

## MICROENVIRONNEMENT TUBAIRE : RÔLE DANS LA MATURATION DES OVOCYTES CANINS *IN VIVO* ET *IN VITRO*

### *OVIDUCTAL MICROENVIRONMENT : ROLE IN CANINE OOCYTE MATURATION IN VIVO AND IN VITRO*

Par Emmanuel FONTAINE, Karine REYNAUD, Sandra THOUMIRE, Martine CHEBROUT, Laetitia FAURE, Vincent SÉGALINI et Sylvie CHASTANT-MAILLARD  
(Communication présentée le 12 février 2009)

#### RÉSUMÉ

Chez la plupart des mammifères, les ovocytes sont bloqués en métaphase II au moment de l'ovulation et cette inhibition de la méiose est ensuite levée par la fécondation. Chez les chiennes et les autres femelles de canidés, les ovocytes sont libérés au stade de prophase I, et il faut encore attendre 48 à 72 heures pour qu'ils atteignent le stade de métaphase II et deviennent fécondables. Cette particularité constitue aujourd'hui un frein au développement des biotechnologies de la reproduction chez les canidés. En effet, dans les essais de maturation *in vitro* d'ovocytes canins, seuls 10 à 30 % des ovocytes atteignent le stade de métaphase au bout de 72 heures de culture. Chez la chienne, la maturation nucléaire se produisant dans l'oviducte, des substituts de l'oviducte (milieux de culture comme le *Synthetic Oviductal Fluid*, explants d'oviductes, cultures sur tapis de cellules tubaires) ont été utilisés pour les cultures d'ovocytes *in vitro*, afin d'en améliorer le rendement, mais sans grand succès jusqu'à maintenant. Cet échec peut être dû au manque de données sur la composition du liquide tubaire de la chienne. L'étude de ce microenvironnement prend donc tout son intérêt, celui-ci étant probablement assez différent de celui des autres femelles, ne serait-ce que par l'existence du processus de lutéinisation préovulatoire dans cette espèce. À terme, la conception d'un milieu de maturation sur la base de la composition du liquide tubaire pourrait être une voie intéressante pour augmenter les taux de maturation *in vitro*.

**Mots-clés:** oviducte, ovocyte, maturation *in vivo/in vitro*, chien.

#### SUMMARY

*In most mammals, oocytes are ovulated at the metaphase II stage, and the meiosis inhibition is then lifted by fertilization. In bitches and other Canidae species however, oocytes are released at the prophase I stage, and another 48 to 72h are necessary for them to mature into the metaphase II stage and become fertilizable. This specificity is currently hindering the development of reproductive biotechnologies in these species. In vitro maturation rates of canine oocytes are very low, as only 10 to 30 % will reach the metaphase stage after 72h in culture. In bitches, nuclear maturation occurs in the oviduct, and tubal derivatives (culture media, such as Synthetic Oviductal Fluid, oviductal explants, coculture on tubal cell layers) were used to improve the yield, but so far not very successfully. This failure may be due to the lack of data on the composition of oviductal fluid in bitches. Further studies on the oviductal microenvironment of bitches are therefore necessary, as it is probably quite different from the oviductal microenvironment of other females, e.g. the presence of preovulatory luteinisation in bitches only. Creating a maturation medium based on the composition of oviductal fluid could be an interesting avenue to explore to improve in vitro maturation rates.*

**Key words:** oviduct, oocyte, in vivo/in vitro maturation, dog.

## COMMUNICATION

En physiologie de la reproduction, les canidés font figure d'exception. Chez la plupart des mammifères, l'ovulation conduit à la libération d'ovocytes bloqués en métaphase II et l'inhibition de leur méiose est levée par la fécondation. Chez les chiennes et autres femelles de canidés, les ovocytes sont libérés au stade de prophase I et 48 à 72 heures de maturation leur sont nécessaires pour atteindre le stade de métaphase II (Reynaud *et al.* 2005). Cette particularité constitue aujourd'hui le frein au développement des biotechnologies de la reproduction. En effet, pour de nombreuses espèces, la reprise de la méiose *in vitro* par des ovocytes immatures est pratiquement constante : au bout de 24 heures, 98 % des ovocytes atteignent le stade de métaphase II chez la souris (Eppig 1998) et 92 %, chez la vache (Chohan 2004). Chez la chienne, 10 à 30 % d'ovocytes seulement atteignent ce stade au bout de 72 heures (Luvoni *et al.* 2005), et l'objectif est d'améliorer les conditions de maturation *in vitro*. Outre la reprise de la méiose, l'oviducte est le siège du développement embryonnaire précoce : les embryons y séjournent pendant les huit premiers jours chez la chienne (Reynaud *et al.* 2006) contre seulement deux jours chez la truie ou quatre chez la vache. L'étude du microenvironnement tubaire revêt donc un intérêt tout particulier dans cette espèce.

### L'OVIDUCTE

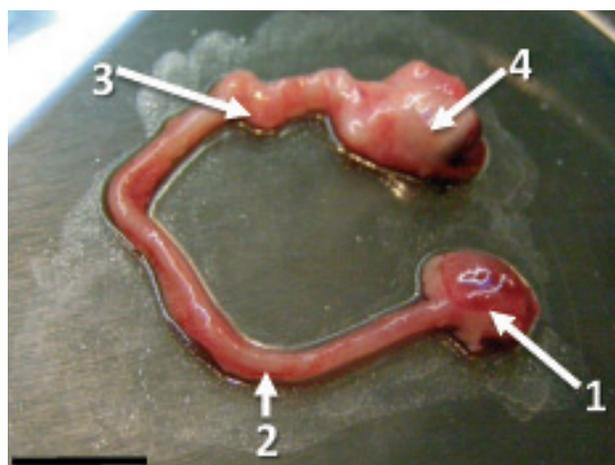
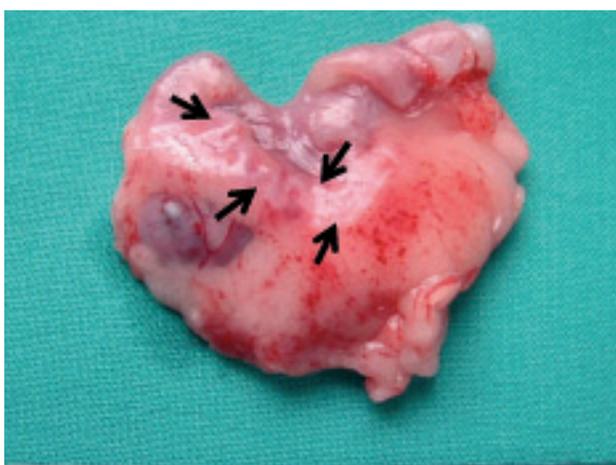
Dérivés de la portion antérieure des canaux de Müller, les oviductes sont également appelés « trompes utérines » ou « trompes de Fallope ». Ils constituent le segment initial des voies génitales femelles, reliant les ovaires à l'utérus. Leur anatomie reste très similaire dans les différentes espèces de mammifères (Barone 1978) avec une subdivision en trois grandes régions (*figure 1*) :

- l'infundibulum, ou pavillon, est la partie proximale de l'organe. Il comprend notamment la frange ovarienne, zone de digitations qui « massent » l'ovaire et permettent la capture des ovocytes, au moment de l'ovulation ;

- l'ampoule, partie la plus dilatée, de 1,5 mm de diamètre chez la chienne (Barone 1978), est le siège de la fécondation.

- l'isthme, partie rétrécie de l'oviducte où se situe le réservoir spermatique, se termine par la jonction uterotubaire.

L'architecture d'ensemble et la structure histologique sont identiques chez tous les mammifères (Steinhauer *et al.* 2004). Une séreuse recouvre une musculature composée de deux couches de fibres musculaires lisses. La muqueuse, composée d'un chorion et d'un épithélium pseudostratifié, présente de nombreux replis. Ces plis sont plus importants dans la région de l'ampoule et leur complexité va en diminuant vers l'isthme (Pavaux 1987). L'épithélium tubaire présente deux grands types cellulaires : des cellules ciliées et des cellules glandulaires, lesquelles montrent à leur apex des granules de sécrétion. Pendant longtemps, on a attribué à l'oviducte le rôle mécanique d'un simple tube de transit hébergeant les gamètes le temps de la fécondation, puis les premières étapes du développement embryonnaire préimplantatoire. Cette conviction a été renforcée par la réalisation des premières maturations oocytaires et fécondations *in vitro* dans les années 1940, en complète ignorance de la spécificité du milieu tubaire *in vivo*. Son rôle est cependant beaucoup plus complexe : pendant la durée du transit tubaire, l'oviducte est le siège d'échanges encore mal compris entre les cellules tubaires et les gamètes, puis l'embryon. Commencée dans les années 1960 dans de nombreuses espèces pour pallier les blocages du développement embryonnaire *in vitro*, l'étude du microenvironnement tubaire a permis de mettre au point des systèmes de culture *in vitro* mimant les conditions *in vivo*. Chez la chienne, ces données font aujourd'hui encore défaut, alors que l'oviducte est le lieu de la reprise de la méiose, de la fécondation et du développement embryonnaire précoce pendant les huit premiers jours.



**Figure 1 : Anatomie de l'oviducte chez la chienne (échelle = 1 cm).**

**A :** Oviducte à l'intérieur de la bourse ovarienne chez la chienne ;

**B :** Oviducte après dissection (1 : pavillon ; 2 : ampoule ; 3 : isthme ; 4 : utérus).

## COMPOSITION DU MICROENVIRONNEMENT TUBAIRE

Obtenir des milieux recréant les conditions de maturation nucléaire des ovocytes canins *in vivo* nécessite de connaître le plus précisément possible la composition de l'environnement auquel ceux-ci sont exposés durant leur long transit tubaire. Une seule publication a trait à la composition du liquide tubaire canin en glycosaminoglycanes et à leur rôle dans la capacitation spermatique (Kawakami *et al.* 2000). Les analyses biochimiques réalisées chez la vache (Hugentobler *et al.* 2008), la truie (Bui *et al.* 1990), montrent que les sécrétions tubaires sont constituées d'un mélange de composés transsudés d'origine sérique et de composés spécifiques sécrétés par l'épithélium tubaire, dont la composition est sensiblement identique dans ces espèces

### Techniques d'étude du liquide tubaire

Les études du microenvironnement tubaire sont globales car les techniques de collecte de liquide tubaire ne permettent pas de prélever des échantillons dans des parties spécifiques de l'oviducte. Classiquement, l'ampoule est le lieu de collecte privilégié.

#### Récupération du liquide *in vivo*

Borland *et al.* (1980) ont opté pour une ponction directe de l'oviducte chez la souris et chez la femme. Après cathétérisation, le liquide tubaire est aspiré à l'aide d'une seringue et sa composition en ions et nutriments déterminée. Néanmoins, ces études ne mentionnent pas les volumes récupérés.

La canulation tubaire a été aussi utilisée chez les bovins. Un cathéter inséré dans l'oviducte et relié à un système de récolte a été laissé en place pendant 2 à 156 jours (Kavanaugh & Killian 1988). Les volumes récoltés ont été de 0,1 à 3 mL par jour. Cette technique présente l'inconvénient majeur d'induire une inflammation au site de canulation, qui peut modifier la quantité et la composition du liquide récupéré. Aussi a-t-elle été utilisée pendant des durées plus courtes par Hugentobler *et al.* (2007a, 2007b). Les oviductes ont été cathétérisés pendant trois heures, autorisant la collecte d'en moyenne 270  $\mu$ L de liquide.

#### Récupération d'oviductes à l'abattoir

Elhassan *et al.* (2001) chez des bovins et Li *et al.* (2007) chez des porcins ont étudié le microenvironnement tubaire en aspirant le liquide contenu dans des oviductes récupérés *post mortem*. Néanmoins, après la mort de l'animal, les phénomènes de lyse et de mort cellulaires sont particulièrement marqués dans l'oviducte dont la muqueuse épaisse gêne la diffusion de l'oxygène. La libération des molécules intracytoplasmiques dans la lumière tubaire, consécutive à la nécrose, est la cause d'une surévaluation de leur concentration. Le temps entre la mort et le prélèvement doit être le plus court possible, de l'ordre de la minute (Li *et al.* 2007). Elhassan *et al.* observent une concentration d'acides aminés de 31,4 mM, dans des prélèvements réalisés une heure et demie après la mort de l'animal, nettement

plus importante que celle de 4,65 mM mesurée par Hugentobler *et al.* (2007a) à la suite d'un cathétérisme de courte durée chez la vache vigile.

#### Récupération de liquide *in vitro*

Des perfusions artérielle et luminale ont été pratiquées *in vitro* chez le lapin (Leese & Gray 1985). Une artère de l'oviducte, conservée intacte, est perfusée par du milieu de culture (M199) et l'organe est maintenu dans un état physiologique pendant trois heures. Dans le même temps, sont recueillies les sécrétions de l'épithélium tubaire grâce à la canulation de la lumière de l'oviducte. Des techniques de culture *in vitro* permettent d'étudier ces sécrétions. Des explants de muqueuse tubaire ou de cellules épithéliales peuvent être aussi cultivés en présence d'un acide aminé marqué, par exemple de la méthionine. Incorporé dans les synthèses protéiques, il permet de révéler les molécules néosynthétisées.

#### Propriétés et composition du fluide tubaire

Étudié depuis les années 1960, le fluide tubaire présente des propriétés et une composition peu différentes selon les espèces.

#### Propriétés physicochimiques

La pression osmotique du liquide tubaire est d'environ 290 mOsm/kg chez toutes les espèces étudiées (Ménézo & Guérin 1997), voisine de celle du sérum. Sa pression oncotique est plus basse du fait de la plus faible teneur en protéines. La viscosité est, comme pour le sérum, de l'ordre de 1,8 mPa/s, malgré une concentration en protéines plus faible. Son pH est situé entre 7,2 et 7,6, l'alcalinité étant liée à une forte activité anhydrase carbonique. Son potentiel redox est de -0,1 mV : il dépend de la présence de plusieurs composés réducteurs (glutathion réduit, cystéine, hypotaurine, lactate, ...) et correspond à une faible pression partielle en oxygène (60 à 70 mmHg), liée à l'épaisseur de la muqueuse tubaire. Quelle que soit l'espèce, la pression partielle en oxygène est toujours, *in vivo*, inférieure au taux de 20 % d'oxygène de l'air ambiant (environ 160 mmHg), taux maintenu dans les incubateurs de type air/CO<sub>2</sub>.

#### Électrolytes

Les ions chlorure et sodium sont les principaux électrolytes du liquide tubaire et leur concentration équivaut à celle du sérum (Ménézo & Guérin 1997). La concentration des ions calcium et magnésium est également voisine de celle du sérum. Par contre, celle de potassium et de bicarbonates est deux à cinq fois plus élevée dans le fluide tubaire. La concentration plus importante de potassium semble nécessaire pour la fécondation et le développement embryonnaire. Néanmoins, d'importantes variations sont retrouvées entre les espèces. Chez les bovins, la concentration de potassium est d'environ 5 mM (Hugentobler *et al.* 2007b), alors que chez la femme, elle se situe aux alentours de 25 mM (Ménézo & Guérin 1997).

## COMMUNICATION

### Glucose, lactate et pyruvate

Glucose, lactate et pyruvate participent au développement et à la survie des gamètes et de l'embryon; ils proviennent principalement du sérum et dans une moindre mesure, d'une synthèse par les cellules tubaires. Glucose et pyruvate sont moins concentrés dans le sérum, alors que les lactates, formes prédominantes dans l'oviducte, le sont davantage. Un excès du métabolisme du glucose, avec formation d'acide lactique, durant les premières phases du développement préimplantatoire, peut être délétère pour les embryons: la forte concentration des lactates pourrait limiter l'utilisation du glucose et sa conversion en acide lactique par glycolyse. Le pyruvate intervient dans la lutte contre les radicaux libres, avant d'être utilisé dans le métabolisme énergétique des gamètes et de l'embryon. Chez la vache (Hugentobler *et al.* 2008) et chez la lapine (Ménezo & Guérin 1997), la concentration du glucose varie entre 1 et 3 mM, alors que chez la truie, elle est cinq fois plus élevée (Nichols *et al.* 1998).

### Précurseurs de l'ADN et de l'ARN

Les précurseurs sont présents dans l'oviducte sous forme de bases libres ou de nucléosides (adénosine). L'embryon est capable de synthétiser des bases de l'ADN et des ARNs. Il est probable qu'*in vitro*, un apport de bases soit utile, puisque l'embryon incorpore des bases puriques et pyrimidiques dès le stade une cellule, avec une accélération à la transition morula/blastocyste.

### Acides aminés

L'aminogramme du liquide tubaire est original par rapport à celui du sérum. La plupart des acides aminés (méthionine, leucine, isoleucine, phénylalanine, lysine, asparagine, alanine, tyrosine, acide glutamique et glutamine, hypotaurine et taurine et surtout glycine) sont présents dans les sécrétions tubaires, en concentration plus importante que dans le sérum (Ménezo & Guérin 1997). Cette différence suggère une excrétion active des acides aminés dans le milieu. Seuls les acides aminés hydroxylés (thréonine, sérine et hydroxyproline) sont peu représentés.

### Protéines

Les protéines du fluide tubaire sont essentiellement d'origine plasmatique, les plus abondantes étant l'albumine représentant 60 à 80 % des protéines, la transferrine et les immunoglobulines G. Leur concentration est faible et correspond à 5-10 % de celle du sérum. De très nombreux facteurs de croissance sont présents dans l'oviducte de la femme, l'Insulin like Growth Factor (IGF-1), le Leukemia Inhibitory Factor (LIF), le Transforming Growth Factor alpha (TGF $\alpha$ ), le Platelet Derived Growth Factor (PDGF), l'Interleukine 6 (IL6), le Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF). Il existe des variations entre les espèces: chez la chèvre, l'EGF (Epidermal Growth Factor) n'est pas identifié dans l'oviducte, alors qu'il est présent dans l'utérus; l'EGF est par contre présent dans l'oviducte de souris. Ont également été mises en évidence chez la femme des protéines comme la Pregnancy Associated Protein-A (PAPP-A), la Placental Protein 5 (PP5), la Placental Protein

10 (PP10) et la PP14, aussi appelée glycodéline A. Celle-ci aurait des effets immunosuppresseurs et empêcherait l'adhésion du spermatozoïde à la zone pellucide chez l'homme (Oehninger *et al.* 1995). *In vivo*, le spermatozoïde est également exposé à la glycodéline F (Yeung *et al.* 2007): elle empêche la réaction acrosomique lorsque le spermatozoïde traverse le cumulus pour atteindre la zone pellucide. L'ostéopontine, protéine connue pour intervenir dans les phénomènes d'attachement et de migration cellulaire, a été mise en évidence chez la vache et la truie (Gabler *et al.* 2003; Hao *et al.* 2006) Elle interviendrait lors de la fécondation, notamment pour prévenir la polyspermie.

Des glycoprotéines spécifiques de l'oviducte (OGP ou oviduc-tine) ont été décrites chez plusieurs espèces, l'espèce humaine (Buhi *et al.* 1989), la vache (Boice *et al.* 1990) et la truie (Buhi *et al.* 1993). Ces protéines, œstrogéno-dépendantes, de haut poids moléculaire, synthétisées et sécrétées dans la lumière tubaire, se présentent au moins sous deux isoformes chez la femme, trois isoformes majeures et deux variants chez la truie (Kouba *et al.* 2000), sept isoformes chez la vache (Vieira *et al.* 1999). Les OGP des différentes espèces présentent de fortes homologies de séquence et de structure. Elles augmentent la viscosité du fluide tubaire, stabilisant ainsi le milieu environnant les gamètes mâles et femelles (Hunter 1994). La dispersion des nutriments essentiels et des ions, particulièrement affectée par les battements ciliaires et les contractions musculaires est ainsi limitée et l'augmentation de la viscosité pourrait diminuer la perte de liquide dans la cavité péritonéale par l'ostium. Ces protéines spécifiques participent également à l'adhésion des spermatozoïdes dans le réservoir spermatique de l'isthme, favorisent la capacitation et facilitent la pénétration spermatique lors de la fécondation (Martus *et al.* 1998). En se liant à la zone pellucide des embryons, elles participeraient à la protection immunologique de l'embryon *in vivo*, en constituant un inhibiteur de l'activité du complément (Oliphant *et al.* 1984).

### Lipides

La concentration des phospholipides, triglycérides, acides gras libres, cholestérol libre estérifié est bien plus faible que dans le sérum. La choline, qui peut servir de base à la synthèse des phospholipides, est présente. L'embryon est confronté rapidement à des besoins en lipides importants pour assurer ses synthèses membranaires. Il incorpore les acides gras et du cholestérol et les synthétise à partir du glucose et de plus petits précurseurs comme l'acétate et le pyruvate.

### Hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes, notamment l'œstradiol et la progestérone, sont retrouvées dans le milieu tubaire. Dans l'oviducte de vache (Wijayagunawardane *et al.* 1998), leur concentration est plus importante après l'ovulation, particulièrement dans l'oviducte ipsilatéral au site d'ovulation. Cette augmentation est certainement liée à la libération du contenu folliculaire dans l'oviducte. Néanmoins, elle ne varie pas tout au long de l'oviducte, quel que soit le stade du cycle: environ 500

ng/mL de progestérone, alors que la concentration sanguine est d'environ 4 à 6 ng/mL. Chez la chienne, contrairement aux autres espèces, une lutéinisation précoce des follicules se produit plusieurs jours avant l'ovulation (Concannon *et al.* 1975). Le liquide folliculaire présente une concentration extrêmement élevée de progestérone, environ 10000 fois supérieure à celle du sérum, entre 11 µg/mL (Marsello 2005) et 24 µg/mL (Metcalf 1999) contre 4 à 6 ng/mL dans le sérum, susceptible de créer un microenvironnement tubaire original distinct de celui des autres mammifères.

Ces analyses de composition montrent que le microenvironnement tubaire résulte à la fois des synthèses de l'épithélium, d'une excrétion de facteurs issus du sérum et du liquide folliculaire après ovulation. À tous ces titres, sa composition n'est pas figée et est soumise à de nombreux facteurs de variation.

## FACTEURS DE VARIATION DE LA COMPOSITION DU FLUIDE TUBAIRE

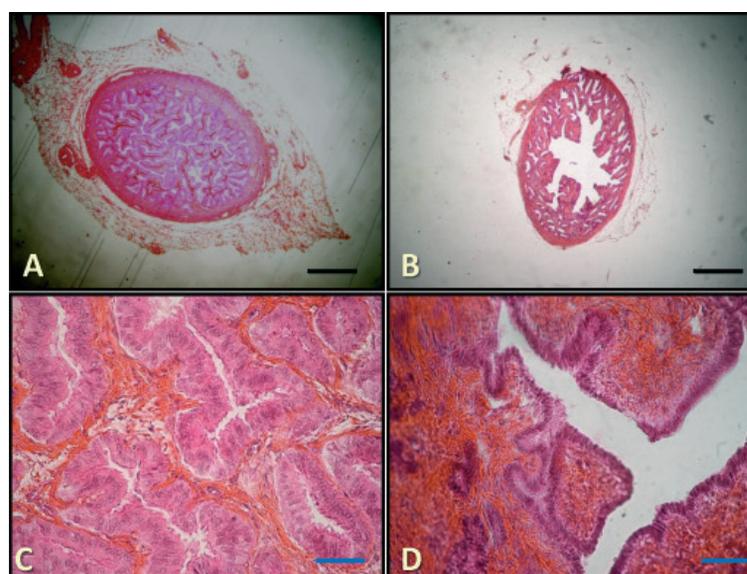
### Variations liées à la structure

L'ampoule présente une surface de sécrétion plus importante que l'isthme. Chez la lapine, elle secrète 1,15 mL de fluide contre 0,32 mL pour l'isthme pendant une même durée de trois jours (Leese 1983). L'épithélium tubaire compte deux principaux types de cellules dont les proportions varient suivant la région considérée, ciliées et glandulaires, ces dernières sécrétant notamment les OGP. Reflet de ces variations, le profil de sécrétion des différentes sections du tube est différent. Chez la truie, la production d'OGP est plus importante dans l'ampoule que dans l'infundibulum et enfin dans l'isthme (Buhi *et al.* 1990). L'âge affecte également fortement la structure histologique de l'oviducte, influant sans doute sur son activité sécrétoire : par exemple, les cellules glandulaires sont plus aplaties chez les chiennes âgées. De tels changements morphologiques traduisent des changements de l'activité de synthèse, qui contribuent à la variation de la composition du fluide tubaire au cours du cycle.

### Influence hormonale

L'histologie tubaire est fortement modifiée selon le stade du cycle de l'animal, les populations cellulaires variant en fonction de son statut hormonal (**figure 2**). Chez la brebis en anœstrus, les cellules de l'oviducte sont majoritairement indifférenciées (Murray 1995). Sous imprégnation œstrogénique en début de phase folliculaire, la proportion de cellules ciliées augmente, alors que sous l'effet de la progestérone, les cellules se différencient et leur proportion diminue. Chez la chienne où existe une lutéinisation pré-ovulatoire, cette différenciation intervient quand le ratio progestérone/œstradiol dans le fluide dépasse 50 (Verhage *et al.* 1973a; Verhage *et al.* 1973b). Ces variations dépendent

également de la zone considérée : dans l'infundibulum, le pourcentage de cellules ciliées reste important en phase lutéale, alors qu'il chute fortement dans l'ampoule et l'isthme (Steinhauer *et al.* 2004). Les cellules glandulaires sont moins étudiées mais leur nombre augmente aussi sous l'effet des œstrogènes, les variations des sécrétions tubaires au cours du cycle suggérant que ces cellules subissent également des cycles de différenciation/dédifférenciation. Ainsi, dans toutes les espèces, le volume des sécrétions tubaires ainsi que la concentration de leurs différents constituants sont augmentés lors de la phase œstrogénique du cycle (œstrus) par rapport à la phase lutéale. Chez la truie, la concentration de glucose diminue de dix fois après l'ovulation (Nichols *et al.* 1998) et de six chez la femme, entre la phase folliculaire et le milieu de la phase lutéale (Gardner *et al.* 1996). Des concentrations plus importantes en acides aminés pendant l'œstrus dans le fluide tubaire par rapport au plasma traduisent l'existence d'un transport actif hormonodépendant dans cette espèce, comme chez la brebis (Nancarrow *et al.* 1992) et la jument (Engle *et al.* 1984). Sous influence œstrogénique, les cellules glandulaires synthétisent également l'OGP (Oliphant *et al.* 1984). Chez la plupart des espèces, le pic de sécrétion de cette protéine se retrouve pendant l'œstrus, entre le milieu et la fin de la phase folliculaire, période correspondant généralement à la fécondation et aux premières étapes du développement préimplantatoire.



**Figure 2 : Variations histologiques liées au stade du cycle chez la chienne. (échelle noire = 0,1 mm ; échelle bleue = 2,5 µm)**

**A & C :** Coupe histologique d'oviducte chez une chienne en œstrus (Coloration HES) : sous l'imprégnation œstrogénique, l'épithélium est très différencié, de nombreuses circonvolutions sont retrouvées ;

**B & D :** Coupe histologique d'oviducte chez une chienne en anœstrus (Coloration HES x200) : l'épithélium est peu différencié, ses circonvolutions sont peu marquées.

## COMMUNICATION

### Présence des gamètes et des spermatozoïdes

Très peu d'études portent sur les différences de sécrétions de l'épithélium tubaire en présence des gamètes et des embryons. Chez la souris, au passage de l'ovocyte fécondé, la synthèse d'ARN par les cellules épithéliales augmente (Freese *et al.* 1973). Il pourrait s'agir là d'une réponse aux messages émis par le zygote au cours de son transit, message dont la nature chimique est inconnue mais probablement de type peptidique (Kent 1973). Il est probable que la présence des gamètes soit à l'origine d'autres modifications des profils de sécrétion.

Les sécrétions tubaires constituent donc un milieu complexe dans lequel se déroule la fécondation, les premiers clivages de l'embryon et chez la chienne, la reprise de la méiose. Ce milieu est à recréer pour que ces phénomènes puissent se réaliser correctement *in vitro*.

### UTILISATIONS POSSIBLES DE L'OVIDUCTE EN BIOTECHNOLOGIE DE LA REPRODUCTION

#### Transplantation embryonnaire dans des oviductes *in vivo*

##### Transplantations homospécifiques

Lorsque les femelles receveuses appartiennent à la même espèce que les femelles donneuses d'embryons, la transplantation est dite homospécifique. Elle a été pratiquée chez la souris (Kaneda *et al.* 2007), la vache (Wetscher *et al.* 2005), la truie (Ueno *et al.* 2007). Ce transfert, dans l'oviducte, de blastocystes produits *in vivo* ou *in vitro*, est généralement réalisé au début de la phase lutéale de la femelle receveuse, en insérant un cathéter par l'ostium tubaire, ou après ponction de la paroi de l'oviducte. Chez la chienne, le cathétérisme de l'ostium (**figure 3**), entreprise parfois ardue, nécessite plusieurs essais: le conduit n'exécède pas 1,5 mm de diamètre dans sa partie la plus large et surtout, l'ostium est enfoui dans les replis congestionnés du pavillon. Cette procédure, souvent très traumatique, peut entraîner un saignement et une inflammation susceptibles de provoquer des modifications potentiellement néfastes du milieu. Cathétériser directement l'oviducte en ponctionnant sa paroi semble l'approche la plus facilement réalisable et la moins traumatisante. Cette technique a été utilisée, chez la chienne, non seulement pour la mise en place d'ovocytes fécondés *in vitro* (England *et al.* 2001), mais surtout pour la réalisation d'inséminations avec de très faibles quantités de spermatozoïdes (Tsutsui *et al.* 2003). Une seule étude rapporte l'utilisation de cette technique pour la maturation nucléaire d'ovocytes canins immatures, le taux de reprise de la méiose ayant été de 5,9 % au bout de quatre jours (Lee *et al.* 2005). C'est également par cette technique que les embryons issus du clonage de cellules somatiques de chien (donc au stade d'une cellule) ont été transplantés *in utero* chez la chienne dès leur reconstitution (Jang *et al.* 2008): 358 embryons furent ainsi transplantés chez 20 chiennes, deux d'entre elles furent gestantes et une seule réussit à maintenir sa gestation jusqu'au terme, donnant naissance à deux chiots.

##### Transplantations hétérospécifiques

Des embryons bovins et porcins ont été introduits, au stade zygote, dans des oviductes de brebis, ligaturés *in vivo*. Six jours après, ils sont récupérés par perfusion des oviductes. Rizos *et al.* (2002a) ont recueilli, par cette technique, 34,5 % de blastocystes bovins et Lagutina *et al.* (2006), 61,8 % de blastocystes porcins, à comparer respectivement aux 30 et 42,4 %, lorsque les embryons au stade zygote ont été cultivés dans des conditions de culture classique *in vitro*. Ces résultats tendent à montrer que le microenvironnement tubaire est peu spécifique.

##### Transplantations dans l'utérus

Le milieu tubaire n'est pas strictement indispensable au développement embryonnaire. Chez le furet, le transfert homospécifique d'embryons aux stades tubaires déposés directement dans l'utérus a permis d'obtenir de 71 à 90 % de gestations (Li *et al.* 2006). De la même manière, Tsutsui *et al.* (2006) ont transféré des embryons précoces au stade zygote de 4 cellules dans l'utérus de chiennes en méoestrus: sur 8 chiennes ainsi transplantées, une donna naissance à deux chiots.

##### Milieus de culture *in vitro*

En 1972, Tervit *et al.* ont créé le premier milieu de culture reproduisant la composition du liquide tubaire de la brebis au moment de l'ovulation, le Synthetic Oviductal Fluid (SOF). Les connaissances se précisant avec le temps, Walker *et al.* (Walker *et al.* 1996) l'ont modifié, en s'attachant à retrouver les concentrations en acides aminés du liquide tubaire. Alors qu'avec le SOF, seulement 20 % de blastocystes ont été obtenus sans un blastocyste expansé chez les ovins, ce milieu modifié a permis de récupérer jusqu'à 74 % de blastocystes et



**Figure 3: Cathétérisme de l'oviducte *in vivo* chez la chienne.**  
La flèche désigne l'ostium tubaire par lequel est inséré le cathéter.

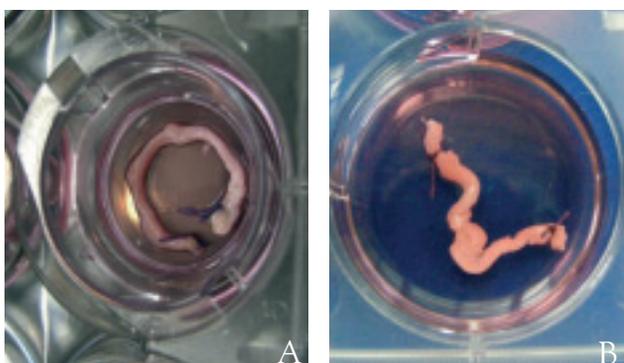
54,5 % de blastocystes expansés. L'effet positif du SOF amélioré en fait aujourd'hui le milieu le plus utilisé pour la culture d'embryons *in vitro*. En moyenne, plus de 70 % de gestations à terme sont ainsi obtenues après transfert embryonnaire. Toutefois, chez la chienne, ces milieux ne permettent pas d'obtenir de meilleurs taux d'ovocytes en métaphase II que des milieux classiques comme le M199 (Hewitt & England 1998; Bolamba *et al.* 2002) : les taux de maturation obtenus après 72 heures de culture sont de 12,2 % (Bolamba *et al.* 2002) ou de 10 % environ (Luvoni *et al.* 2005).

#### Systèmes de coculture *in vitro*

Les milieux de culture, même ceux reconstitués sur le modèle des sécrétions tubaires, s'éloignent des conditions *in vivo* où les cellules de l'épithélium sécrètent activement des protéines spécifiques. Aussi, pour recréer de façon artificielle un environnement proche des conditions *in vivo*, favorables à la maturation des ovocytes et au développement précoce des embryons, des systèmes de coculture ont été essayés. Les ovocytes ou les embryons sont cultivés soit sur des explants d'oviductes (oviducte entier ou partie d'un oviducte cultivé *in vitro*), soit sur des tapis de cellules tubaires.

#### Explants d'oviductes

La technique des explants, utilisée par Biggers en 1961, permet aux embryons de se développer dans un milieu où sont respectés l'environnement liquidien, l'architecture globale de l'organe et de ce fait, les proportions des différentes catégories cellulaires. Les oviductes proviennent de femelles préalablement stimulées par des gonadotrophines ou de femelles spontanément en œstrus. Ils sont cultivés, soit immergés dans le milieu de culture (Biggers *et al.* 1961), soit sur des inserts, un film liquide de milieu de culture étant étalé sur l'explant (Rizos *et al.* 2007) (*figure 4*). Les embryons sont ainsi cultivés pendant quatre à six jours. Les oviductes peuvent être laissés ouverts ou ligaturés à leurs extrémités. L'avantage des ligatures est de conserver les sécrétions tubaires tout en permettant aux ovocytes de rester dans la lumière (Luvoni *et al.* 2003). Toutefois, la difficulté est la récupération des embryons ou des ovocytes insérés (Rizos *et al.* 2003) (*figures 5a, 5b, 6*). L'ouverture de l'oviducte permet alors d'exposer sa muqueuse mais cette procédure entraîne la perte de l'architecture globale de l'oviducte et la technique se rapproche alors plus d'une culture sur tapis cellulaire.



**Figure 4 :** Les différents systèmes de culture d'explants utilisables. (A) : Oviducte ligaturé cultivé sur insert ; (B) : Oviducte ligaturé immergé dans le milieu de culture.



**Figure 5 :** Mise en place des ovocytes dans les oviductes. Le cathéter est inséré soit dans le pavillon (5a) soit directement dans la lumière tubaire (5b) et sert à l'introduction de la pipette Pasteur contenant les ovocytes.



**Figure 6 :** Récupération des ovocytes après culture dans les explants tubaires. Une pipette Pasteur (6a) ou un cathéter (6b) est introduit dans la lumière tubaire et permet de la perfuser à l'aide de milieu de culture pour récupérer les ovocytes.

## COMMUNICATION

Les explants d'oviductes de souris ont permis la culture *in vitro* d'embryons de souris (Biggers *et al.* 1961), de porcins (Chung *et al.* 1994) et de bovins (Rizos *et al.* 2007), du stade d'une cellule au stade morula/blastocyste. Pour les embryons porcins, 78,1 % d'entre eux atteignent le stade blastocyste, à comparer aux 35,7 % pour ceux cultivés uniquement dans un milieu de culture (Krisher *et al.* 1989). De même, les cocultures hétérospécifiques d'embryons bovins dans des explants d'oviductes de souris (Hosoi *et al.* 1995), pendant 46 à 48 heures, permettent d'obtenir des taux de développement jusqu'au stade blastocyste beaucoup plus importants (42,9 %) que ceux obtenus avec une coculture de cellules de la granulosa (28,3 %). Des explants d'oviductes de mouton ont également été utilisés avec succès pour cultiver des embryons bovins produits *in vitro* (Rizos *et al.* 2002a). Chez la chienne, une seule étude rapporte des résultats obtenus par la technique des explants d'oviductes, prélevés chez des chiennes en œstrus (Luvoni *et al.* 2003). Ces auteurs recueillent 31,9 % d'ovocytes au stade métaphase I- métaphase II dans des oviductes ligaturés, contre 12,5 % dans des oviductes ouverts et 3,7 % dans un milieu de culture *in vitro* (M199).

### Tapis cellulaires

Les cellules épithéliales tubaires ou *Oviductal Epithelial Cells* (OEC) sont récupérées par le raclage de la muqueuse tubaire ou la perfusion de la lumière de l'oviducte, éventuellement après l'action d'une protéase pour désolidariser les cellules de leur assise basale. Elles sont ensuite mises en culture dans les mêmes conditions que les explants tubaires et constituent des tapis, classiquement appelés les tapis OEC. Les principales contaminations sont d'origine bactérienne ou cellulaire, les fibroblastes proliférant beaucoup plus vite que les cellules tubaires. L'aptitude de la culture à sécréter des OGP est un marqueur de qualité (Leese *et al.* 2008). Le stade du cycle de l'animal, auquel sont prélevées ces cellules, semble être de faible importance (Thibodeaux *et al.* 1992) et chez les bovins, la concentration et la nature des protéines synthétisées par les tapis de cellules tubaires ne sont significativement pas modifiées selon le stade du cycle.

En culture homospécifique, les tapis d'OEC augmentent le taux de développement embryonnaire obtenu *in vitro*. Par cette technique, Thibodeaux *et al.* (1992) obtiennent, avec des tapis d'OEC bovines, entre 35 et 39 % de blastocystes au bout de 8 jours de culture et de 14 à 15 % de blastocystes expansés à 10 jours, contre 9 % de blastocystes et aucun blastocyste expansé aux mêmes dates, dans des conditions de culture classique (M199+10% sérum) (Thibodeaux *et al.* 1992). Ce système de coculture avec des cellules tubaires porcines (POEC) chez la truie augmente le taux de fécondation *in vitro* et diminue la polyspermie, problème majeur rencontré dans cette espèce. Ils augmentent de façon significative le pourcentage de blastocystes obtenus (Bureau *et al.* 2000), même si l'amélioration n'est pas

retrouvée systématiquement (Kidson *et al.* 2002). La coculture des embryons avec des cellules tubaires améliore les résultats appréciés par la qualité du développement embryonnaire après FIV chez la femme. La comparaison avec d'autres cocultures (cellules de granulosa, cellules endométriales) montre la supériorité des cellules d'oviducte (Feng *et al.* 1996).

Chez la chienne, avec des tapis de cellules épithéliales tubaires (COEC) prélevées chez des chiennes en œstrus, Hewitt & England (1998) obtiennent 9 % d'ovocytes en métaphase II, sans amélioration nette par rapport aux résultats obtenus en milieu de culture. Néanmoins, Bogliolo *et al.* (2002) ont obtenu de 16,7 et 23,2 % de d'ovocytes en métaphase II après respectivement 48 et 72 heures de coculture.

## CONCLUSION

Dans un grand nombre d'espèces, le rendement des procédures de production d'embryons *in vitro* a été amélioré par l'utilisation de substituts de l'oviducte, qu'il s'agisse de milieux de culture dont la composition se rapproche de celle du microenvironnement tubaire, de systèmes de coculture des embryons dans des oviductes entiers (explants d'oviductes) ou sur des tapis de cellules épithéliales tubaires. Ces systèmes ont soit permis de dépasser les stades de blocage préalablement rencontrés lors du développement embryonnaire *in vitro*, soit de diminuer le taux de polyspermie, soit d'augmenter le taux de blastocystes, soit enfin d'améliorer leur qualité.

Chez la chienne, l'oviducte est le siège de la reprise de la méiose en plus d'être celui de la fécondation et des premiers jours du développement embryonnaire. Si les tapis de cellules tubaires ne semblent pas apporter d'amélioration du taux de maturation *in vitro* (MIV) dans cette espèce, le système d'explants d'oviductes est prometteur. Néanmoins, les contraintes (logistiques et sanitaires) qu'ils imposent sont fortes. À terme, la conception d'un milieu de maturation sur la base de la composition du liquide tubaire pourrait être une voie intéressante pour augmenter les taux de maturation *in vitro*.

Or le microenvironnement tubaire de la chienne est probablement assez différent de celui des autres femelles, du fait par exemple de la lutéinisation préovulatoire qui existe dans cette espèce. Actuellement les connaissances sur l'oviducte de la chienne sont très limitées et aucune donnée n'est disponible concernant le liquide tubaire. Outre cet intérêt appliqué, la connaissance des composants du liquide tubaire dans les 72 heures qui suivent l'ovulation pourrait également permettre de progresser dans la découverte du mécanisme spécifique de la reprise de la méiose ovocytaire chez la chienne.

## BIBLIOGRAPHIE

- Barone, R. 1978. *Anatomie comparée des mammifères domestiques*: Tome 3, Splanchnologie (fascicule 2), Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Paris, VIGOT.
- Biggers, J., Gwatkin, R., Brinster, R. 1961. Development of mouse embryos in organ culture of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature* 194: 747–749.
- Boice, M., Geistert, R., Blair, R., Verhage, H. 1990. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol Reprod.* 43: 457–465.
- Bolamba, D., Russ, K., Olson, M., Sandler, J., Durrant, B. 2002. In vitro maturation of bitch oocytes from advances preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology* 58: 1689–1703.
- Borland, R., Borland, R.M., Biggers, J.D., Lechene, C.P., Taymor, M.L. 1980. "Elemental composition of fluid in the human fallopian tube." *J. Reprod. Fertil.* 58: 479–482.
- Buhi, W., Van Wert, J., Alvarez, J., Dones-Smith, M., Bernhisel, M. 1989. Synthesis and secretion of proteins by post-partum human oviductal tissue in culture. *Fertility and Sterility* 51: 75–80.
- Buhi, W., Alvarez, I., Sudhipong, V., Dones-Smith, M. 1990. Identification and characterization of de novo synthesized porcine oviductal secretory protein. *Biol Reprod.* 43: 929–938.
- Buhi, W., O'Brien, B., Alvarez, I., Erdos, G., Dubois, D. 1993. Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biol Reprod.* 48: 1274–1283.
- Bureau, M., Bailey, J., Sirard, M. 2000. Influence of oviductal cells and conditioned medium on porcine gametes. *Zygote* 8: 139–144.
- Chohan, K. 2004. In vitro maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology* 61 (3): 373–380.
- Chung, B., Chung, H., Uhm, S., Chang, W., Seung, K., Lee, H., Chung, K. 1994. Organ culture of in vitro produced porcine embryos from follicular oocytes using mouse oviducts. *Theriogenology* 41: 178.
- Concannon, P., Hansel, W., Isek, W. (1975) The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod.* 13: 112–121.
- Elhassan, Y., Elhassan, Y.M., Wu, G., Leanez, A.C., Tasca, R.J., Watson, A.J., Westhusin, M.E. 2001. "Aminoacid concentrations in fluid from the bovine oviduct and uterus and in KSOM based culture media." *Theriogenology* 55: 1907–1918.
- England, G., Verstegen, J., Hewitt, D. 2001. Pregnancy following in vitro fertilization of canine oocytes. *Vet Rec.* 148: 20–22.
- Engle, C., Foley, C., Plotka, E., Witherspoon, D. 1984. Free aminoacid and proteins concentrations in reproductive tract fluids in the mare. *Theriogenology* 21: 919–930.
- Eppig, J. 1998. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development in vitro and in vivo. *Theriogenology* 49 (2): 415–422.
- Feng, H., Wen, X., Amet, T., Presser, S. 1996. Effect of different co-culture systems in early human embryo development. *Hum Reprod.* 11: 1525–1528.
- Freese, V., Orman, S., Paulos, O. 1973. An autoradiographic investigation of epithelium egg interaction in the mouse oviduct. *Am J Obstet Gynecol.* 117: 364–370.
- Gabler, C., Chapman, D., Killian, G. 2003. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction* 126 (6): 721–729.
- Gardner, D., Lane, M., Calderon, I., Leeton, J. 1996. Environment of the human preimplantation embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertility and Sterility* 65: 349–353.
- Hao, Y., Mathialagan, N., Walters, E., Mao, J., Lai, L., Becker, D., Li, W., Critser, J., Prather, R. 2006. Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biol Reprod.* 75: 726–733.
- Hewitt, D. & England, G. 1998. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim Reprod Sci.* 55: 63–75.
- Hosoi, Y., Minami, N., Iritani, A. 1995. Embryo culture in explanted oviducts in mice and cattle. *Horm Res.* 44 (Suppl 2): 9–14.
- Hugentobler, S.A., Diskin, M.G., Leese, H.J., Humpherson, P.G., Watson, T., Sreenan, J.M., Morris, D.G. 2007a. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Mol Reprod Dev.* 74 (4): 445–454.
- Hugentobler, S.A., Morris, D., Sreenan, J., Diskin, M. 2007b. Ion concentration in oviduct and uterine fluid and blood serum during the estrous cycle in the bovine. *Theriogenology* 68: 538–548.
- Hugentobler, S.A., Humpherson, P., Leese, H., Sreenan, J., Morris, D. 2008. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Mol Reprod Dev.* 75 (3): 496–503.
- Hunter, R. 1994. Modulation of gamete and embryonic microenvironment by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev.* 39: 176–181.
- Jang, G., Oh, H., Kim, M., Fibrianto, Y., Hossein, M., Kim, H., Kim, J., Hong, S., Park, J., Kang, S., Lee, B. 2008. Improvement of canine somatic cell nuclear transfer procedure. *Theriogenology* 69 (2): 146–154.
- Kaneda, H., Taguma, K., Suzuki, C., Ozaki, A., Nakamura, C., Kobayashi, K., Wakana, S., Shiroishi, T. 2007. An optimal embryo transfer condition for the effective production of DBA/2J mice. *Exp Anim.* 56 (5): 385–388.
- Kavanaugh, J. & Killian, G. 1988. Bovine oviductal cannulations. *J. Invest Surg.* 1: 201–208.
- Kawakami, E., Arai, T., Oishi, I., Hori, T., Tsutsui, T. 2000. Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminoglycan amounts of oviductal and uterine fluids in bitches. *J Vet Med Sci.* 62 (1): 65–68.
- Kent, H. 1973. A polypeptide from oviductal content which influences ovarian function. *Biol Reprod.* 8: 38–42.
- Kidson, A., Schoevers, E., Langendijk, P., Verheijden, J., Colenbrander, B., Bevers, M. 2002. The effect of oviductal epithelial cell coculture during in vitro maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. *Theriogenology* 59: 1889–1903.
- Kouba, A., Abeydeera, L., Alvarez, I., Day, B., Buhi, W. 2000. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy and embryonic development in vitro. *Biol Reprod.* 63: 242–250.
- Krisher, R., Petters, R., Johnson, B., Bavister, B., Archibong, A. 1989. Development of porcine embryos from the one-cell stage to blastocyst in mouse oviducts maintained in organ culture. *J Exp Zool.* 249: 235–239.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Galli, C. 2006. Birth of cloned pigs from zona-free nuclear transfer blastocysts developed in vitro before transfer. *Cloning Stem Cells* 8 (4): 283–293.
- Lee, H., Lee, Y., Yin, X., Kong, I. 2005. Effect of meiotic maturation of canine oocytes cultured in reproductive tract. *Korean J Emb Trans.* 20 (1): 63–69.
- Leese, H. 1983. Studies on the movement of glucose, pyruvate and lactate into the ampulla and isthmus of the rabbit oviduct. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 68: 89–96.
- Leese, H. & Gray, S. 1985. Vascular perfusion:

## COMMUNICATION

- a novel means of studying oviduct function. *Am J Physiol.* 248: 624–632.
- Leese, H., Hugentobler, S., Gray, S., Morris, D., Sturme, R., Whitear, S., Sreenan, J. 2008. Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fert Dev.* 20: 1–8.
  - Li, Z., Sun, X., Chen, J., Leno, G., Engelhardt, J. 2006. « Factors affecting the efficiency of embryo transfer in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*) » *Theriogenology* 66 (2): 183–190.
  - Li, R., Whitworth, K., Lai, L., Wax, D., Spate, L. 2007. Concentration and composition of free aminoacids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluids and their effects on development of porcine IVF embryos. *Mol Reprod Dev.* 74: 1228–1235.
  - Luvoni, G., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D. 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod Dom Anim.* 38: 410–414.
  - Luvoni, G., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D. 2005. Factors involved in vivo and in vitro of maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63 (1): 41–59.
  - Marseloo, N. 2005. *Microenvironnement oocytaire au cours de la maturation terminale chez la chienne : analyse du liquide folliculaire et des caractéristiques fonctionnelles du follicule.* Master de Biologie Cellulaire, Physiologie et Pathologie, Paris, Université Denis Diderot Paris VII, 18 p.
  - Martus, N., Verhage, H., Mavrogiannis, P. & Thibodeaux, J. (1998). « Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. » *J Reprod Fertil.* 113: 323–329.
  - Ménezo, Y. & Guérin, P. 1997. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 73: 99–104.
  - Metcalfe, S. 1999. *Assisted reproduction in the bitch.* Master of Science. Institute of Reproduction and Development & Faculty of Science. Victoria, Monash University.
  - Murray, M. 1995. Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biol Reprod.* 53: 653–663.
  - Nancarrow, C., Hill, J., Connell, O. 1992. Aminoacid secretion by the ovine oviduct. In *Proceedings of Australian Society of Reproductive Biology*, Adelaide.
  - Nichols, R., Hunter, R., Gardner, D., Partridge, R., Leese, H., Cooke, G. 1998. Concentrations of energy substrates in oviduct fluid in unilaterally ovariectomized pigs. *Research in Veterinary Science* 65: 263–264.
  - Oehninger, S., Coddington, C., Hodgen, G., Seppala, M. 1995. Factors affecting fertilization: endometrial protein14 (PP14) reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril.* 63: 377–383.
  - Oliphant, G., Cabot, C., Ross, P., Marta, J. 1984. Control of the humoral immune system within the rabbit oviduct. *Biol Reprod.* 31: 205–212.
  - Pavaux, C. 1987. *Splanchnologie des animaux domestiques : Fascicule II, Appareil urogénital.* Toulouse, École Vétérinaire de Toulouse.
  - Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Thoumire, S., Chebrou, M., De Lesegno, C., Chastant-Maillard, S. 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 130 (2): 193–201.
  - Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Viaris de Lesegno, C., Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S. 2006. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. *Theriogenology* 66: 1685–1693.
  - Rizo, D., Lonergan, P., Boland, M., Arroyo-Garcia, R., Pintado, B., De la Fuente, J., Gutierrez-Adan, A. 2002. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod.* 66: 589–595.
  - Rizo, D., Gutierrez-Adan, A., Perez-Garnalo, S., De la Fuente, J., Boland, M., Lonergan, P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 68: 236–243.
  - Rizo, D., Pintado, B., De la Fuente, J., Lonergan, P., Gutierrez-Adan, A. 2007. Development and pattern of mRNA relative abundance of bovine embryos cultured in the isolated mouse oviduct in organ culture. *Mol Reprod Dev.* 74: 716–723.
  - Steinhauer, N., Boos, A., Gunzel-Apel, A. 2004. Morphological changes and proliferative activity in the oviductal epithelium during hormonally defined stages of the oestrous cycle in the bitch. *Reprod Dom Anim.* 39: 110–119.
  - Tervit, H., Tervit, H.R., Whittingham, D.G., Rowson, L.E. 1972. “Successful culture in vitro of sheep and cattle ova.” *J. Reprod. Fertil.* 30: 493–497.
  - Thibodeaux, J., Ménezo, Y., Roussel, J., Hansel, W., Goodeaux, L., Thompson, D., Godke, R. 1992. Coculture of in vitro fertilized bovine embryos with oviductal epithelial cells originating from different stages of the estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 75: 1448–1455.
  - Tsutsui, T., Hori, T., Yamada, A., Kirihara, N., Kawakami, E. 2003. Intratubal insemination with fresh semen in dogs. *J Vet Med Sci.* 65 (5): 659–661.
  - Tsutsui, T., Tsutsui, T., Hori, T., Endo, S., Hayama, A., Kawakami, E. 2006. “Intrauterine transfer of early canine embryos.” *Theriogenology* 66(6-7): 1703–1705.
  - Ueno, S., Kurome, M., Tomii, R., Hiruma, K., Saitoh, H., Nagashima, H. 2007. Association between embryonic loss and damage to the zona pellucida by invasive micromanipulation during oviductal transfer of early-stage embryos in pigs. *J Reprod Dev.* 53 (5): 1113–1118.
  - Verhage, H., Abel, J., Tietz, W., Barrau, M. 1973a. Development and maintenance of the oviductal epithelium during the estrous cycle in the bitch. *Biol Reprod.* 9: 460–474.
  - Verhage, H., Abel, J., Tietz, W., Barrau, M. 1973b. Estrogen-induced differentiation of the oviductal epithelium in prepubertal dogs. *Biol Reprod.* 9: 475–488.
  - Vieira, E., Chapman, D., Killian, G. 1999. Evidence for multiple forms of estrus-associated protein in bovine oviductal fluid associated with oviduct region and stage of the estrous cycle. *Biol Reprod.* 60 (Suppl): 202.
  - Walker, S., Hill, J., Kleemann, D., Nancarrow, C. 1996. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing aminoacids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod.* 55: 703–708.
  - Wetscher, F., Havlicek, V., Huber, T., Muller, M., Brem, G., Besenfelder, U. 2005. Effects of morphological properties of transferred embryonic stages on tubal migration, implication for in vivo culture in the bovine oviduct. *Theriogenology* 64 (1): 41–48.
  - Wijayagunawardane, M., Miyamoto, A., Cerbito, W., Acosta, T., Takagi, M., Sato, K. 1998. « Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. » *Theriogenology* 49: 607–618.
  - Yeung, W., Lee, K., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Ho, P., Chiu, P. 2007. « Glycodelin: a molecule with multi-functions on spermatozoa. » *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 63: 143-151.