequence identity with the porcine seminal plasma protein AWN-1 [22]. Like its boar homolog, HSP-7 is able to bind to the zona pellucida [23]. Some other molecules, localized on the plasma membrane of the spermatozoa in other mammals, could play a role in the equine species: SED1, fertilin β and peroxiredoxin 5 identified in the porcine species, ADAM2-ADAM3 complex on the mouse spermatozoa, N-Acetylglucosaminidase in the human spermatozoa and Arylsulfatase A in the mouse or the pig [24-27], [28] for review, [29] for review. On the zona pellucida, several carbohydrate domains could be involved in sperm binding: O- and N-linked chains, the nonreducing terminal β -galactosyl residues and the alpha D mannose residues

seem to participate in the mechanism of porcine sperm-zona pellucida binding [30-33]. Moreover, sperm binding could involve protein domains. In mouse, the sperm receptor on the zona pellucida would be the ZPC polypeptide because deglycosylated ZPC inhibited the sperm-zona pellucida binding [34]. In human, binding of sperm to zona proteins does not require the presence of glycan moieties [35]. Finally, sperm-zona pellucida binding may involve a multimeric complex incorporating several discrete molecular entities. For example, sperm from GalTase-null mouse is still able to fertilize the oocytes *in vivo*, though it is less able to undergo the acrosome reaction, penetrate the zona pellucida and fertilize the oocyte *in vitro* [36]. Mouse oocytes with lacking terminal GlcNAc residues are able to be fertilized *in vivo* [37]. Thus, *in vivo*, it is likely that compensatory processes enable sperm-ZP binding due to redundant gamete receptors. Finally, sperm binding could be dependent on a species specific supra-molecular structure of the zona matrix, zona pellucida proteins constituting a three-dimensional structure to which sperm would bind [38].

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SM, GG, MM and PM participated in the design of the study. SM, GG and PM wrote the manuscript. SM, SB, CD

Table 4: Number of fresh or frozen spermatozoa bound to the zona pellucida of oocytes incubated with or without anti-ZPC antibodies.

Groups		Anti-ZPC antibodies	No additive
Fresh semen	No. Oocytes	31	32
	Spermatozoa/oocyte (mean $\pm$ SEM, n = 2)	60 $\pm$ 6	58 $\pm$ 5
Frozen semen	No. Oocytes	39	39
	Spermatozoa/oocyte (mean $\pm$ SEM, n = 2)	71 $\pm$ 7	64 $\pm$ 8

No statistical difference was observed between the columns in the same line (for fresh semen $F = 0.05$ and $p = 0.82$, for frozen semen $F = 0.44$ and $p = 0.51$)

n: number of replicates

	Localization of GalTase	Involvement of GalTase and/or GlcNAc
Mouse	yes	yes
Rat	yes	?
Hamster	?	yes
Guinea pig	yes	?
Rabbit	yes	?
Human	yes	yes
Cattle	yes	yes
Pig	yes	no
Dog, cat	?	?
Horse	yes	no

Figure 3
Simplified tree of life showing the localization of GalTase on the spermatozoa, or the involvement of GalTase and/or GlcNAc in sperm-zona pellucida binding in mammals.

and GG performed gametes collection and preparation, and masking experiments. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We acknowledge Jean-Marie Yvon, Yvan Gaude, Gaël Ramé and the staff of the experimental stud for technical assistance and Marianne Vidament for critical reading of the manuscript. We thank Dr. Barry Shur and Dr. Sabine Kölle for kindly donation of antibodies. We thank 'Les Haras Nationaux' in France for financial support. Sylvie Mugnier is a PhD student financially supported by 'Les Haras Nationaux' and 'Le Conseil Régional de la Région Centre' in France.

References

- Shur BD, Hall NG: A role for mouse sperm surface β 1,4 Galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *The journal of cell biology* 1982, **95**:574-579.
- Lopez LC, Bayna EM, Litoff D, Shaper NL, Shaper JH, Shur BD: Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *The journal of cell biology* 1985, **101**:1501-1510.
- Shur BD: Glycosyltransferases as cell adhesion molecules. *Current Opinion Cell Biology* 1993, **5**:854-863.
- Miller DJ, Macek MB, Shur BD: Complementarity between sperm surface β 1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 1992, **357**:589-593.
- Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD: Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenic maturation in men: relationship among plasma membrane β 1,4-Galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biology of Reproduction* 1997, **56**:1020-1024.
- Larson JL, Miller DJ: Sperm from a variety of mammalian species express β 1,4 Galactosyltransferase on their surface. *Biology of Reproduction* 1997, **57**:442-453.
- Miranda PV, Gonzalez-Echeverria F, Marin-Briggiler CI, Brandelli A, Blaquier JA, Tezon JG: Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro. *Molecular Human Reproduction* 1997, **3**(5):399-404.
- Zitta K, Wertheimer E, Miranda PV: Analysis of the participation of N-acetylglucosamine in the different steps of sperm-zona pellucida interaction in hamster. *Molecular Human Reproduction* 2004, **10**(12):925-933.
- Tengowski MW, Wassler MJ, Shur BD, Schatten G: Subcellular localization of beta-1,4-Galactosyltransferase on Bull sperm and its function during sperm-egg interaction. *Molecular Reproduction and Development* 2001, **58**:236-244.
- Rebeiz M, Miller DJ: Porcine sperm surface β 1,4 Galactosyltransferase binds to the zona pellucida but is not necessary or sufficient to mediate sperm-zona pellucida binding. *Molecular Reproduction and Development* 1999, **54**:379-387.
- Fayer-Hosken RA, Caudle AB, Shur BD: Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. *Molecular Reproduction and Development* 1991, **28**:74-78.
- Kölle S, Dubois CS, Caillaud M, Lahuec C, Sinowatz F, Goudet G: Equine zona protein synthesis and ZP structure during folliculogenesis, oocyte maturation, and embryogenesis. *Molecular Reproduction and Development* 2007, **74**(7):851-859.
- Goudet G, Belin F, Młodowska W, Bezard J: Influence of Epidermal Growth Factor on in vitro maturation of equine oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 2000, **56**:483-492.
- Palmer E, Bezard J, Magistrini M, Duchamp G: In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl* 1991, **44**:375-384.
- Bezard J, Magistrini M, Duchamp G, Palmer E: Chronology of equine fertilization and embryonic development in vivo and in vitro. *Equine Veterinary Journal Suppl* 1989, **8**:105-110.

16. Magistrini M, Palmer E: **Motility, triple stain and electron microscopic analysis of spermatozoa treated with ionophore A23187 for in vitro fertilization.** *J Reprod Fertil Suppl* 1991, 44:661-663.
17. Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F: **In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season.** *Theriogenology* 1995, 45:547-560.
18. Takahashi Y, First NL: **In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamin.** *Theriogenology* 1992, 37:963-978.
19. Kolle S, Sinowatz G, Boie G, Palma G: **Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte and embryo.** *Molecular Reproduction and Development* 1998, 49:435-443.
20. Arnason U, Adegoke JA, Gullberg A, Harley EH, Janke A, Kullberg M: **Mitogenomic relationships of placental mammals and molecular estimates of their divergences.** *Gene* 2008, 421(1-2):37-51.
21. Torgerson DG, Kulathinal RJ, Singh RS: **Mammalian sperm proteins are rapidly evolving: evidence of positive selection in functionally diverse genes.** *Mol Biol Evol* 2002, 19(11):1973-1980.
22. Töpfer-Petersen E, Calvete JJ: **Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules: structure-function correlations of boar spermadhesins.** *J Reprod Fertil Suppl* 1996, 50:55-61.
23. Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Töpfer-Petersen E: **Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family.** *European Journal of Biochemistry* 1996, 242(3):636-40.
24. Ensslin MA, Vogel T, Calvete JJ, Thole HH, Schmidtke J, Matsuda T, Töpfer-Petersen E: **Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins.** *Biology of Reproduction* 1998, 58:1057-1064.
25. Ensslin MA, Shur BD: **Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding.** *Cell* 2003, 114:405-417.
26. van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Brouwers JF, Gadella BM: **Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte.** *Molecular Human Reproduction* 2007, 13(7):445-454.
27. Perez Martinez SL, Menendez Helman RJ, Zitta KS, Brandelli A, Miranda PV: **Characterization of human sperm N-acetylglucosaminidase.** *International Journal of Andrology* 2007, 31(3):315-24.
28. Okabe M, Cummins JM: **Mechanism of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals.** *Cell Molecular Life Science* 2007, 64:1945-1958.
29. Nixon B, Aitken RJ, McLaughlin EA: **New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction.** *Cell Molecular Life Science* 2007, 64:1805-1823.
30. Yurewicz EC, Pack BA, Sacco AG: **Isolation, composition, and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida 55 K glycoproteins.** *Molecular Reproduction and Development* 1991, 30(2):126-134.
31. Kudo K, Yonezawa N, Katsumata T, Aoki H, Nakano M: **Localization of carbohydrate chains of pig sperm ligand in the glycoprotein ZPB of egg zona pellucida.** *European Journal of Biochemistry* 1998, 252:492-499.
32. Yonezawa N, Amari S, Takahashi K, Ikeda K, Imai K, Kanai S, Kikuchi K, Nakano M: **Participation of the nonreducing terminal β -Galactosyl residues of the neutral N-Linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding.** *Molecular Reproduction and Development* 2005, 70:222-227.
33. Song X, Li F, Cao G, Zhang J, Han Y: **Distribution of alpha-D-mannose residues on zona pellucida and their role in fertilization in pigs.** *Science in China. Series C, Life sciences* 2007, 50(2):170-7.
34. Li D, Shaofeng CAO, Xu C: **Polypeptide backbone derived from carboxyl terminal of mouse ZP3 inhibits sperm-zona binding.** *Molecular Reproduction and Development* 2007, 74:1327-1336.
35. Chakravarty S, Kadunganattil S, Bansal P, Sharma RK, Gupta SK: **Relevance of glycosylation of human zona pellucida glycoproteins or their binding to capacitated human spermatozoa and subsequent induction of acrosomal exocytosis.** *Molecular Reproduction and Development* 2008, 75:75-88.
36. Lu Q, Shur BD: **Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly.** *Development* 1997, 124(20):4121-31.
37. William SA, Xia L, Cummings RD, McEver RP, Stanley P: **Fertilization in mouse does not require terminal galactose or N-Acetylglucosamine on the zona pellucida glycans.** *Journal of Cell Science* 2007, 120:1341-1349.
38. Hoodboy T, Dean J: **Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals.** *Reproduction* 2004, 127:417-422.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:

http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Article 5

Les sécrétions des cellules épithéliales de l’oviducte augmentent les taux de fécondation *in vitro* équine : l’Ostéopontine, l’Atrial Natriuretic Peptide A et l’Oviductine sont-elles impliquées ?

Les articles précédents (2, 3 et 4) portaient sur les molécules portées par le spermatozoïde et l’ovocyte. L’article 5 est focalisé sur l’étude des molécules sécrétées par l’oviducte qui est le troisième acteur de la fécondation.

Notre premier objectif était de vérifier que les molécules sécrétées par l’oviducte jouent un rôle dans la fécondation équine. Le deuxième objectif était d’identifier ces molécules dans l’espèce équine. Certaines d’entre elles ont été étudiées chez les bovins, les porcins et l’humain : l’ostéopontine, l’atrial natriuretic peptide A (ANP A) et l’oviductine.

Nous avons co-incubé les gamètes équins en présence ou en absence de cellules d’oviducte porcine. Nos résultats ont montré que la présence des cellules d’oviducte porcine améliorait les taux de FIV équine.

Par la suite, nous avons co-incubé les gamètes équins avec les cellules d’oviducte dans différentes conditions. Nos résultats ont montré que les taux de FIV équine n’étaient pas significativement différents :

- a) entre les cellules d’oviducte équine et porcine,
- b) entre les complexes ovocyte-cumulus intact et les ovocytes dénudés,
- c) entre les cellules d’oviducte préalablement stimulées avec une hormone (hCG, LH, oestradiol ou l’association LH et oestradiol) et non stimulées,
- d) et enfin, entre les ovocytes issus de maturation *in vivo* et *in vitro*.

Pour répondre au deuxième objectif, nous avons d’abord vérifié la présence des gènes codant pour l’oviductin, l’ostéopontine et l’ANP A dans le génome équin. Nos résultats ont montré

que les gènes codant pour l'ostéopontine et l'ANP A sont présents. Par contre, le gène codant pour l'oviductine semble avoir été perdu au cours de l'évolution dans l'espèce équine.

Ensuite, nous avons détecté la présence de l'ostéopontine et de l'ANP A dans le fluide d'oviducte équin à différents stades du cycle.

Enfin, nous avons testé *in vitro* l'effet de l'ostéopontine et de l'ANP A sur la fécondation équine. Aucun effet significatif de l'une ou l'autre des protéines n'a été mis en évidence.

En conclusion, notre étude montre un effet bénéfique des cellules d'oviducte homologue ou hétérologue sur les taux de FIV équine. Toutefois, ces taux restent bas. D'autres études seront nécessaires pour clarifier le rôle de l'ostéopontine et de l'ANP A sur la fécondation équine et pour identifier les protéines de l'oviducte impliquées dans les mécanismes de la fécondation équine.

Discussion et conclusions générales

Ma thèse avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine. Nos approches mécanique, évolutive et moléculaire ont permis de répondre à notre objectif en apportant de nouveaux éléments de compréhension sur les mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine et de nouveaux éléments concernant les faibles taux de fécondation *in vitro* (FIV).

Nouveaux éléments de compréhension des mécanismes de la fécondation

De nouveaux éléments ont été apportés pour clarifier les mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine et plus généralement chez les mammifères.

1) La composition des gamètes et la structure de la zone pellucide semblent être des éléments essentiels dans les mécanismes de la fécondation.

Les résultats de l'article 1 ont montré que lors de la FIV hétérologue, les spermatozoïdes équins et porcins étaient capables de se fixer à la zone pellucide, de faire leur réaction acrosomique à son contact mais étaient incapables de la traverser. Cependant, lorsque la zone pellucide est éliminée, le blocage est levé. La barrière d'espèce entre les espèces équine et porcine se situe au niveau de la zone pellucide, mais plus précisément, après le déclenchement de la réaction acrosomique d'après nos résultats. Dans l'article 1, les comparaisons de la composition et de la structure de la zone pellucide entre les espèces équine et porcine ont révélé des différences : 1) l'absence de ZP1 dans la zone pellucide porcine, 2) une localisation différente des glycoprotéines ZPA/ZP2, ZPB/ZP4 et ZPC/ZP3 et 3) une structure différente de la zone pellucide. De plus, dans l'article 3, l'étude des gènes a montré que le génome porcine contient 5 gènes de la famille des spermadhésines alors que le génome équin n'en contient que 2. Dans l'espèce porcine, les protéines codées par ces 5 gènes ont été localisées sur les spermatozoïdes (Veselský *et al.*, 1999, Cabellero *et al.*, 2004 et 2005). Dans l'espèce équine, une des spermadhésines, HSP7 (orthologue de la spermadhésine AWN1 porcine), a été localisée sur les spermatozoïdes (Reinert *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que les molécules mises en jeu dans les mécanismes intervenant après le déclenchement de la réaction acrosomique seraient différentes entre ces deux espèces. Nous avons observé que la localisation de la protéine ZPA/ZP2 était très différente entre les espèces équine et porcine. De plus, la protéine ZP1 existe dans l'espèce équine mais pas dans l'espèce porcine. Nous pouvons émettre l'hypothèse que dans l'espèce équine, ZP1 et ZPA/ZP2 pourraient être impliquées dans les mécanismes intervenant après le déclenchement de la réaction

acrosomique. Le rôle de ces molécules reste à étudier. Ce rôle pourrait être soit direct soit indirect en agissant sur la structure de la zone pellucide (qui est différente entre les deux espèces). Enfin, nous pouvons faire l'hypothèse que le jeu de spermadhésines, différent entre les espèces équine et porcine, pourrait empêcher la fécondation hétérologue entre ces espèces.

D'autres travaux ont montré que les spermatozoïdes humains ne sont pas capables de fusionner avec la membrane plasmique des ovocytes porcins (Canovas *et al.*, 2007). Ceci suppose que les molécules du spermatozoïde humain ne reconnaissent pas les molécules sur la membrane plasmique porcine. Dans l'article 3, nous avons montré que parmi les gènes étudiés, *ADAM3* est présent dans le génome porcine mais a été perdu au cours de l'évolution dans le génome humain. Cette molécule pourrait donc être un élément clef dans l'espèce porcine. Nous pouvons donc supposer que si *ADAM3* est bien présente sur la membrane acrosomique interne et/ou sur la membrane du segment équatorial du spermatozoïde porcine, elle pourrait participer aux mécanismes de fusion dans l'espèce porcine. Cette hypothèse reste à vérifier.

Par ailleurs, certains mécanismes sont possibles entre les gamètes provenant d'espèces différentes car les molécules mises en jeu sont présentes dans les deux espèces. En effet, nos résultats de l'article 1 montrent que les spermatozoïdes équins ou porcins sont capables de fusionner avec l'oolemma équin et porcine. De plus, nous montrons dans l'article 3 qu'au niveau de l'interaction des spermatozoïdes avec l'oolemma, la plupart des protéines semblent présentes dans les espèces équines et porcines. Les molécules impliquées dans les mécanismes de fusion seraient donc communes aux deux espèces.

Nos études ont porté principalement sur les protéines connues dans la littérature pour jouer un rôle dans les mécanismes de la fécondation chez une ou deux espèces. Cette liste n'est donc pas exhaustive. Les études sur la composition en protéines des gamètes doivent donc être poursuivies. De nombreuses protéines ont été identifiées sur les membranes et dans le sac acrosomique des spermatozoïdes murins par des analyses protéomiques (Stein *et al.*, 2006). De plus, les protéines sont souvent des glycoprotéines comme celles qui composent la zone pellucide, et les groupements sucrés qu'elles portent pourraient jouer un rôle. Dans l'espèce porcine, les sucres semblent intervenir dans les mécanismes de la fécondation (Yonezawa *et al.*, 2005 ; Song *et al.*, 2007). Il serait intéressant d'envisager l'identification des sucres présents sur les gamètes équins et l'étude de leur rôle dans la fécondation équine.

2) Les mêmes molécules peuvent être présentes sur les gamètes de plusieurs espèces mais peuvent avoir des fonctions différentes.

L'enzyme β -1,4-Galactosyltransférase ne joue pas de rôle dans les mécanismes de fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide dans les espèces équine (Article 4) et porcine (Rebeiz et Miller, 1999) contrairement aux espèces murine (Shur et Hall, 1982) et bovine (Tengowski et al, 2001). Or, dans l'article 3, nous montrons que cette protéine est présente dans les banques de protéines chez tous les mammifères et semble bien conservée entre les mammifères. Des études antérieures avaient localisé cette enzyme sur les spermatozoïdes de souris, d'étalon, de porc et de bovin (Larson et Miller, 1997). Ces résultats suggèrent que les molécules peuvent avoir un rôle différent entre les espèces même si elles sont présentes chez tous les mammifères. Plusieurs protéines ont été identifiées dans la banque de protéines de l'espèce équine. Cependant, elles peuvent ne pas être exprimées sur les gamètes équins, ou ne pas jouer de rôle dans l'interaction gamétique. Pour étudier à quelles étapes de la fécondation ces protéines participent, la démarche suivante pourrait être envisagée : 1) choisir les protéines spécifiques d'une espèce ou conservées entre les espèces, 2) vérifier leur localisation sur les gamètes à l'aide de marquages immunohistochimiques, 3) bloquer ces molécules, par exemple à l'aide d'un anticorps dirigé contre celles-ci, puis 4) co-incuber les gamètes et 5) évaluer le nombre de spermatozoïdes fixés sur la zone pellucide, le taux de réaction acrosomique et le taux de pénétration des ovocytes avec ou sans zone pellucide.

3) La fécondation dans l'espèce équine, comme dans les autres espèces, fait intervenir un troisième acteur : l'oviducte.

Dans l'article 5, nos résultats ont montré que les sécrétions des cellules de l'oviducte équin ou porcin participent aux mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine. C'est la première fois que le rôle de l'oviducte dans la fécondation a été mis en évidence dans l'espèce équine. Les sécrétions des cellules de l'oviducte porcin et équin possèdent des molécules communes qui ont un effet positif sur la fécondation équine. Afin de clarifier le rôle de l'oviducte, nous pourrions identifier les protéines de l'oviducte dans les banques de protéines chez les mammifères comme dans l'article 3. Puis, nous pourrions vérifier la présence de ces protéines dans le fluide d'oviducte équin par Western blot et par la technique de résonance plasmonique de surface comme dans l'article 5. Nous pourrions ensuite étudier l'influence de chacune de ces protéines détectées dans le fluide d'oviducte équin, sur les taux de FIV équine. Pour cela, nous pourrions co-incuber une ou plusieurs de ces protéines avec les gamètes équins puis

évaluer le taux de FIV. De plus, nous pourrions étudier à quelle étape de la fécondation les protéines de l'oviducte interviennent. Pour cela, les gamètes équins pourraient être co-incubés avec une ou plusieurs de ces protéines de l'oviducte. A l'issue de cette co-incubation, le nombre de spermatozoïdes attachés à la zone pellucide, le taux de réaction acrosomique au contact de la zone pellucide ainsi que le taux de pénétration dans l'ovocyte avec ou sans zone pellucide seraient évalués. Par ailleurs, nous pourrions étudier les associations des protéines de l'oviducte avec les gamètes en mesurant l'affinité entre ces protéines et les gamètes à l'aide de la technique de résonance plasmonique de surface. Ceci permettrait de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la fécondation.

4) L'espèce équine a mis en place sa propre stratégie au niveau des mécanismes d'interaction des spermatozoïdes avec l'ovocyte au cours de l'évolution.

Nous avons pu observer que la composition de la zone pellucide équine était différente de celle des autres ongulés et que sa structure était différente de celle de la zone pellucide porcine. De plus, dans l'espèce équine, au cours de l'évolution, certains gènes codant pour les protéines impliquées dans les mécanismes d'interaction des gamètes ont été perdus (par exemple *ZPAX* qui code pour une glycoprotéine de la zone pellucide chez les poissons et oiseaux) ou ne sont pas apparus (par exemple *ZP3R* qui code pour la protéine murine SP56, *FUT5* qui code pour la Fucosyltransférase 5 chez les primates). Par ailleurs, nous avons pu observer que le gène *OVGP1* a été perdu au cours de l'évolution dans l'espèce équine comme chez le rat (Tian *et al.*, 2009). Or, l'oviductine codée par l'*OVGP1* participe aux mécanismes de la fécondation en limitant la polyspermie dans l'espèce porcine (Coy *et al.*, 2008). En outre, la β -1,4-Galactosyltransférase présente sur les spermatozoïdes équins, porcins, bovins et murins ne semble pas jouer de rôle dans les mécanismes d'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide dans les espèces équine et porcine contrairement aux espèces murine et bovine. Les différences observées tout au long de la thèse montrent que la stratégie dans les mécanismes de la fécondation a divergé entre les ongulés au cours de l'évolution, et en particulier pour l'espèce équine.

5) Intérêt de l'approche évolutive pour cibler les protéines pouvant être étudiées dans les mécanismes de la fécondation.

Notre approche évolutive a permis de cibler les protéines dont les gènes semblent conservés entre les mammifères et celles qui ont divergé entre les espèces par perte ou naissance de

gènes. Ceci nous a permis d'avoir une liste de protéines pouvant jouer un rôle dans la fécondation équine. Nous envisageons de compléter notre étude en recherchant parmi les gènes étudiés dans l'article 3, ceux soumis à la sélection positive. La séquence des gènes soumis à la sélection positive va subir des mutations qui vont entraîner au niveau des protéines des modifications d'acides aminés et donc modifier certains sites de la protéine. La modification d'un site dans une protéine peut entraîner l'apparition d'une nouvelle fonction, la modification ou la perte de la fonction de la protéine. La recherche des gènes soumis à la sélection positive permettra de faire 1) la liste des protéines conservées entre les espèces qui auraient donc gardé la même fonction et 2) la liste des protéines évoluant sous sélection positive dont la fonction aurait divergé entre les espèces. Par la suite, nous pourrions étudier les mécanismes d'action des protéines soit conservées, soit divergentes entre les espèces. En conclusion, cette approche évolutive permettra d'orienter le choix des gènes à étudier préférentiellement pour comprendre le mécanisme d'action des protéines dans la fécondation d'une espèce donnée.

Nouvelles données sur la technique de FIV dans l'espèce équine

Les différents travaux menés au cours de ma thèse ont apporté de nouvelles pistes dans la compréhension des faibles taux de FIV dans l'espèce équine.

1) Les faibles taux de FIV équine ne semblent pas liés à un défaut de compétence des ovocytes issus de maturation *in vitro*.

En effet, nous avons montré dans l'article 1 que dans l'espèce équine, la structure de la zone pellucide des ovocytes issus de maturation *in vitro* n'est pas différente de celle de la zone pellucide des ovocytes issus de maturation *in vivo*. De plus, des résultats antérieurs avaient montré que la technique de maturation *in vitro* utilisée dans nos essais et mise au point par Goudet *et al.* (2000) permettait la maturation nucléaire des ovocytes équins. Certains facteurs comme le glutathion, nécessaire à la fécondation, ont été détectés dans le cytoplasme des ovocytes mis en maturation *in vitro* dans ces conditions (Goudet *et al.*, 1998b,c ; Goudet *et al.*, 2000 ; Luciano *et al.*, 2006). Par ailleurs, les résultats de l'article 1 montrent que le cytoplasme équin est capable de décondenser le spermatozoïde équin ou porcin et de s'activer. La technique de maturation *in vitro* semble donc permettre la maturation cytoplasmique de l'ovocyte. Enfin, dans l'article 5, en présence ou en absence de cellules d'oviducte, les résultats ont montré que le taux de FIV n'était pas amélioré en utilisant des

ovocytes préovulatoires au lieu d'ovocytes issus de maturation *in vitro*. Les ovocytes issus de maturation *in vitro* semblent donc similaires aux ovocytes issus de maturation *in vivo*. Ainsi, le milieu de maturation utilisé semble permettre une maturation adéquate des ovocytes équins.

2) Les faibles taux de FIV équine pourraient être liés à un milieu de FIV inadéquat.

En effet, dans l'article 5, lors de la co-incubation des gamètes équins en absence de cellules d'oviducte, les spermatozoïdes ne traversent pas la zone pellucide des ovocytes issus de maturation *in vitro*. Cependant, en présence de cellules d'oviducte équin ou porcin, le taux de FIV des gamètes équins était amélioré. De plus, des travaux antérieurs ont montré que les ovocytes équins issus de maturation *in vitro* étaient fécondés lorsqu'ils étaient transférés dans l'oviducte de juments inséminées (Deleuze *et al.*, 2009). Les sécrétions de l'oviducte pourraient donc faciliter la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte. Dans l'espèce équine, des molécules de l'oviducte semblent nécessaires à la fécondation. Leur absence dans les milieux de FIV pourrait être responsable des faibles taux de réussite.

Ces molécules pourraient agir sur les ovocytes. En effet, au cours de la thèse, différents protocoles de FIV équine en présence de cellules d'oviducte ont été testés (mais non présentés dans les résultats de la thèse). Le premier protocole consistait à co-incuber les spermatozoïdes issus de sperme congelé et les cellules d'oviducte pendant 0, 30 minutes, 1 heure et 12 heures, puis à traiter ces spermatozoïdes avec de l'héparine avant d'ajouter les ovocytes équins. Le deuxième protocole consistait à co-incuber les ovocytes avec les spermatozoïdes issus de sperme frais et traités avec du ionophore calcique A23187 en présence de cellules d'oviducte. Aucune fécondation n'a été obtenue au cours de ces différents essais. Le seul protocole qui a permis d'obtenir des ovocytes fécondés est celui décrit dans l'article 5 : ce protocole consistait à co-incuber les ovocytes avec les cellules d'oviducte pendant 3 heures avant l'ajout des spermatozoïdes. Cette co-incubation pourrait avoir un effet positif sur les ovocytes. Il serait possible que les sécrétions des cellules d'oviducte en culture se fixent à la zone pellucide équine et modifient la structure de la zone pellucide équine, comme chez les porcins (Buhi *et al.*, 1993, Gonçalves *et al.*, 2008, Familiari *et al.*, 2008). Pour vérifier cette hypothèse, les ovocytes équins pourraient être co-incubés en présence de cellules d'oviducte équin ou porcin (article 5), et la structure de la zone pellucide pourrait être observée par microscopie électronique à balayage (article 1). De plus, la fixation des protéines de l'oviducte sur les ovocytes pourrait être vérifiée à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines (article 5) et observée à l'aide d'un microscope confocal (article 1).

3) Les faibles taux de FIV équine pourraient être aussi liés à un défaut de capacitation des spermatozoïdes équins.

En effet, les taux de FIV des ovocytes équins en présence de cellules d'oviducte sont encore faibles. Or, précédemment, nous avons montré que les ovocytes issus de maturation *in vitro* semblaient compétents à la fécondation. De plus, le milieu de FIV avec les cellules d'oviducte est plus proche du milieu physiologique. Il est donc probable que les spermatozoïdes équins ne soient pas suffisamment compétents à la fécondation. Dans l'article 1, les résultats montrent que les spermatozoïdes équins font moins de réactions acrosomiques au contact de la zone pellucide que les spermatozoïdes porcins. Chez les mammifères, la capacitation prépare les spermatozoïdes à la réaction acrosomique ainsi qu'à leur pénétration à travers la zone pellucide. Notre milieu de préparation des spermatozoïdes équins ne semble donc pas favoriser la capacitation des spermatozoïdes, en particulier leur préparation pour la réaction acrosomique. Une étude a montré que le taux de fécondation des ovocytes équins pouvait atteindre 60% en capacitant et en hyperactivant les spermatozoïdes équins avec un milieu contenant des ions bicarbonates, de la BSA et de la procaine (McPartlin *et al.*, 2009). Dans cette étude, les auteurs n'ont pas utilisé de cultures de cellules d'oviducte, et les FIV sont réalisées dans un milieu sans cellules. Cependant, cette technique ne permet pas d'atteindre les taux de FIV des espèces porcine et bovine (taux supérieur à 80%, Parrish *et al.*, 1986, Day 2000). Les taux de FIV équine pourraient donc être améliorés en associant deux techniques : 1) traitement des spermatozoïdes équins avec la procaine selon la technique de McPartlin *et al.* (2009) et 2) FIV en présence de cellules d'oviducte selon nos travaux (article 5). Dans ce cadre, nous sommes en train de mettre en place une collaboration avec le laboratoire du Docteur Bedford-Gauss, qui a mis au point le traitement du sperme à la procaine. Si la technique de FIV devient plus efficace, elle pourra être utilisée dans nos travaux futurs sur les mécanismes de la fécondation équine.

En conclusion, l'approche comparative, qui n'a jamais été abordée auparavant, a permis un regard nouveau sur les mécanismes de la fécondation chez les équins mais également chez les mammifères. De plus, cette thèse apporte de nouvelles perspectives de travail chez les équins mais aussi chez les autres mammifères : l'étude du rôle de l'oviducte dans la fécondation et l'identification des molécules impliquées dans les mécanismes de la fécondation.

Bibliographie

-A-

- ABEYDEERA, L.R., DAY, B.N. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biology of reproduction*, 1997, 57, 729-734.
- ALM, H., TORNER, H., BLOTTNER, S., NURNBERG, G., KANITS, W. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes. *Theriogenology*, 2001, 56, 817-829.
- ALM, H., TORNER, H., NEUMMAN, H., TOMEK, W., WOLLZNHAUPT, K., KANITZ, W., BECKER, F. Ultrastructure, protein phosphorylation and mRNA status in horse oocytes matured in vivo and in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, 1998, 56(supplement), 473-482.
- AMBRUOSI, B., LACALANDRA, G.M., IORGA, A.I., DE SANTIS, T., MUGNIER, S., MATARRESE, R., GOUDET, G., DELL'AQUILA, M.E. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology*, 2009, 71, 1093-1104.
- ANDERSON, R.A., FEATHERGILL, K.A., RAWLINS, R.G., MACK, S.R., ZANEVELD, L.J. Atrial Natriuretic peptide A as a stimulus of the human acrosome reaction and a component of ovarian follicular fluid: correction of follicular ANP content with in vitro fertilization outcome. *Journal of andrology*, 1994, 15, 61-70.
- AZUMA, T., CHOI, Y.H., HOCHI, S., OGURI, N. Effect of glucose in the culture medium on development of horse oocytes matured and microfertilized in vitro. *Reproduction, fertility and development*, 1995, 7, 1067-1071.

-B-

- BABA, D., KASHIWABARA, S., HONDA, A., YAMAGATA, K., WUT, Q., IKAWA, M., OKABE, M., BABA, T. Mouse Sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *The journal of biological chemistry*, 2002, 277, 30310-30314.
- BADER, H. An investigation of sperm migration in to the oviducts of the mare. *Journal of reproduction and fertility*, 1982, 32(supplement), 59-64.
- BALL, B.A. Embryonic loss in mares. Incidence, possible causes, and diagnostic considerations. *Veterinary clinics of North America: Equine practice*, 1988, 4, 263-288.

- BATTUT, I., BÉZARD, J., PALMER, E. Establishment of equine oviduct cell monolayers for co-culture with early equine embryos. *Journal of reproduction and fertility*, 1991, 44(supplement), 393-403.
- BEDFORD, S.J., KUROKAWA, M., HINRICHS, K., FISSORE, R.A. Intracellular calcium oscillations and activation in horse oocytes injected with stallion sperm extracts or spermatozoa. *Reproduction*, 2003, 126, 489-499.
- BEDFORD, J.M. Puzzles of mammalian fertilization – and beyond. *The international journal of developmental biology*, 2008, 52, 415-426.
- BENNET, P.J., MOATTI, J.P., MANSAT, A., RIBBES, H., CAYRAC, J.C., PONTONNIER, F., CHAP, H., DOUSTE-BLAZY, L. Evidence for the activation of phospholipases during acrosome reaction of human sperm elicited by calcium ionophore A23187. *Biochimical and biophysical Acta*, 1987, 919, 255-265.
- BÉZARD, J., MAGISTRINI, M., DUCHAMP, G., PALMER, E. Chronology of equine fertilization and embryonic development in vivo and in vitro. *Equine veterinary journal*, 1989, 8(supplement), 105-110.
- BEZARD, J., MAGISTRINI, M., BATTU, I., DUCHAMP, G., PALMER, E. Fécondation *in vitro* chez les équidés. *Le Recueil de Medecine Veterinaire*, 1992, 168, 993-1003.
- BÉZARD, J., GOUDET, G., DUCHAMP, G., PALMER, E. Preovulatory maturation of ovarian follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. In: SHARP D.C., BAZER F.W, (éd.), *Sixth International Symposium on Equine Reproduction, Caxambu, Brazil, August 7-13, 1994*. Madison, WI, USA: Society for the study of reproduction, Biology of reproduction monograph series 1: Equine Reproduction VI, 1995, 261-271.
- BÉZARD, J. Aspects of in vivo and in vitro fertilization of the equine oocyte. *Arquivos da Faculdade de Veterinaria, UFRGS* 1997, 25 (supplement 1), 36-61.
- BREAZEALE, K.R., BRADY, H.A., BI, M., UPPULURI, S., THOMPSON, L.D., BRUEMMER, J.E., HARDY, D.M. Biochemical properties and localization of zonadhesin in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 2002, 58, 359-362.
- BUHI, W.C., O'BRIEN, B., ALVAREZ, I.M., ERDOS, G., DUBOIS, D. Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitellin space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryo. *Biology of reproduction*, 1993, 48, 1274-1283

- CABALLERO, I., VAZQUEZ, J.M., GIL, M.A., CALVETE, J.J., ROCA, J., SANZ, L., PARRILLA, I., GARCIA, E.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., MARTINEZ, E.A. Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? *Journal of andrology*, 2004, 25, 1004-1012.
- CABALLERO, I., VÁZQUEZ, J.M., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., GILL, M.A., CALVETE, J.J., SANZ, L., GARCIA, E.M., ROCA, J., MARTÍNEZ, E.A. Influence of seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin on pig gamete interaction. *Zygote*, 2005, 13, 11-16.
- CANOVAS, S., COY, P., GOMEZ, E. First steps in the development of a functional assay for human sperm using pig oocytes. *Journal of andrology*, 2007, 28, 273-281.
- CARNEIRO, G.F., LIU, I.K.M., HYDE, D., ANDERSON, G.B., LORENZO, P.L., BALL, B.A. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Molecular reproduction and development*, 2002, 63, 451-458.
- CAROLAN, C., LONERGAN, P., VAN LANGENDONCKT, A., MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 1995, 43, 1115-28
- CHANG, M.C. The fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature*, 1951, 168, 697-698.
- CHOI, Y.H., OKADA, Y. HOCHI S., BRAUN, J., SATO, K., OGURI, N. In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae. *Theriogenology*. 1994, 42, 795-802.
- CLEMENT, F. *Etude d'une population d'étalons infertiles : apport au diagnostic et à l'étiologie de l'infertilité*. Thèse de Doctorat, ENSA Montpellier, 1995, p.155.
- COGNIE, Y., BARIL, G., POULIN, N., MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 2003, 59, 171-188.
- COLENBRANDER, B., BROUVERS, J.F.H.M., NEILD, D.M., STOUT, T.A.E., DA SILVA, P., GADELLA, B.M. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. *Theriogenology*, 2002, 58, 341-345.
- COY, P., CANOVAS, S., MONDEJAR, I., SAAVEDRA, M.D., ROMAR, R., GRULLON, L., MATAS, C., AVILES, M. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 15809-15814.

CROZET, N, MOTLIK, J, SZOLLOSI, D. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during the early stages of antrum formation. *Biologie cellulaire*, 1981, 41, 35-42.

CROZET, N, KANKA, J, MOTLIK, J, FULKA, J. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. *Gamete research*, 1986, 14, 65-73.

-D-

DAY, B.N. Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Animal reproduction science*, 2000, 60-61, 161-172.

DEL CAMPO, M.R., DONOSO, M.X., PARRISH, J.J., GINTHER, O.J. In vitro fertilization of in vitro matured equine oocytes. *Equine veterinary science*, 1990, 10:18-22.

DELEUZE, S., DUBOIS, S.C., CAILLAUD, M., BRUNEAU, B., GOUDET, G., DUCHAMP, G. Influence of cysteamine on in vitro maturation, in vitro and in vivo fertilization of equine oocytes. *Reproduction in domestic animals*, 2008, in press.

DELEUZE, S., GOUDET, G., CAILLAUD, M., LAHUEC, C., DUCHAMP, G. Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of in vitro and in vivo matured horse oocytes. *Theriogenology*, 2009, 72, 203-209.

DELL'AQUILA, M.E., FUSCO, S., LACALANDRA, G.M., MARITATO, F. In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology*, 1996, 45, 547-560.

DELL'AQUILA, M.E., CHO, Y.S., MINOIA, P., TRAINA, V., LACALANDRA, G.M., MARITATO, F. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction*, 1997a, 12, 2766-2772.

DELL'AQUILA, M.E., CHO, Y.S., MINOIA, P., TRAINA, V., FUSCO, S., LACALANDRA, G.M., MARITATO, F. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes. *Theriogenology* 1997b, 47, 1139-1156.

DOBRINSKI, I., SUAREZ, S.S., BALL, B.A. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biology of reproduction*, 1996, 54, 783-788.

DOBRINSKI, I., SMITH, T.T., SUAREZ, S.S., BALL, B.A. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biology of reproduction*, 1997, 56, 861-869.

-E-

EICHENLAUB-RITTER, U., PESCHKE, M. Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human reproduction update*, 2002, 8, 21-41.

ENDERS, A.C., LIU, I.K.M., BOWERS, J., LANTZ, K.C., SCHLAFKE, S., SUAREZ, S. The ovulated ovum of the horse: cytology of non fertilized ova to pronuclear stage ova. *Biology of reproduction*, 1987, 37, 453-466.

EYESTONE, W.H., FIRST, N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *Journal of reproduction and fertility*, 1989, 85, 715-720.

-F-

FAMILIARI, G., HEYN, R., RELUCENTI, M., SATHANANTHAN, H. Structural changes of the zona pellucida during fertilization and embryo development. *Frontiers in bioscience*, 2008, 13, 6730-6751.

FAYRER-HOSKEN, R.A., CAUDLE, A.B., SHUR, B.D. Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. *Molecular reproduction and development*, 1991, 28, 74-78.

FUNAHASHI, H., DAY, B.N. Advances in in-vitro production of porcine embryos. *Journal of reproduction and fertility*, 1997, 52 (supplement), 271-283.

-G-

GABLER, C., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Expression and presence of osteopontin and integrins in the ovine oviduct during the estrous cycle. *Reproduction*, 2003, 126, 721-729.

GADELLA, B.M., RATHI, R., BROUWERS, J.F.H.M., STOUT, T.A.E., COLENBRANDER B. Capacitation and the acrosome reaction in equine spermatozoa. *Animal reproduction science*, 2001, 68, 249-265.

GAMBOA, S., RAMALHO-SANTOS, J. SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. *Theriogenology*, 2005, 64, 275-291.

GANDOLFI, F., MOOR, R.M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of reproduction and fertility*, 1987, 81, 23-28.

GINTHER, O.J., PIERSON, R.A. Regular and irregular characteristics of ovulation and the introvulatory interval in mares. *Journal of equine veterinary science*, 1989, 9, 4-12.

- GONÇALVES, R.F., STAROS, A.L., KILLIAN, G.J. Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo development. *Reproduction in domestic animals*, 2008, 43, 720-729.
- GOUDET, G., BÉZARD, J., DUCHAMP, G., GÉRARD, N., PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: Effect of follicle size and hormonal environment. *Biology of reproduction*, 1997, 57, 232-245.
- GOUDET, G. *Ovocytes equines : Optimisation de la production et évaluation de la qualité*. Thèse pour le titre de Docteur de l'université de tours, Université François Rabelais de Tours, le 7 janvier 1998a. p. 200.
- GOUDET, G., BÉZARD, J., BELIN, F., DUCHAMP, G., DUCHAMP, G., PALMER, E., GÉRARD, N. Oocyte competence for in vitro maturation is associated with Histone H1 Kinase activity and is influenced by estrous cycle stage in the mare. *Biology of reproduction*, 1998b, 59, 456-462.
- GOUDET, G., BELIN, F., BÉZARD, J., GÉRARD, N. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Molecular human reproduction*, 1998c, 4, 563-570.
- GOUDET, G., BELIN, F., MLODAWSKA, W., BÉZARD, J. Influence of epidermal growth factor on in vitro maturation of equine oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, 2000, 15(supplement), 49-52.
- GOUDET, G., CHEVASSUS-AGNES, C., POULIN, N., CAILLAUD, M., MARTORIATI, A., GERARD, N., MAGISTRINI, M. New attempts for in vitro fertilization in the mare. *Reproduction in domestic Animals*, 2003, 38, 67.
- GRAHAM, J.K. Methods for induction of capacitation and the acrosome reaction of stallion spermatozoa. *Reproductive Technology, Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 1996, 12, 111-117.
- GRONDAHL, C., GRONDAHL, NIELSEN, C., ERIKSEN, T., GREVE, T., HYTTEL, P. In vivo fertilization and initial embryogenesis in the mare. *Equine veterinary journal*, 1993, 15 (supplement), 79-83.
- GRONDAHL, C., HOST, T., BRUCK, I., VIUFF, D., BEZARD, J., FAIR, T., GREVE, T., HYTTEL, P. *In vitro* production of equine embryos. *Biology of reproduction*, 1995a, 1(Monographie), 299-307.

GRONDAHL, C., HYTTEL, P., GRONDAHL, M.L., ERIKSEN, T., GOTFREDSEN, P., GREVE, T. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *Molecular reproduction and development* 1995b, 42, 94-105.

GUIGNOT, F., OTTOGALI, M., YVON, J.M., MAGISTRINI, M. Preliminary observations in in vitro development of equine embryo after ICSI. *Reproduction, nutrition, development*, 1998, 38, 653-663.

-H-

HINRICHS, K., LOVE, C.C., BRINSKO, S.P., CHOI, Y.H., VARNER, D.D. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vitro* after oviductal transfert. *Biology of reproduction* 2002, 67, 256-262.

HOWES, E., PASCALL, J.C., ENGEL, W., JONES, R. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosine a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *Journal of cell science*, 2001, 114, 4127-4136.

HUNTER, R.H.F., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the fallopian tubes. *Molecular reproduction and development*, 2004, 67, 243-250.

-K-

KIDSON, A., SCHOEVERS, E., LANGENDIJK, P., VERHEIJDEN, J., COLENBRANDER, B., BEVERS, M. The effect of oviductal epithelial cell co-culture during in vitro maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 2003, 59, 1889-1903.

KING, W.A., BÉZARD, J., BOUSQUET, D., PALMER, E., BETTERIDGE, K.J. The meiotic stage of preovulatory oocytes in mares. *Genome*, 1987, 29, 679-682.

KÖLLE, S., DUBOIS, C., CAILLAUD, M., LAHUEC, C., SINOWATZ, F., GOUDET, G. Equine zona protein synthesis and ZP structure during folliculogenesis, oocyte maturation and embryogenesis. *Molecular reproduction and development*, 2007, 74, 851-859.

KÖLLE, S., DUBIELZIG, S., REESE, S., WEHREND, A., KÖNIG, P., KUMMER, W. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biology of reproduction*, 2009, 81, 267-274.

-L-

- LARSON, J.L., MILLER, D.J. Sperm from a variety of mammalian species express Beta-1,4-Galactosyltransferase on their surface. *Biology of reproduction*, 1997, 57, 442-453.
- LAWRENCE, Y., WHITAKER, M., SWANN, K. Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca²⁺ increase at fertilization in the mouse. *Development*, 1997, 124, 233-241.
- LEA, I.A., SIVASHANMUGAN, P., O'RAND, M. Zonadhesin: Characterization, localization, and zona pellucida binding. *Biology of reproduction*, 2001, 65, 1691-1700.
- LI, L.Y., MEINTJES, M., GRAFF, K.F., PAUL, J.B., DENNISTON, R.S., GODKE, R.A. In vitro fertilization and development of in vitro-matured oocytes aspirated from pregnant mares. *Biology of reproduction*, 1995, 1 (Monographie), 309-317.
- LOCATELLI, Y., COGNIE, Y., VALLET, J.C., BARIL, G., VERDIER, M., POULIN, N., LEGENDRE, X., MERMILLOD, P. Successful use of oviduct epithelial cell coculture for in vitro production of viable red deer (*Cervus elaphus*) embryos. *Theriogenology*, 2005, 64, 1729-1739.
- LUCIANO, A.M., GOUDET, G., PERAZOLLI, F., LAHUEC, C., GERARD, N. Glutathione content and glutathione peroxidase expression in in vivo and in vitro matured equine oocytes. *Molecular reproduction and development*, 2006, 73, 658-666.

-M-

- MCCAULEY, T.C., BUHI, W.C., WU, G.M., MAO, J., CAAMANO, J.N., DIDION, B.A., DAY, B.N. Oviduct-Specific Glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biology of reproduction*, 2003, 69, 828-834.
- MCPARTLIN, L.A., SUAREZ, S.S., CZAYA, C.A., HINRICHS, K., BEDFORD-GUAUS, S.J. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biology of reproduction*, 2009, 81, 199-206
- MENEZO, Y. Milieu synthétique pour la survie et la maturation des gamètes et pour la culture de l'œuf fécondé. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. Paris (D)*, 1976, 282, 1967-1970.
- MEYERS, S.A., LIU, I.K.M., OVERSTREET, J.W., DROBNIS, E.Z. Induction of acrosome reactions in stallion sperm by equine zona pellucida, porcine zona pellucida, and progesterone. *Biology of reproduction*, 1995, 1(monographie), 739-744.
- MEYER, S.A., LIU, I.K.M., OVERSTREET, J.W., VADAS, S., DROBNIS, E.Z. Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: Comparisons between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, 1996, 46, 1277-1288.

MEYERS, S.A. Equine sperm-oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Animal reproduction science*, 2001, 68, 291-303.

MILLER, C.C., FAYER-HOSKEN R.A., TIMMONS, T.M., LEE, V.H., CAUDLE, A.B., DUNBAR, B.S. Characterization of equine zona pellucida glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis and immunological techniques. *Journal of reproduction and fertility*, 1992, 96, 815-825.

MOLLER, C.C., WASSARMAN, P.M. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Developmental biology*, 1989, 132, 103-112.

-N-

NIXON, B., AITKEN, R.J., MCLAUGHLIN, E.A. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell Molecular Life Science*, 2007, 64, 1805-1823.

-O-

O'DAY-BOWMAN, M.B., MAVROGIANIS, P.A., REUTER, L.M., JOHNSON, D.E., FAZLEABAS, A.T., VERHAGE, H.G. Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following in vitro incubation. *Biology of reproduction*, 1996, 54, 60-69.

OKABE, M., CUMMINS, J.M. Mechanism of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals. *Cell Molecular Life Science*, 2007, 64, 1945-1958.

-P-

PALMER, E., BÉZARD, J., MAGISTRINI, M., DUCHAMP, G. *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. *Journal of reproduction and fertility*, 1991, 44(supplement), 375-384.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., CRITSER, E.S., EYESTONE, W.H., FIRST, N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 1986, 25, 591-600.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., WINER, M.A., FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction*, 1988, 38, 1171-1180.

PERREAULT, S.D., BARBEE, R.R., SLOTT, V.L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocyte. *Developmental biology*, 1988, 125, 181-186.

POMMER, A.C., RUTLLANT, J., MEYERS, S.A. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of reproduction*, 2003, 68, 1208-1214.

PRIMAKOFF, P., MYLES, D.G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, 2002, 296, 2183-2185.

-R-

RATHI, R., COLENBRANDER, B., BEVERS, M.M., GADELLA, B.M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of reproduction*, 2001, 65, 462-470.

REBEIZ, M., MILLER, D.J. Porcine Sperm Surface β 1,4-galactosyltransferase binds to the zona pellucida but is not necessary or sufficient to mediate sperm-zona pellucida binding. *Molecular reproduction and development*, 1999, 54, 379-387.

REINERT, M., CALVETTE, J.J., SANZ, L., MANN, K., TÖPFER-PETERSEN, E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *European journal of biochemistry*, 1996, 242, 636-640.

ROMAR, R., COY, P., GADEA, J., RATH, D. Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized in vitro with epididymal spermatozoa. *Animal reproduction science*, 2005, 85, 287-300.

-S-

SABEUR, K., BALL, B.A. Characterization of Galactose-binding proteins in equine testis and spermatozoa. *Animal reproduction science*, 2007, 101, 74-84.

SAWAI, K., FUNAHASHI, H., NIWA, K. Stage-specific requirement of cysteine during in vitro maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. *Biology of reproduction*, 1997, 57, 1-6.

SHAPIRO, B.M. Molecular aspects of sperm-egg fusion. *Ciba foundation symposium*, 1984, 103, 86-99.

SHUR, B.D., HALL, N.G. A role for mouse sperm surface β 1,4-galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *The journal of cell biology*, 1982, 95, 574-579.

SIMPSON, A.M., SWAN, M.A., WHITE, I.G. Calcium uptake, respiration, and ultrastructure of sperm exposed to ionophore A23187. *Archives of andrology*, 1987, 19, 5-18.

SONG, X., LI, F., CAO, G., ZHANG, J., HAN, Y. Distribution of alpha-D-mannose residues on zona pellucida and their role in fertilization in pigs. *Science in China. Series C, Life sciences*, 2007, 50, 170-177.

STEIN, K.K., GO, J.C., LANE, W.S., PRIMAKOFF, P. MYLES, D.G. Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions. *Proteomics*, 2006, 6, 3533–3543.

-T-

TANGHE, S., VAN SOOM, A., MEHRZAD, J. MAES, D., DUCHATEAU, L., DE KRUIF, A. Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology*, 2003, 60, 135-149.

TANPHAICHITR, N., CARMONA, E., BOU KHALIL, M., XU, H., BERGER, T., GERTON, G.L. New insights into sperm-zona pellucida interaction: involvement of sperm lipid rafts. *Frontiers in Bioscience*, 2007, 12, 1748-1766.

TENGOWSKI, M.W., WASSLER, M.J., SHUR, B.D., SCHATTEN, G. Subcellular localization of beta-1,4-Galactosyltransferase on Bull sperm and its function during sperm-egg interaction. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, 58, 236-244.

THOMAS, P.G.A., BALL, B.A., BRINSKO, S.P. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. *Biology of reproduction*, 1994a, 51, 222-228.

THOMAS, P.G.A., BALL, B.A., MILLER, P.G., BRINSKO, S.P., SOUTHWOOD, L. A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers. *Biology of reproduction*, 1994b, 51:303-309.

TIAN, X., PASCAL, G., FOUCHÉCOURT, S., PONTAROTTI, P., MONGET, P. Gene birth, death, and divergence: the different scenarios of reproduction-related gene evolution. *Biology of reproduction*, 2009, 80, 616-621.

TORNER, H., ALM, H., KANITZ, W., GOELLNITZ, K., BECKER, F., POEHLAND, R., BRUESSOW, K.P., TUCHSCHERER, A. Effect of initial cumulus morphology on meiotic dynamic and status of mitochondria in Horse oocytes during IVM. *Reproduction in domestic animals*, 2007, 42, 176-183.

TÖPFER-PETERSEN, E., EKHLASI-HUNDRIESER, M., KIRCHHOFF, C., LEEB, T., SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Animal reproduction science*, 2005, 89, 159-170.

TÖPFER-PETERSEN, E., EKHLASI-HUNDRIESER, M., TSOLOVA, M. Glycobiology of fertilization in the pig. *The international journal of developmental biology*, 2008, 52:717-736

TRAVERT, C., CARREAU, S., GALERAUD-DENIS, I. La capacitation in vitro. *Gynécologie obstétrique & Fertilité*, 2009, 37, 523-528.

-V-

VAN GESTEL, R.A., BREWIS, I.A., ASHTON, P.R., BROUWERS, J.F., GADELLA, B.M. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Molecular human reproduction*, 2007, 13, 445-454.

VARNER, D.D., WARD, C.R., STOREY, B.T., KENEY, R.M. Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *American journal of veterinary research*, 1987, 48, 1383-1389.

VESELSKÝ, L., PEKNICOVÁ, J., CECHOVÁ, D., KRAUS, M., GEUSSOVÁ, G., JONÁKOVÁ, V. Characterization of boar spermadhesins by monoclonal and polyclonal antibodies and their role in binding to oocytes. *American journal of reproduction and immunology*, 1999, 42, 187-197.

VOGELSANG, M.M., KRAEMER, D.C., POTTER, G.D., STOTT, G.G. Fine structure of the follicular oocyte of the horse. *Journal of reproduction and fertility*, 1987, 35(Supplement), 157-167.

-W-

WASSARMAN, P.M., JOVINE, L., QI, H., WILLIAM, Z., DARIE, C., LITSCHER, E.S. Recent aspects of mammalian fertilization research. *Molecular and cellular endocrinology*, 2005, 234, 95-103.

WEGNER, C.C., KILLIAN, G.J. In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Molecular reproduction and development*, 1991, 29, 77-84.

-Y-

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In : Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol 1. New York: Raven Press; 1994:189-317.

YONEZAWA, N., AMARI, S., TAKAHASHI, K., IKEDA, K., IMAI, K., KANAL, S., KIKUCHI K., NAKANO, M. Participation of the nonreducing terminal β -Galactosyl residues of the neutral N-Linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Molecular reproduction and development*, 2005, 70, 222-227.

-Z-

ZAMIR, N., BARKAN, D., KEYNAN, N., NAOR, Z., BREIBART, H. Atrial Natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *American journal of physiology*, 1995, 269, 216-221.

ZHANG, J.J., MUZS, L.Z., BOYLE, M.S. In vitro fertilization of horse follicular oocytes matured in vitro. *Molecular reproduction and development*, 1990, 26, 361-365.

ZHANG, M., HONG, H., ZHOU, B., JIN, S., WANG, C., FU, M., WANG, S., XIA, G. The expression of atrial natriuretic peptide in the oviduct and its functions in pig spermatozoa. *Journal of endocrinology*. 2006, 189, 493-507.

Annexe

Autres publications et communications réalisées dans le cadre de ma thèse

Publications

AMBRUOSI, B., LACALANDRA, G.M., IORGA, A.I., DE SANTIS, T., MUGNIER, S., MATARRESE, R., GOUDET, G., DELL'AQUILA, M.E. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology*, 2009; 71(7), 1093-1104

Communication orale

MUGNIER, S., MAGISTRINI, M., POULIN, N., LAHUEC, C., YVON, J.M., GOUDET, G. Acrosome reactions rate on spermatozoa bound to the zona pellucida in equine, caprine and porcine species. *11^{ème} Forum de l'Ecole Doctorale "Santé, Sciences et Technologies" Tours, France*, 14 juin 2007, Abstract.

MUGNIER, S., MAGISTRINI, M., LAHUEC, C., YVON, J.M., GOUDET, G. Mécanismes de la fécondation dans l'espèce équine : interaction des spermatozoïdes avec la zone pellucide des ovocytes. *33^{ème} Journée de la Recherche Equine, Haras Nationaux, Paris, France*, 8 mars 2007, 33, 13-21

MUGNIER, S., KERVELLA, M., BOITTIN, S., DOUET, C., YVON, J.M., MAGISTRINI, M., GOUDET, G. Fécondations de gamètes équins en présence de cellules d'oviductes équins ou porcins en culture in vitro. *34^{ème} Journée de la Recherche Equine, Haras Nationaux, Paris, France*, 28 février 2008, 34, 31-37

MUGNIER, S., DELALEU, B., DOUET, C., KERVELLA, M., LEBOS, C., MAGISTRINI, M., MONGET, P., SOLNAIS, P., SIZARET, P-Y., GOUDET, G. Comparison of the composition and morphology of the zona pellucida of equine and porcine oocytes. *Proceeding of 24th Scientific Meeting de l'Association Européenne de Transfert Embryonnaire, Pau, France*, 2008. www.aete.eu

MUGNIER, S., MESLIN, C., GOUDET, G., MONGET, P. Analyse des protéines impliquées dans l'interaction du spermatozoïde avec la zone pellucide chez les mammifères. 3^{ème} Journées d'Animation Scientifique du Département PHASE ; Tours, France, 2009.

Communications sous forme de posters

SACHET, L., MAGISTRINI, M., MUGNIER, S., LAHUEC, C., YVON, J.M., STUART, M., GOUDET, G. Pourquoi les taux de fécondation in vitro sont faibles dans l'espèce équine? Etude du mécanisme d'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide des ovocytes. Journées de l'Association Vétérinaire Equine Française (AVEF); 20 au 22 octobre 2005 ; Angers (France). 2005. n.p. Poster

MUGNIER, S., MAGISTRINI, M., SACHET, L., LAHUEC, C., YVON, J.M., MEYERS, S., GOUDET, G. Relations between low rates of in vitro fertilization and induction of sperm acrosome reactions by zona pellucida in the equine species. In : Squires, E. (éd.). Proceedings of the 4th International Symposium on Stallion Reproduction. Elsevier, Londres, 21 au 23 octobre 2005, *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), 270-271

MUGNIER, S., LAHUEC, C., YVON, J.M., MAGISTRINI, M., GOUDET, G. Equine sperm surface galactosyltransferase and zona glycoprotein ZPC are not necessary for sperm binding to the zona pellucida. In: Evans, M.J. (éd.). Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction. Elsevier, Londres (GBR), 6 au 11 août 2006. *Animal Reproduction Science* 2006, 94 (1-4), 331-332

MUGNIER, S., LAHUEC, C., YVON, J.M., MAGISTRINI, M., GOUDET, G. In the horse, N-acetylglucosamine residues on oocyte zona pellucida are not necessary for sperm-zona pellucida binding. *Proceeding of 22nd Scientific Meeting de l'Association Européenne de Tranfert Embryonnaire*, Zug, Suisse, 8 au 9 septembre 2006 www.aete.eu

MUGNIER, S., LAHUEC, C., YVON, J.M., MAGISTRINI, M., GOUDET, G. Interaction des spermatozoïdes avec la zone pellucide des ovocytes dans l'espèce équine. 19^{ème} Colloque Biotechnocentre Seillac, France, 9 au 10 novembre 2006, p26

MUGNIER, S., DELALEU, B., SOLNAIS, P., LAHUEC, C., MAGISTRINI, M., GOUDET, G. Comparaison de la structure de la zone pellucide des ovocytes porcins et équins par microscopie électronique à transmission. 40^{ème} Journées de la Recherche Porcine Paris, France, 5 au 6 février 2008, 40, 131-132

KÖLLE, S., KOWALEWSKI, M.P., GOUDET, G., MUGNIER, S., REICH, C.M. Expression of stéroïd receptors in the equine cumulus oocyte complex. 41st Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction and 33rd Mutual Conference on Veterinary and Human Reproductive Medicine, *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 43(Supplement 1), 1-40, Abstract n°57.

AMBRUOSI, B., IORGA, A.I., DE SANTIS, T., MUGNIER, S., MATARRESE, R., GOUDET, G., DELL'AQUILA, M.E. Cytoplasmic lipid droplets aggregation in equine oocyte correlates with perinuclear mitochondrial distribution but not with fertilization after ICSI. Proceedings of the 16th International Congress on Animal Reproduction. Wiley, New York (USA) 13 au 17 juillet 2008; *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 43(Supplement 3), 184-185

MUGNIER, S., CAILLAUD, M., DOUET, C., DUBOIS, C., DUCHAMP, G., KERVELLA, M., LEBOS, C., MAGISTRINI, M., SIZARET, P-Y., VENTURI, E., GOUDET, G. La Structure de la zone pellucide influence-t-elle la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte ? Journées Techniques Nationales des Haras Nationaux, Chamberet, France, 2008

MUGNIER, S., DELL'AQUILA, M.E., AMBRUOSI, B., DE SANTIS, T., IORGA, A.I., MATARRESE, R., LACALANDRA, G.M., GOUDET, G. Intracytoplasmic equine or porcine sperm injection in equine and porcine oocytes. Katila, T. (Editeur). Proceedings of the 5th International Symposium on Stallion Reproduction. Elsevier, Paris (France) 18 au 20 septembre 2008, *Animal Reproduction Science* 2008, 107(3-4), 33-34

MUGNIER, S., KERVELLA, M., GOUDET, G. Role of oviductal cells in fertilization in the horse. 1st General Conference: Maternal Interaction with gametes and embryo, Volos Grèce, 9 au 11 octobre 2008, Abstarct Book, p24. www.cost-gemini.eu/meeting.html

MUGNIER, S., DOUET, C., LEBOS, C., SIZARET, P-Y., KERVELLA, M., VENTURI, E., DUCHAMP, G., MONGET, P., GOUDET, G. La composition et la structure de la zone pellucide influencent-elles la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte ? 41^{èmes} Journées de la Recherche Porcine, 3 au 4 février 2009, Paris, France, 41, 33-34.

MUGNIER, S., KERVELLA, M., DOUET, C., YVON, J.M., VENTURI, E., DUCHAMP, G., MAGISTRINI, M., GOUDET, G. Amélioration du taux de fécondation équine en

présence de cellules d'oviducte porcin stimulées ou non par des hormones (estradiol ou LH).
35ème Journée de la Recherche Equine, Paris, France, 2009, 35, 215-222

DOUET, C., MUGNIER, S., GOUDET, G. Are Oviductin, Osteopontin and Atrial Natriuretic Peptide A expressed in equine oviduct and involved in equine fertilization? 2st General Conference: Maternal Interaction with gametes and embryo, Alghero, Sardaigne, Italie, 2009, Abstract, www.cost-gemini.eu/meeting.html



Sylvie MUGNIER



MÉCANISMES DE LA FÉCONDATION DANS L'ESPÈCE ÉQUINE :

Approche comparée entre les modèles équin et porcin

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 les équins (faibles taux de fécondation *in vitro* : 0-60%) et les porcins (forts taux : 80-90%). 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 β -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 n'ont pas pu être identifiées.

Mots-clés : Ovocyte, spermatozoïde, Cellules d'oviducte, interaction gamétique, étapes de la fécondation, zone pellucide, FIV, gènes de la reproduction, β -1,4-galactosyltransferase, N-acétylglucosamine, oviductine, osteopontine, ANP A

Abstract

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 rates: 80-90%) 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 β -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.

Keywords: Oocyte, spermatozoa, Oviduct cells, Gamete interaction, steps of fertilization, zona pellucida, IVF, reproductive genes, β -1,4-galactosyltransferase, N-acetylglucosamine, oviductin, osteopontin, ANP A