

Les sécrétions de l'oviducte, et en particulier DMBT1, ont un effet bénéfique sur la fécondation monospermique porcine

Barbara AMBRUOSI (1), Cécile DOUET (1), Eric VENTURI (2), Ghylène GOUDET (1)

(1) INRA, Unité Mixte de Recherche de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

(2) INRA, Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière, F-37380 Nouzilly, France

ghylene.goudet@tours.inra.fr

Oviductal secretions, especially DMBT1, have a beneficial effect on monospermic fertilisation in the pig

In mammals, fertilisation occurs in the oviduct. The oviductal fluid contains molecules that affect sperm-oocyte interaction and subsequent developmental competence of zygotes. The aim of this study was to evaluate the effect of oviductal fluid on sperm-oocyte interaction in porcine species and to identify the molecules involved. We focused on one candidate molecule: Deleted in Malignant Brain Tumours 1 (DMBT1).

Porcine oocytes were collected on females slaughtered in a commercial slaughterhouse, cultured *in vitro* for 48 hours, and incubated with 1) *in vitro* fertilisation (IVF) medium, 2) oviductal fluid collected on sows slaughtered 6 hours after ovulation, 3) oviductal fluid and anti-DMBT1 antibodies. Then, oocytes were transferred to IVF medium and co-incubated for 24 hours with spermatozoa from frozen semen treated with caffeine. After co-incubation, oocytes were stained to analyze the fertilisation and polyspermy rates.

When oocytes were incubated with oviductal fluid vs IVF medium, the fertilization rate was higher (64% vs 50%, $P < 0.05$) and the polyspermy rate was lower (18% vs 59%, $P < 0.001$). The addition of anti-DMBT1 antibodies did not modify the fertilisation rate compared to the incubation with oviductal fluid (57% vs 64%, NS) but increased the polyspermy rate (49% vs 18%, $P < 0.001$).

In conclusion, the oviductal fluid has a beneficial effect on monospermic fertilisation of porcine gametes, and DMBT1 may be involved.

INTRODUCTION

La fécondation, point de départ du développement embryonnaire, est une étape critique pour la production de porcelets en bonne santé. Afin de mieux gérer la fertilité mâle et femelle, il est nécessaire de maîtriser cette étape, et donc d'en connaître les mécanismes. Or, dans l'espèce porcine, les mécanismes de la fécondation sont encore mal connus. Notre objectif est d'améliorer la compréhension de ces mécanismes. Ceci pourra permettre à long terme d'améliorer les techniques de reproduction et de limiter les pertes embryonnaires précoces liées à des anomalies de fécondation. Chez les mammifères, la fécondation a lieu dans l'oviducte qui sécrète un grand nombre de composés dans sa lumière interne. Certains composés sont impliqués dans l'interaction entre gamètes et le développement embryonnaire précoce. L'objectif de cette étude est d'étudier l'influence du fluide d'oviducte sur la fécondation et d'identifier les molécules impliquées. Nous avons focalisé notre travail sur une protéine candidate : DMBT1 (Deleted in Malignant Brain Tumours 1). En effet, nos travaux en cours montrent que DMBT1 est exprimée dans l'oviducte.

De plus, la séquence de cette protéine contient un domaine ZP et des domaines CUB. Le domaine ZP est aussi présent dans les protéines de la zone pellucide, une enveloppe de l'ovocyte sur laquelle se fixent les spermatozoïdes.

Les domaines CUB sont aussi présents dans les spermadhésines, des protéines portées par les spermatozoïdes et qui jouent un rôle dans l'interaction avec les ovocytes. La présence de ces 2 domaines dans la séquence de la protéine DMBT1 permet de faire l'hypothèse d'un rôle dans l'interaction ovocyte-spermatozoïde.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Collecte du fluide d'oviducte

Les oviductes porcins ont été collectés sur des cochettes cycliques de race Meishan abattues dans l'abattoir expérimental de l'INRA de Nouzilly, comme décrit par Mugnier *et al.* (2009). Brièvement, les femelles reçoivent une dose journalière de Régumate (20mg d'Alternogest par femelle, Intervet S.A., Angers, France) *per os* pendant 18 jours, puis une injection intramusculaire d'hCG (human Chorionic Gonadotropin, Chorulon, 500UI/femelle, Intervet S.A.) 3 jours plus tard. Elles sont abattues 46 heures après l'injection, soit 6 heures après l'ovulation. Les deux oviductes sont collectés, disséqués afin de conserver l'ampoule uniquement, et grattés à l'aide d'une lame rodée stérile pour pousser le fluide qui est alors aspiré. Le fluide est ensuite centrifugé pour éliminer les cellules et le surnageant est utilisé pour les expériences.

1.2. Préparation des gamètes

Les ovocytes immatures porcins ont été collectés sur des femelles abattues dans un abattoir commercial. Les ovaires ont été prélevés juste après l'abattage et transportés au laboratoire. Les ovocytes sont collectés par aspiration, lavés et placés pendant 48 heures dans un milieu de culture pour la maturation *in vitro* comme décrit par Marchal *et al.* (2003). Le milieu de maturation *in vitro* contient du TCM199 (M4530 Sigma) supplémenté avec 10ng/ml d'Epidermal Growth Factor (E4127 Sigma), 400ng/ml de FSH (Primufol, Rhône Mérieux) et 570µM de Cystéamine (M9768 Sigma). Les spermatozoïdes porcins sont issus de paillettes de semence congelée (800 x 10⁶ spermatozoïdes/ml) correspondant à un pool d'éjaculats de trois verrats (Pietrain X Large White) et préparés à l'Unité Expérimentale d'Insémination Caprine et Porcine de Rouillé. Les spermatozoïdes ont été décongelés, dilués dans du Beltsville-Thawing-Solution (Cobiporc, France) et centrifugés, le culot a été déposé sur un gradient de Percoll, centrifugé et dilué dans du milieu TBM (Tris-Buffered-Medium) contenant de la caféine comme décrit par Marchal *et al.* (2003).

1.3. Pré-incubation des ovocytes et fécondation *in vitro*

Après maturation *in vitro*, les ovocytes sont pré-incubés dans des gouttes de 50µl de milieu TBM (groupe témoin) ou de fluide d'oviducte (groupe FO) ou de fluide d'oviducte additionné d'anticorps anti-DMBT1 (1mg/ml, groupe FO+Ac, Holmskov *et al.*, 1997) pendant 30 minutes. Les ovocytes sont ensuite lavés dans du milieu TBM et placés dans une goutte de 100µl de TBM. Les spermatozoïdes sont ajoutés (1 x 10⁶ spermatozoïdes/ml) et les gamètes sont co-incubés pendant 24 heures. Les ovocytes sont ensuite fixés dans du paraformaldéhyde 4% dans du PBS (Dulbecco A, Paris). L'ADN est marqué avec une solution de Hoechst 33258 et les ovocytes sont déposés entre lame et lamelle afin d'observer les fécondations et de compter les pronoyaux.

1.4. Analyse statistique

Les pourcentages de fécondation et de polyspermie entre les groupes ont été comparés par le test Chi2. Les différences ont été considérées statistiquement significatives lorsque P<0,05.

2. RESULTATS

L'incubation en présence de fluide d'oviducte augmente les taux de fécondation par rapport au milieu témoin (64% vs 50% ; P<0,05 ; figure 1). La présence d'anticorps anti-DMBT1 ne modifie pas les taux de fécondation par rapport au fluide d'oviducte (57% vs 64% ; NS ; figure 1).

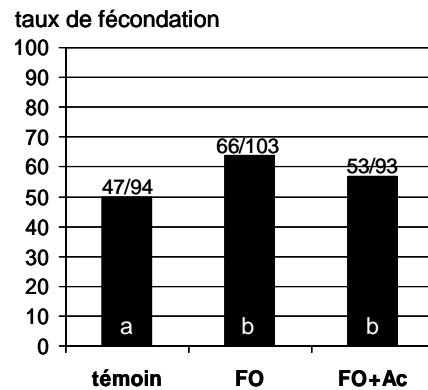


Figure 1 - Pourcentage de fécondation des ovocytes pré-incubés dans le milieu témoin, le fluide d'oviducte (FO) ou le fluide d'oviducte additionné d'anticorps anti-DMBT1 (FO+Ac)

Pourcentage de fécondation =

$\frac{\text{nombre d'ovocytes fécondés}}{\text{nombre d'ovocytes matures}}$

L'incubation en présence de fluide d'oviducte diminue les taux de polyspermie (18% vs 59% ; P<0,001 ; figure 2). La présence d'anticorps anti-DMBT1 augmente les taux de polyspermie par rapport au fluide d'oviducte (49% vs 18% ; P<0,001 ; figure 2).

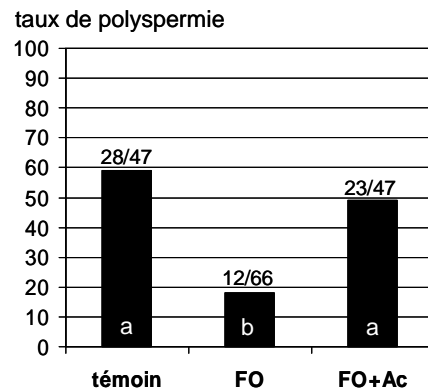


Figure 2 - Pourcentage de polyspermie des ovocytes pré-incubés dans le milieu témoin, le fluide d'oviducte (FO) ou le fluide d'oviducte additionné d'anticorps anti-DMBT1 (FO+Ac)

Pourcentage de polyspermie = $\frac{\text{nombre d'ovocytes ayant plus de 2 pronoyaux}}{\text{nombre d'ovocytes fécondés}}$

CONCLUSION

Le fluide d'oviducte post-ovulatoire a un effet bénéfique sur la fécondation monospermique des gamètes porcins.

La protéine DMBT1 pourrait être impliquée dans la régulation de la polyspermie. Des études sont en cours afin de confirmer ces résultats et de préciser le mode d'action de DMBT1.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mugnier S., Kervella M., Douet C., Canepa S., Pascal G., Deleuze S., Duchamp G., Monget P. Goudet G., 2009. The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine *in vitro* fertilization rate : are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved ? *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 7, 129.
- Marchal R., Caillaud M., Martoriati A., Gérard N., Mermillod P., Goudet G., 2003. Effect of Growth Hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol. Reprod.*, 69, 1013-1022.
- Holmskov U., Lawson P., Teisner B., Tornoe I., Willis A.C., Morgan C., Koch K.B.M., 1997. Isolation and characterization of a new member of the scavenger receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein-D binding molecule. *J. Biol. Chem.*, 272, 13743-13749.