

# La composition et la structure de la zone pellucide influencent-elles la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte ?

Sylvie MUGNIER (1), Cécile DOUET (1), Claude LEBOS (2), Pierre-Yves SIZARET (2), Morgane KERVILLA (1), Eric VENTURI (3), Guy DUCHAMP (3), Philippe MONGET (1), Ghylène GOUDET (1)

(1) INRA - UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre de Tours, F-37380 Nouzilly

(2) Département des microscopies PPF-ASB Université F. Rabelais, F-37041 Tours

(3) INRA - UEPAO, Centre de Tours, F-37380 Nouzilly

ggoudet@tours.inra.fr

## Do the composition and structure of the zona pellucida influence the penetration of spermatozoa into the oocyte?

Fertilization is a key step of fertility. A better understanding of the mechanisms of fertilization is vital to improving or controlling fertility. Our aim is to clarify the mechanism of sperm-zona pellucida (ZP) interaction. In the pig, *in vitro* fertilization (IVF) rates are high, and the spermatozoa penetrate easily through the ZP. In the horse, IVF rates are low, and the spermatozoa attach to the ZP but do not penetrate. We compared the composition and structure of the equine and porcine ZP. The composition was determined using phylogenetic analyses. The structure was evaluated by scanning electron microscopy. In porcine oocytes, the ZP contains three glycoproteins (ZPA, ZPB and ZPC) and shows a mesh-like structure with large pores before and after *in vitro* maturation and a compact structure with small pores after *in vivo* maturation. In equine oocytes, the ZP contains four glycoproteins (ZPA, ZPB, ZPC and ZP1) and shows a compact structure with small pores whatever the maturation stage. The differences between equine and porcine species could suggest a relation between *in vitro* penetration rates and ZP composition/structure. Moreover, our data suggest structural rearrangements during *in vitro* and *in vivo* maturation of porcine oocytes, which could be related to the block of the polyspermy.

## INTRODUCTION

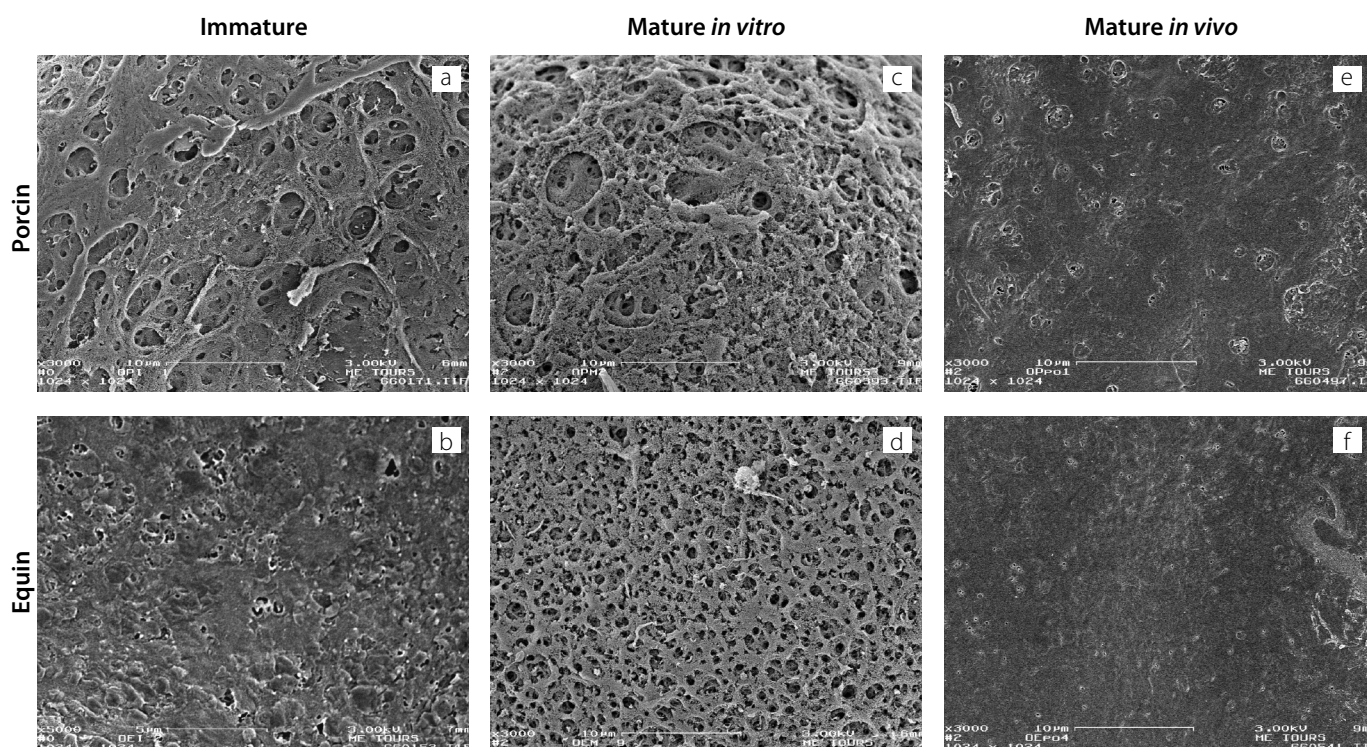
La fécondation est une étape clé de la fertilité. Afin de maîtriser la fertilité, il est nécessaire de bien connaître les mécanismes de la fécondation. Chez les mammifères, les étapes de la fécondation sont connues : le spermatozoïde se fixe sur la zone pellucide (ZP), une enveloppe glycoprotéique entourant l'ovocyte, la traverse, puis fusionne avec la membrane plasmique de l'ovocyte. Toutefois, les mécanismes de la fécondation restent encore mal connus. Ainsi, le mécanisme d'interaction du spermatozoïde avec la ZP n'est pas encore entièrement élucidé. La fécondation *in vitro* (FIV) est un outil permettant d'étudier ces mécanismes. Dans l'espèce porcine, les taux de FIV sont élevés (80 % à 90 % ; Abeydeera et Day, 1997), mais un grand nombre de spermatozoïdes traversent la ZP et les taux de polyspermie sont élevés (50 à 70 % ; Funahashi et Day, 1997), ce qui empêche le développement embryonnaire. A l'inverse, dans l'espèce équine, les taux de FIV sont bas (inférieurs à 30 % ; Palmer et al., 1991), car les spermatozoïdes se fixent à la ZP mais ne la traversent pas. L'étude comparée de la composition et de la structure de la ZP des ovocytes équins et porcins devrait permettre de mettre en évidence les éléments responsables de la pénétration des spermatozoïdes dans la ZP. Notre objectif a donc été d'identifier les

glycoprotéines qui composent les ZP porcine et équine et de comparer la structure des ZP porcine et équine par microscopie électronique à balayage (MEB).

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les séquences des protéines composant la ZP des ovocytes équins et porcins ont été identifiées dans les banques et comparées par une analyse phylogénétique grâce au logiciel FIGENIX (<http://sites.univ-provence.fr/evol/figeni>).

Nous avons étudié la structure de la ZP sur des ovocytes immatures, ou issus de maturation *in vitro* ou *in vivo*. Les ovocytes immatures ont été collectés sur des ovaires de truies et de juments récupérés dans des abattoirs. Les liquides folliculaires ont été aspirés et les ovocytes immatures ont été recherchés dans les liquides collectés. Une partie des ovocytes immatures porcins et équins a été cultivée *in vitro* dans un milieu de culture adapté à chaque espèce, afin d'obtenir des ovocytes issus de maturation *in vitro*. Les ovocytes issus de maturation *in vivo* ont été collectés dans des follicules préovulatoires de femelles de notre troupeau expérimental, soit sur des truies abattues juste avant ovulation, soit sur des juments par ponction folliculaire



**Figure 1 -** Structure de la zone pellucide d'ovocytes porcins immature (a), mature *in vitro* (c) et mature *in vivo* (e) et d'ovocytes équins immature (b), mature *in vitro* (d), et mature *in vivo* (f) observée par microscopie électronique à balayage (grossissement 3 000 x, barre d'échelle : 10 µm)

transvaginale sous contrôle échographique. Les ovocytes équins et porcins, immatures ou issus de maturation *in vitro* ou *in vivo*, ont été fixés, déshydratés dans des bains successifs d'éthanol et enfin séchés par la technique du point critique. La surface de la ZP des ovocytes a été recouverte d'une fine couche de platine (5 nm) avant l'observation au MEB.

## 2. RÉSULTATS

Nous avons étudié par une approche bioinformatique la composition des ZP équine et porcine. Les comparaisons de séquences protéiques ont montré que la ZP porcine est composée de 3 protéines appelées ZPA, ZPB, ZPC. Une composition similaire a été retrouvée chez le bovin, le chien et le chat. La ZP équine est composée de 4 glycoprotéines ZPA, ZPB, ZPC et ZP1. La même composition a été retrouvée chez l'humain, les rongeurs et les primates. Le pourcentage d'identité des protéines orthologues entre les espèces équine et porcine varie de 60 à 72 %. Les observations des ovocytes au MEB ont montré que, dans l'espèce porcine, la ZP des ovocytes immatures et issus de maturation *in vitro* présente un réseau lâche avec de grands pores, alors que la ZP des ovocytes issus de maturation *in vivo* montre un réseau compact avec de petits pores (Figure 1). Dans l'espèce équine, la ZP des ovocytes immatures et issus de maturation *in vitro* ou *in vivo* présente un réseau compact avec de petits pores (Figure 1).

## CONCLUSION

Nous avons mis en évidence une différence de composition de la ZP entre les espèces équine et porcine. De plus, nous avons observé une différence de structure de la ZP entre les ovocytes équins et porcins immatures et issus de maturation *in vitro*. Ces résultats suggèrent un lien entre le taux de pénétration des spermatozoïdes à travers la ZP et sa composition et sa structure. La structure de la ZP pourrait jouer un rôle important dans le mécanisme d'interaction du spermatozoïde avec la ZP.

Dans l'espèce porcine, la structure de la ZP est différente entre les ovocytes issus de maturation *in vivo* et les ovocytes immatures ou issus de maturation *in vitro*. Ceci suggère des modifications de la ZP pendant la maturation de l'ovocyte. *In vitro*, ces modifications ne sont pas identiques à celles observées *in vivo*. Les problèmes de polyspermie observés *in vitro* dans l'espèce porcine pourraient être liés à une mauvaise maturation de la ZP.

## REMERCIEMENTS

Ce projet a pu être réalisé grâce à un financement des Haras Nationaux. La thèse de Sylvie Mugnier est financée par les Haras Nationaux et la Région Centre.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeydeera L.R., Day B.N., 1997. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. Biol. Reprod., 57, 729-734.
- Funahashi H., Day B.N., 1997. Advances in *in vitro* production of pig embryos. J. Reprod. Fertil. Suppl., 52, 271-283.
- Palmer E., Bézard J., Magistrini M., Duchamp G., 1991. *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. J. Reprod. Fertil. Suppl., 44, 375-384.