

MONICA ROY

**ÉTUDE DES SUPEROXYDE DISMUTASES (SOD)
DANS L'OVIDUCTE BOVIN**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

Résumé

L'oviducte est important dans le transport, la maturation et la fécondation des gamètes mâles et femelles. Il est connu qu'un équilibre entre les antioxydants et les dérivés actifs de l'oxygène (ROS) est essentiel à la réalisation de ces processus reproducteurs. Cependant, peu de connaissances sont acquises sur les antioxydants présents dans l'oviducte. Les superoxyde dismutases, soit la forme cytosolique (Cu,ZnSOD), la forme mitochondriale (MnSOD) et la forme extracellulaire (EC-SOD) sont des antioxydants enzymatiques qui neutralisent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), un ROS. Mon hypothèse est que les SOD sont régulées de façon précise dans l'oviducte ainsi que durant le cycle oestral bovin pour assurer le succès reproducteur. L'immunobuvardage et l'immunohistochimie ont servi à caractériser les formes protéiques de la MnSOD et de la Cu,ZnSOD. Nos résultats montrent que ces deux formes de SOD ont des patrons d'expression qui varient de façon spatio-temporelle dans l'oviducte bovin. Cela suggère que la forme cytosolique (Cu,ZnSOD) et mitochondriale (MnSOD) de la superoxyde dismutase jouent des rôles essentiels dans l'oviducte et fort probablement dans le processus de la maturation finale des gamètes mâles ainsi que dans la fécondation.

Abstract

The oviduct is the natural site of transport, storage, maturation and fertilization of gametes. Moreover, it has been determined that these reproductive processes are influenced by the balance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidants. However, there is a lack of knowledge about the antioxidants present in the bovine oviduct. Among these antioxidants there are the cytosolic (Cu,ZnSOD), mitochondrial (MnSOD) and extracellular (EC-SOD) superoxide dismutases that neutralize superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), a ROS. The hypothesis is that SODs are regulated in a precise manner in the bovine oviduct. We analyzed and localized SODs protein by western and immunohistochemistry analysis. We found that Cu,ZnSOD and MnSOD are differently expressed in the bovine oviduct during the estrous cycle. These results suggest that cytosolic (Cu,ZnSOD) and mitochondrial (MnSOD) superoxide dismutases are essential in the oviduct functions especially in the final sperm maturation process and fertilization.

Avant-propos

Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai écrit un article intitulé: *Superoxide dismutases (SODs) expression in the bovine oviduct during the estrous cycle*. Cet article, qui se retrouve au chapitre 2, a été accepté avec quelques corrections dans la revue *Theriogenology* (la lettre d'acceptation se retrouve à l'annexe II). Je suis première auteure de cet article, car j'ai réalisé la majorité des travaux qui y sont présentés (90%). De plus, j'ai grandement participé à sa rédaction. Le deuxième auteur de cet article est mon collègue Danny Gauvreau. Il a participé à la récolte des oviductes pour le travail. Le dernier auteur, Dr Jean-François Bilodeau, est mon directeur de recherche. Il a donc supervisé la réalisation de ces travaux. Bien que cet article constitue la majorité des résultats que j'ai obtenus pour mon projet de maîtrise, j'ai également travaillé sur une partie non publiée laquelle se retrouve à l'annexe I.

En plus de l'article pour lequel je suis première auteure, j'ai participé, en tant que deuxième auteure, à la réalisation d'un autre article publié en décembre 2006 dans la revue *Endocrinology: Hormonal and Spatial Regulation of Nitric Oxide Synthases (NOS) (Neuronal NOS, Inducible NOS, and Endothelial NOS) in the Oviducts*. Les auteurs de cet article sont dans l'ordre : Jérôme Lapointe, Monica Roy, Isabelle St-Pierre, Sarah Kimmins, Danny Gauvreau, Leslie A. MacLaren et Jean-François Bilodeau. Cet article a été publié dans le cadre du projet de doctorat du premier auteur : Jérôme Lapointe. Bien que cet article ne soit pas issu de mon projet de maîtrise, ma contribution est en relation directe avec ce dernier. En effet, le sujet de cet article, les oxyde nitrique synthases (NOS), produit un dérivé actif de l'oxygène (ROS), l'oxyde nitrique (NO). Ce ROS peut réagir avec le ROS neutralisé par les superoxyde dismutases (SOD), c'est-à-dire l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cette réaction forme alors le peroxyde nitrite ($ONOO^{\cdot-}$), un ROS très dangereux. Il est donc intéressant d'analyser si le patron d'expression des NOS concorde avec celui des SOD. Les résultats que j'ai produits, lesquels constituent l'analyse de la forme protéine des NOS à l'aide de l'immunobuvardage et de l'immunohistochimie, sont présentés aux figures 3, 4 (résultat de eNOS) et 7 de l'article (Annexe III).

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Jean-François Bilodeau. Il a toujours été présent pour répondre à mes nombreuses interrogations. Une qualité que j'ai appréciée chez le Dr Bilodeau, c'est que tout en me guidant dans la réalisation de mes travaux, il m'a laissé l'opportunité d'apporter mes idées aussi farfelues qu'elles pouvaient l'être parfois. Je lui suis aussi reconnaissante de m'avoir donné la chance d'assister et de présenter mes travaux à de nombreux congrès de tous les niveaux, voir même d'envergure internationale.

De plus, je suis reconnaissante du soutien financier que j'ai reçu du FQRNT durant ma maîtrise.

J'aimerais aussi dire un gros merci à tous les gens qui ont fait parti de mon équipe de laboratoire, à Jérôme pour m'avoir initié aux techniques de laboratoire, à Linda, Marianne, Isabelle et Danny pour leur aide, leur support et surtout leur amitié.

Je tiens aussi à remercier mes parents et amis (es) qui ont toujours été là pour moi. J'aimerais les remercier de leur patience et d'avoir accepté à de nombreuses reprises de reporter nos soupers de filles, nos fins de semaines de sorties et toutes autres activités prévues et cela dû mon horaire parfois très chargé. Merci à tous!

Finalement, un énorme merci à mon fiancé, mon complice, Christian. Son support, sa patience, ses encouragements, son écoute et ses conseils ont été des piliers dans la réussite de ma maîtrise. Merci d'être toujours là pour moi!

*À Christian pour avoir toujours été à mes
côtés.*

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Avant-propos	iv
Remerciements.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Système reproducteur bovin	1
1.1.1 Description du système reproducteur de la vache	1
1.1.2 Le cycle oestral bovin.....	3
1.2 L'oviducte.....	5
1.2.1 L'anatomie.....	5
1.2.2 Histologie de l'oviducte.....	6
1.2.3 Caractéristiques physiologiques de l'oviducte bovin	8
1.2.3.1 Le pH de l'oviducte	8
1.2.3.2 Contraction et relaxation de l'oviducte.....	8
1.2.3.3 Circulation sanguine de l'oviducte	9
1.2.3.4 Concentration en oxygène de l'oviducte	10
1.2.3.5 Le fluide et sécrétions de l'oviducte	10
1.2.3.6 Oviductes ipsilatéraux et contralatéraux.....	11
1.2.3.7 Maladies associées à l'oviducte.....	11
1.2.4 Rôles de l'oviducte	12
1.2.4.1 Capture de l'ovocyte.....	12
1.2.4.2 Acheminement de l'ovocyte	13
1.2.4.3 Réservoir de spermatozoïdes	13
1.2.4.4 La fécondation	14
1.2.4.5 Amorce du développement embryonnaire.....	15
1.2.4.6 Une protéine aux multiples fonctions, l'oviductine.....	15
1.2.5 Les hormones dans l'oviducte bovin	16
1.2.5.1 Hormones détectées et leurs variations cycliques.....	16
1.2.5.2 Gènes régulés par les hormones.....	17
1.3 Les dérivés actifs de l'oxygène (ROS)	17
1.3.1 Définition, formation et exemples de ROS.....	17
1.3.2 Cibles des ROS	18
1.3.2.1 Les protéines	19
1.3.2.2 Les lipides	20
1.3.2.3 L'ADN	20
1.3.2.4 Autres impacts des ROS	20
1.4 Les antioxydants	21
1.4.1 Les antioxydants non-enzymatiques.....	21
1.4.2 Les antioxydants enzymatiques	22
1.4.3 Les antioxydants et les maladies.....	23

1.5 Les superoxyde dismutases (SOD).....	24
1.5.1 Généralités	25
1.5.2 Cu,ZnSOD	25
1.5.3 MnSOD.....	28
1.5.4 EC-SOD	29
1.6 Les antioxydants dans l'oviducte.....	31
1.7 Rôles physiologiques des ROS en reproduction.....	31
1.7.1 Maturation de l'ovocyte.....	32
1.7.2 Le corps jaune	33
1.7.3 L'ovulation.....	33
1.7.4 Les spermatozoïdes.....	34
1.7.5 La fécondation	35
1.7.6 L'embryon	36
1.7.7 Autres effets des ROS.....	37
1.8 Problématique, hypothèse et objectifs	37
Chapitre 2 : L'expression des superoxyde dismutases (SOD) dans l'oviducte bovin durant le cycle oestral	39
2.1 Résumé.....	41
2.2 Abstract.....	42
2.3 Introduction.....	43
2.4 Materials and methods	45
2.5 Results.....	48
2.6 Discussion.....	51
2.7 Acknowledgements.....	54
2.8 References.....	55
2.9 Figure legends.....	59
Chapitre 3 : Conclusion générale.....	66
Bibliographie	72
Annexe I : Résultats préliminaires de l'étude sur la superoxyde dismutase extracellulaire (EC-SOD) dans l'oviducte bovin.....	81
I.1 Immunobuvardage.....	81
I.2 PCR quantitatif en temps réel.....	82
Annexe II : Lettre d'acceptation de la revue Theriogenology pour l'article : Superoxide dismutases (SODs) expression in the bovine oviduct during the estrous cycle.....	83
Annexe III : Régulation spatiale et hormonale des oxyde nitrique synthases (NOS) (NOS neuronale, NOS inductible et NOS endothéliale) dans les oviductes.....	85
III.1 Résumé.....	86
III.2 Hormonal and spatial regulation of nitric oxide synthases (NOS) (neuronal NOS, inducible NOS, and endothelial NOS) in the oviducts. <i>Endocrinology</i> 2006, 147:5600-10.....	87

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1 : Les maladies et les antioxydants	24
---	----

Annexe I

Tableau I.1 : Caractéristiques des huit paires d'amorces utilisées pour étudier l'ARNm de la EC-SOD dans l'oviducte bovin.	82
--	----

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 : L'anatomie des organes du système reproducteur de la vache.	2
Figure 2 : Variation hormonale du cycle oestral de la vache.	4
Figure 3 : Oviducte bovin disséqué.	6
Figure 4 : Histologie de l'oviducte.	7
Figure 5 : Formations et actions des principaux ROS.	19

Chapitre 2

Figure 1 : Cu,ZnSOD, MnSOD protein levels in the isthmus (I), isthmic-ampullary junction (I-A) and ampulla (A) at the postovulatory (d 0-3), luteal (d 10-16) and follicular (d 18-21) stages of the estrous cycle from the ipsilateral and the contralateral oviducts.	61
Figure 2 : Cu,ZnSOD and MnSOD protein expression in the oviduct segments at all stages of the estrous cycle.	59
Figure 3 : Specific Cu,ZnSOD protein expression analysis at all stages of the estrous cycle.	63
Figure 4 : Cu,ZnSOD and MnSOD protein expression in the ipsilateral and the contralateral oviducts at all stages of the estrous cycle.	64
Figure 5 : Immunolocalization of Cu,ZnSOD and MnSOD in the different sections of the bovine oviduct.....	65

Annexe I

Figure I.1 : Expression de la forme protéique de la EC-SOD dans l'oviducte et l'utérus bovin.	81
---	----

Liste des abréviations

A: Ampulla, ampoule

CAT : Catalase

CSH : Cystéamine

Cu,ZnSOD: Superoxyde dismutase cytosolique

EC-SOD : Superoxyde dismutase extracellulaire

eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale

ET-1 : Endothéline-1

FIV : Fécondation *in vitro*

FSH : Hormone folliculo-stimulante

GPx : Glutathion peroxydase

GPx-1 : Glutathion peroxydase classique

GPx-2 : Glutathion peroxydase gastro-intestinale

GPx-3 : Glutathion peroxydase plasmatique

GPx-4 : Phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase

GPx-5 : Glutathion peroxydase de l'épididyme

GSH : Glutathion

GST : Glutathion-S-transférase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HO₂[·] : Radical perhydroxyle

I : Isthmus, isthme

I-A: Jonction isthme-ampoule

iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible

LH: Hormone lutéinisante

MnSOD : Superoxyde dismutase mitochondriale

NO: Oxyde nitrique

NOS : Oxyde nitrique synthase

¹O₂ : Oxygène singulet

O₂^{·-} : Anion superoxyde

OCT : Optimum cutting temperature medium

OH[·] : Radical hydroxyle

ONOO⁻ : Peroxynitrite

RO \cdot : Radical alkoxy
ROO \cdot : Radical peroxy
ROOH: Lipides hydroperoxides
ROS : Dérivés actifs de l'oxygène
SH : Groupements sulfhydriles
SLA : Sclérose latérale amyotrophique
SOD : Superoxyde dismutase

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Système reproducteur bovin

La reproduction est un processus essentiel au cycle de la vie. Chez le bovin, comme chez les autres mammifères, la reproduction comprend un ensemble de mécanismes très complexes regroupant de nombreuses étapes telles la production et la maturation des gamètes mâles et femelles, l'accouplement, la fécondation, le développement de l'embryon et la parturition. La diversité de ces étapes implique des organes spécifiques comme l'ovaire, l'oviducte et l'utérus, lesquels sont tous aussi importants les uns que les autres. Les fonctions spécifiques de chacun de ces organes sont assez semblables d'une espèce à l'autre. Par contre, au niveau anatomique, le système reproducteur révèle des différences entre les espèces, autant chez le mâle que chez la femelle. Alors, bien connaître les caractéristiques anatomiques et physiologiques particulières d'une espèce ciblée pour une étude est de la plus grande importance. Étant donné que la vache est le sujet de la présente recherche, la description suivante portera sur le système reproducteur de celle-ci.

1.1.1 Description du système reproducteur de la vache

Le système reproducteur femelle de l'espèce bovine est composé de plusieurs organes, lesquels peuvent être divisés en deux catégories, soit les organes sexuels primaires et secondaires [1]. La première classe est composée d'un seul élément : les ovaires. Au nombre de deux, ces glandes sont situées dans la cavité abdominale de la vache et elles occupent deux fonctions fondamentales. En effet, en plus d'être l'organe responsable de la formation de l'ovule, l'ovaire sécrète deux hormones importantes : la progestérone et l'oestrogène [1].

La deuxième catégorie d'organes est composée d'un plus grand nombre d'éléments. Tout d'abord, accolé à l'orifice externe du tractus reproducteur femelle nommé la vulve, on retrouve le vagin [1]. Contrairement au rat et à la truie où l'utérus est le réceptacle du sperme lors de l'éjaculation, chez la vache, c'est plutôt le vagin qui recevra le sperme suite à l'accouplement [2]. À la suite du vagin, on retrouve le col de l'utérus. Ce dernier permet d'une part l'entrée des spermatozoïdes après l'accouplement et d'une autre part la sortie du fœtus lors de la parturition [1]. En continuité avec le col de l'utérus, il y a l'utérus. Chez la vache, ce sont les cornes utérines qui hébergent l'embryon lors de la gestation [1]. Entre les deux cornes utérines et les ovaires, il y a les oviductes. Également au nombre de deux, les oviductes sont le site naturel de la fécondation. De plus, d'autres événements tels que le développement embryonnaire précoce de l'embryon, c'est-à-dire celui se déroulant durant les 72 à 96 heures après la fécondation, se produit dans l'oviducte [1]. L'anatomie du tractus reproducteur de la vache est représentée à la figure 1.

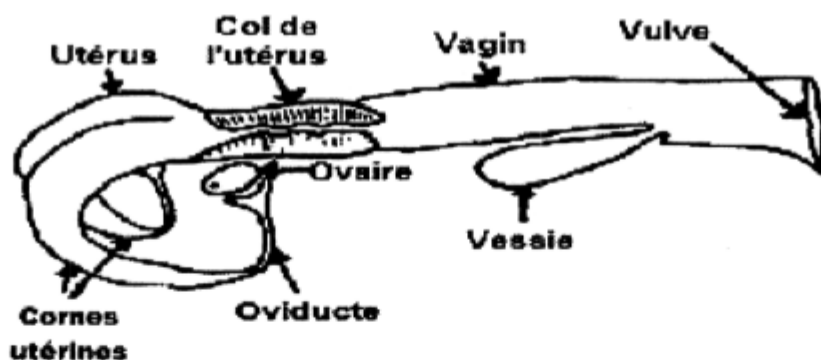


Figure 1 : L'anatomie des organes du système reproducteur de la vache. La vulve est l'ouverture externe. Par la suite, il y a le vagin, le col de l'utérus, le corps de l'utérus, les cornes utérines, les oviductes et les ovaires. Figure adaptée de [1].

1.1.2 Le cycle oestral bovin

La durée du cycle oestral varie selon les espèces. Chez le bovin, il est d'une durée moyenne de 21 jours. Le cycle débute par l'oestrus, c'est-à-dire la période où la femelle accepte le mâle, c'est ce qu'on appelle les chaleurs. C'est durant cette période que l'hypophyse sécrète beaucoup de FSH (hormone folliculo-stimulante) [1, 3]. À ce stade, il y a aussi une forte sécrétion d'estradiol par le follicule dominant. Cette augmentation d'estradiol amène une forte sécrétion de LH (hormone lutéinisante) par l'adéno-hypophyse. Cette hormone cause la rupture du follicule. Il y a alors ovulation. Après l'ovulation, il y a développement du corps jaune, lequel amorce la sécrétion de progestérone. La progestérone a pour action d'empêcher la sécrétion de LH et de FSH. De plus, cette hormone a un effet important sur l'utérus puisqu'il le prédispose à la gestation. Le corps jaune complète son développement aux jours 8 à 10. La quantité de progestérone sécrétée reste élevée jusqu'aux jours 16 à 18. À ce moment du cycle oestral, s'il n'y a pas eu fécondation, le corps jaune régresse [3]. Cette dégénérescence du corps jaune cause une diminution de la sécrétion de progestérone, laquelle ne peut plus réprimer la sécrétion de FSH. L'augmentation de FSH cause alors la croissance d'un autre follicule, lequel sécrète de plus en plus d'estradiol au fur et à mesure de son développement. Ainsi, le cycle recommence lorsque l'estradiol revient en quantité importante [1, 3]. Il y a, durant le cycle, plusieurs vagues folliculaires. Ces vagues sont caractérisées par des follicules qui se développent, mais qui régressent pour laisser qu'un seul follicule mature. Le nombre de vagues folliculaires durant le cycle oestral, chez la vache, peut être de deux ou de trois [4, 5]. De plus, si l'on se réfère à la figure 2, laquelle illustre les variations hormonales durant le cycle oestral de la vache, on peut voir que de légères augmentations d'estradiol, hormone sécrétée par le follicule [3], sont observables et attribuables à ces vagues. Également, à l'aide de cette figure, on peut remarquer que, selon les fluctuations hormonales, trois périodes peuvent être distinguées durant le cycle oestral bovin : la phase post-ovulatoire (jours 0-3), la phase lutéale (jours 10-16) et la phase folliculaire (jours 18-21).

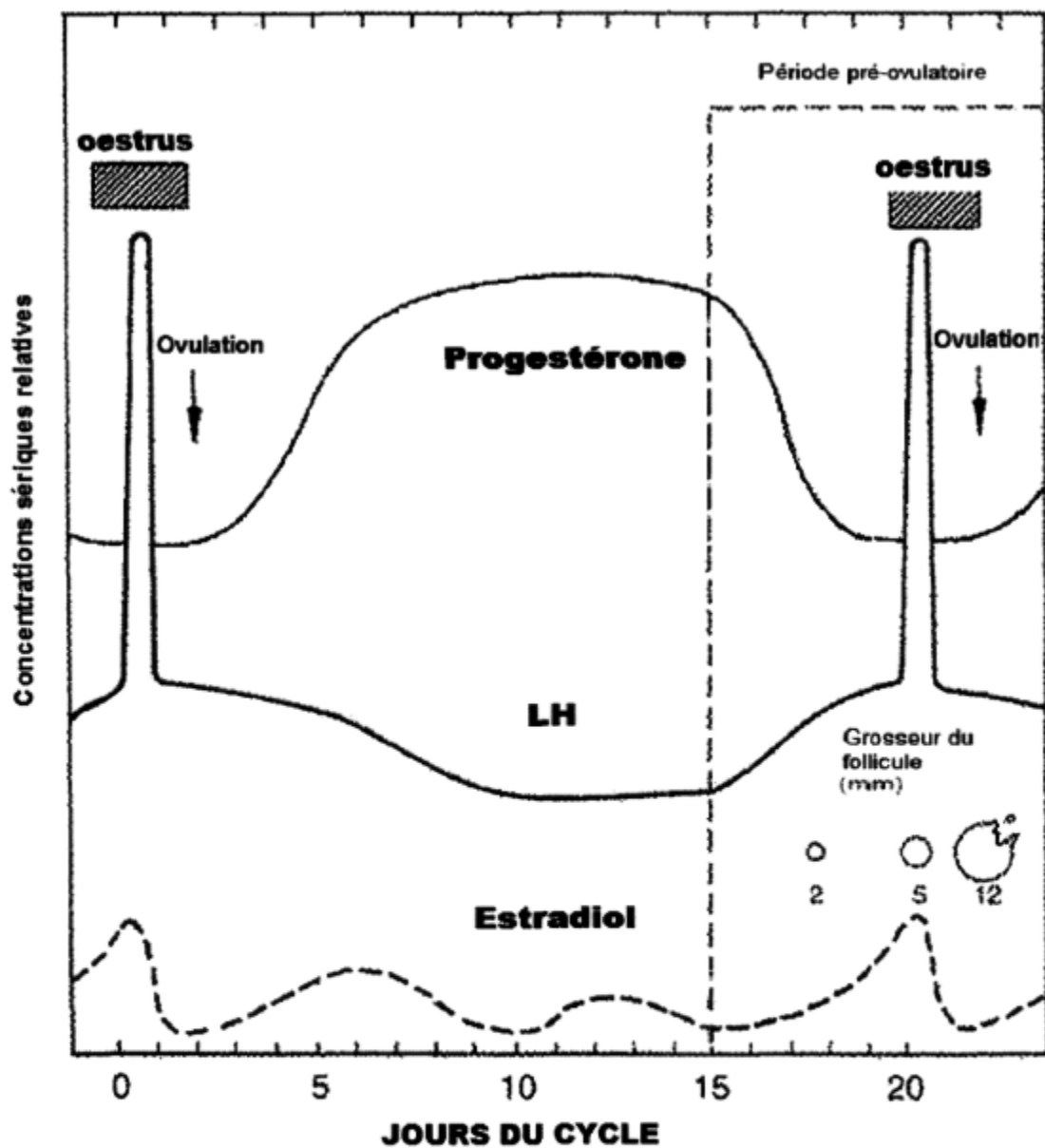


Figure 2 : Variation hormonale du cycle oestral de la vache. L'estradiol, la LH, la FSH et la progestérone sont les principales hormones impliquées dans le cycle oestral bovin. Tout au long du cycle, ces hormone démontrent des variations qui leurs sont spécifiques. Figure adaptée de [6].

1.2 L'oviducte

1.2.1 L'anatomie

Tel que mentionné précédemment, l'oviducte est un organe de grande importance puisqu'il s'agit, entre autre, du site naturel de la fécondation. Chez le bovin, l'oviducte est d'une longueur de 21 à 28 cm [7]. Cet organe peut-être divisé en différentes sections. Tout d'abord, la section qui captera l'ovocyte à sa sortie de l'ovaire se nomme l'infundibulum. Ensuite, il y a la section de l'ampoule. Accolée à la section de l'ampoule, il y a la jonction isthme-ampoule. C'est dans cette section que se produit la fécondation, d'où l'affirmation que l'oviducte est le site naturel de la fécondation. Par la suite, il y a l'isthme, c'est la section de l'oviducte qui est accolée aux cornes utérines via la jonction utéro-tubaire [7]. Les différentes sections de l'oviducte sont illustrées la figure 3. Comme l'oviducte est situé entre les ovaires et les cornes utérines, il y a le même nombre d'oviductes que de cornes utérines et d'ovaires, c'est-à-dire deux. Ceux-ci portent un nom différent selon s'ils se situent du côté de l'ovulation : oviducte ipsilatéral, ou de l'autre côté : oviducte contralatéral. L'organe en entier ainsi que chacune des sections de l'oviducte ont des caractéristiques et des rôles spécifiques outre qu'être uniquement le site naturel de la fécondation. Puisque la présente analyse porte sur les sections de l'isthme, de la jonction isthme-ampoule et de l'ampoule, nous verrons spécifiquement les rôles physiologiques de ces parties de l'oviducte dans la prochaine section. De plus, étant donné que l'espèce à l'étude est le bovin, la description de l'oviducte portera principalement sur cette espèce. En effet, les caractéristiques de l'oviducte des autres espèces animales seront abordées uniquement dans le cas où les données sur l'oviducte de la vache ne sont pas encore connues.

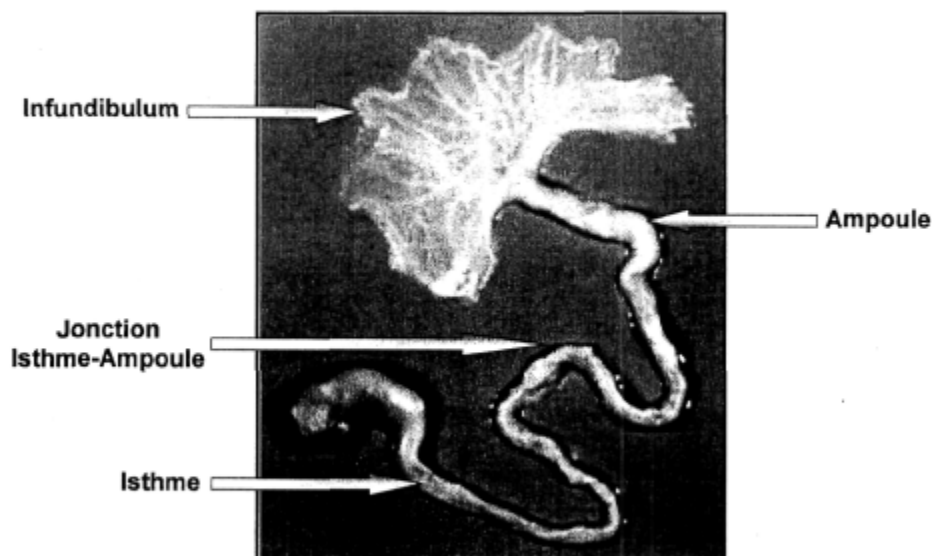


Figure 3 : Oviducte bovin disséqué. L'oviducte est composé de différentes sections, soit l'infundibulum, l'ampoule, la jonction isthme-ampoule et l'isthme. Photo adaptée de [8].

1.2.2 Histologie de l'oviducte

L'oviducte bovin est composé de différents types de tissus. Tout d'abord, la couche tissulaire extérieure se nomme la séreuse externe. Il y a ensuite un tissu musculaire lisse. Ce dernier est composé de deux types de muscles, soit un circulaire et un longitudinal. Ensuite, on retrouve la *lamina propria*, c'est-à-dire une couche de tissu conjonctif. Finalement, il y a la muqueuse, laquelle est constituée de l'épithélium. Cet épithélium est composé de deux types de cellules : les cellules sécrétoires et les cellules ciliées [7]. Ces tissus sont présents dans toutes les différentes sections de l'oviducte et sont représentés sur la figure 4. Cependant, leurs proportions relatives varient d'une section à l'autre.

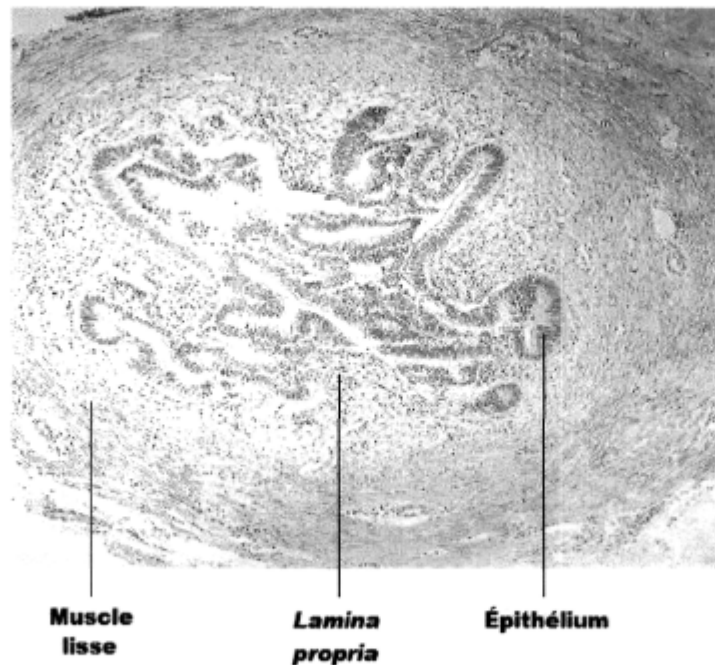


Figure 4 : Histologie de l'oviducte. Les trois principaux types de tissus de l'oviducte sont le muscle lisse, la *lamina propria* et l'épithélium. La section représentée est l'isthme, mais les trois sections ont la même composition tissulaire.

Au niveau des repliements longitudinaux de la muqueuse, leur quantité et leur ampleur augmentent lorsqu'on observe l'oviducte de l'isthme vers l'ampoule [9]. En ce qui concerne les cellules ciliées, il n'y a pas vraiment de différence quand au nombre de ces cellules entre les trois sections de l'oviducte. Par contre, l'activité de ces cellules semble plus importante dans la section de l'isthme que dans l'ampoule [7]. Concernant le tissu musculaire, il y a aussi des variations selon les sections de l'oviducte. En effet, l'isthme est la section de l'oviducte ayant le plus de muscle, tandis que l'ampoule est le segment qui en a le moins. Toutes ces variations entre les sections ont pour conséquences que l'isthme est une section plutôt épaisse avec une petite lumière, tandis que l'ampoule est plutôt mince avec une grande lumière. Pour sa part, la jonction isthme-ampoule est plutôt une section intermédiaire [7].

Des variations au niveau des tissus de l'oviducte ne sont pas seulement observables entre les sections de l'oviducte, mais aussi durant le cycle oestral. En effet, c'est à l'oestrus que les cellules sécrétrices sont les plus grosses [7]. Il se produit donc un changement au niveau de l'épithélium durant le cycle oestral. En ce qui concerne les cellules ciliées de l'isthme et de l'ampoule, contrairement à d'autres espèces animales, il ne semble pas y avoir d'effet de cycle sur leur nombre. Néanmoins, ces prolongements vibratiles sont plus tendus au moment de l'oestrus [7].

1.2.3 Caractéristiques physiologiques de l'oviducte bovin

1.2.3.1 Le pH de l'oviducte

Outre l'histologie de l'oviducte, de nombreuses autres caractéristiques de l'oviducte sont connues. Parmi celles-ci, il y a le pH. Bien que l'utérus et l'oviducte soient intimement liés via leur circulation artérielle [7], le pH de l'oviducte à une valeur plus élevée que celui de l'utérus. En effet, l'utérus à un pH de 6,96 alors que l'oviducte à un pH de 7,60. Le pH de l'oviducte n'est pas uniquement plus élevé que celui de l'utérus. En effet, le pH du sang, d'une valeur de 7,41, est plus faible que celui de l'oviducte. Il est également intéressant de noter qu'il n'y a pas de variation du pH de l'oviducte durant le cycle oestral [10].

1.2.3.2 Contraction et relaxation de l'oviducte

Lorsqu'il s'agit de contraction et de relaxation, on se réfère souvent au système musculaire et au système nerveux. En effet, ce dernier est impliqué dans la coordination des activités de l'ensemble des muscles. Les terminaisons nerveuses, de type adrénérique, de l'isthme innervent le muscle circulaire lisse de cette section. Le neuromédiateur le plus libéré à ce niveau est la noradrénaline. Normalement, la noradrénaline provoque, dans

l'isthme, une contraction durant la période entourant l'ovulation. Le bovin fait alors exception à cette règle puisque la réponse de l'isthme à la noradrénaline est une relaxation. L'hypothèse associée à la relaxation post-oestrus causée par la noradrénaline serait reliée à la possibilité que l'embryon puisse sortir de l'oviducte pour aller s'implanter dans les cornes utérines [7]. En plus de l'innervation des muscles circulaires lisses, il a été démontré, chez le lapin, qu'il y avait quelques terminaisons nerveuses dans le muscle longitudinal et dans la muqueuse. Le niveau d'innervation dans ces tissus de l'isthme est similaire à celui retrouvé dans l'ampoule. De plus, dans l'ampoule, les régions les plus innervées sont sous la séreuse et autour des vaisseaux sanguins. Quant à la jonction isthme-ampoule, elle est aussi bien innervée et, comme dans l'isthme, c'est dans le muscle circulaire lisse qu'elle est le plus innervée [11].

En ce qui concerne les contractions musculaires proprement dites, c'est lorsque l'oestrus approche que les contractions augmentent dans l'isthme. De plus, il s'avère qu'à cette période du cycle du oestral, c'est dans l'oviducte ipsilatéral (côté de l'ovulation) qu'il y a le plus de contractions [7].

1.2.3.3 Circulation sanguine de l'oviducte

L'oviducte est situé entre deux autres organes importants en reproduction, soit l'utérus et les ovaires. C'est d'ailleurs de ces organes qu'origine son système vasculaire artériel [7]. En ce qui concerne le système veineux, il semblerait être uniquement relié à celui de l'ovaire. En effet, chez le porc un lien existe entre la circulation veineuse de l'ovaire et celle de l'isthme de l'oviducte [7]. Durant le cycle oestral, un plus grand débit sanguin est observé lors de l'oestrus [7].

1.2.3.4 Concentration en oxygène de l'oviducte

La concentration en oxygène n'a pas été étudiée précisément chez le bovin, mais de façon générale, on considère qu'elle est de trois à quatre fois plus faible que celle de l'atmosphère [12]. L'effet de l'ovulation sur la concentration d'oxygène est encore sujet à discussion. En effet, une étude a démontré que, chez le singe, la concentration d'oxygène au moment et à la suite de l'ovulation est augmentée. Bien que cette augmentation est potentiellement induite par l'insertion de la sonde servant à faire les mesures, cela se produit uniquement du côté de l'ovulation [13]. Par contre, une autre étude plus récente a démontré que, chez le singe, le hamster et le lapin, il n'y aurait pas de différence de pO_2 entre les oviductes ipsilatéraux et contralatéraux [14].

1.2.3.5 Le fluide et sécrétions de l'oviducte

Le fluide présent dans l'oviducte est formé, en partie, des sécrétions libérées par les cellules de la muqueuse ainsi que par le sang qui traverse les membranes de l'oviducte. De plus, l'utérus, le follicule dominant ainsi que la cavité péritonéale peuvent contribuer à la création du fluide de l'oviducte [15]. Le fluide est principalement constitué de protéines [16]. En plus des protéines, on retrouve d'autres éléments tels que du cholestérol, des phospholipides, des lipoprotéines, des vitamines, des facteurs de croissances, des électrolytes et de petites quantités de glucose [7, 17-19]. Il est également intéressant de noter qu'il existe une glycoprotéine spécifique à l'oviducte, l'oviductine [16]. Le fluide de l'oviducte montre des variations selon les sections et côtés de l'oviducte et également en fonction du cycle oestral. En effet, tout au long du cycle oestral de la vache, la quantité de fluide dans l'isthme est toujours inférieure à celle présente dans l'ampoule. De plus, c'est durant l'oestrus que la quantité de fluide est la plus importante et ce, autant dans l'isthme que dans l'ampoule [20]. Par ailleurs, durant cette période du cycle, il y a également plus de fluide dans l'oviducte situé du même côté que l'ovulation [7].

1.2.3.6 Oviductes ipsilatéraux et contralatéraux

Tel que mentionné précédemment, il y a un oviducte du côté de l'ovulation (oviducte ipsilatéral) et un autre du côté opposé (oviducte contralatéral). Il est intéressant de noter qu'en plus d'influencer la contraction de l'oviducte et la quantité de fluide présent dans ce dernier, la proximité de l'ovaire qui a ovulé peut influencer l'expression de différents gènes. En effet, une vaste étude sur l'expression de plusieurs gènes a démontré des variations d'expression de 35 gènes selon s'ils étaient ou non à proximité du corps jaune. Dans cette étude, la plupart des gènes étaient plus exprimés du côté ipsilatéral que du côté contralatéral [21]. D'autres études effectuées dans notre laboratoire ont également montré que l'expression des gènes pouvait être régulée par la présence du corps jaune ou du follicule dominant. En effet, la forme inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) est plus fortement exprimée du côté contralatéral dans la section de l'isthme et ce, uniquement durant la phase folliculaire [22]. De plus, la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (GPx-4) est également plus exprimée du côté contralatéral durant la phase folliculaire et ce, dans l'isthme et dans la jonction isthme-ampoule. Par contre, dans ces mêmes sections, c'est du côté ipsilatéral qu'elle est plus exprimée après l'ovulation [23].

1.2.3.7 Maladies associées à l'oviducte

Différentes pathologies peuvent être détectées dans l'oviducte bovin. Chez les vaches adultes, l'incidence de troubles associés à l'oviducte est de l'ordre de 6 à 15% et, chez les génisses, elle est de 3 %. L'incidence des anomalies de l'oviducte peut être augmentée si les animaux se reproduisent de très nombreuses fois ou s'ils ont des problèmes au niveau de la fécondation [24]. L'association physique entre l'oviducte et l'ovaire fait partie des pathologies que l'on retrouve assez fréquemment. De façon moins commune, on retrouve également des malformations congénitales. La présence de kystes dans l'épithélium et l'occlusion de l'oviducte sont aussi des problèmes existants. L'inflammation de l'oviducte, plus communément appelée la salpingite, est aussi une

maladie connue chez la vache [24]. De plus, un hydrosalpinx, c'est-à-dire une accumulation de liquide dans l'oviducte, peut-être retrouvé dans l'oviducte bovin [24]. Finalement, des anomalies aux niveaux des cellules ciliées et sécrétrices de l'épithélium peuvent être causées par des agents pathogènes tels que les bactéries endotoxines [24].

1.2.4 Rôles de l'oviducte

De façon générale, l'oviducte est connu comme étant le site naturel de la fécondation. Bien que cette fonction soit d'une grande importance, il en existe d'autres accomplies par cet organe. En effet, chacune des sections de l'oviducte est impliquée dans différents processus liés à la reproduction. D'ailleurs, il a été démontré que l'incubation des gamètes dans le fluide de leur section respective, soit l'isthme pour le spermatozoïde et l'ampoule pour l'ovocyte, accroît le succès de la fécondation [16]. C'est donc les nombreux rôles joués par l'oviducte qui seront décrits dans la présente section.

1.2.4.1 Capture de l'ovocyte

Une étape essentielle à la reproduction est la capture de l'ovocyte une fois qu'il est libéré lors de la rupture du follicule de De Graaf [7]. Cette capture se fait par l'infundibulum de l'oviducte [25]. Chez la plupart des mammifères, le cumulus qui entoure l'ovocyte est très important pour cette capture. En effet, une interaction entre le cumulus de l'ovocyte et les cellules ciliées de l'infundibulum est nécessaire à la capture de l'ovocyte. Le battement des cils est également impliqué dans la réalisation de cette fonction [7, 25]. Ceci a d'ailleurs été mis en évidence dans le syndrome de Kartagener. En effet, ce problème caractérisé par des cils ne pouvant plus bouger peut causer l'infertilité chez la femme [26-28].

1.2.4.2 Acheminement de l'ovocyte

Une fois que l'ovocyte est rendu à l'intérieur de l'oviducte, il doit être transporté au site de la fécondation, c'est-à-dire dans la jonction isthme-ampoule. La durée de ce transport varie selon les différentes espèces. En effet, chez certaines espèces, ce passage peut être relativement rapide. Par exemple, chez le porc la transition se fait entre 30 à 45 minutes et chez le lapin entre 6 à 15 minutes. Par contre, chez la vache, le transport est plus long, c'est-à-dire qu'il prend de 8 à 10 heures [7]. Dans l'ampoule, le transport de l'ovule est encore principalement dû aux cellules ciliées, car les contractions musculaires de cette section de l'oviducte sont dirigées vers l'ovaire et non vers la jonction isthme-ampoule [7]. Alors, ce sont les cils de l'épithélium qui créent un mouvement dans la bonne direction, c'est-à-dire vers le lieu de la fécondation [29].

1.2.4.3 Réservoir de spermatozoïdes

Tel que mentionné précédemment, chez la vache, le vagin est le premier organe où se retrouve le sperme suite à la copulation [2]. Les spermatozoïdes ont donc un long chemin à parcourir avant de se rendre à l'oviducte. Alors, malgré qu'il y a des millions de spermatozoïdes déposés dans le tractus reproducteur femelle, il y en a que quelques milliers qui se retrouvent dans l'oviducte. La première section de l'oviducte rencontrée par les spermatozoïdes est l'isthme. C'est dans cette même section que leur parcours s'arrête jusqu'au moment de la fécondation. En effet, l'isthme est considéré, chez le bovin et chez plusieurs autres espèces animales, comme un réservoir de spermatozoïdes [30]. L'existence de ce réservoir est de la plus grande importance afin d'assurer le succès de la reproduction. En effet, il permet d'éviter qu'un trop grand nombre de spermatozoïdes se rendent au site de fécondation, ce qui diminue les probabilités de polyspermie. De plus, le réservoir permet aux spermatozoïdes de conserver leur pouvoir à féconder jusqu'au moment où aura lieu l'ovulation [30, 31] puisque, chez la vache, la période où elle accepte le mâle précède l'ovulation [3]. Aussi, les meilleurs spermatozoïdes sont choisis au niveau

du réservoir, c'est-à-dire ceux ayant un acrosome indemne et n'ayant pas été capités [31, 32]. Dans l'isthme, les spermatozoïdes ne sont pas libres dans la lumière de l'oviducte. En effet, ils sont attachés, via leur acrosome, à l'épithélium de l'isthme [30, 31]. Plus spécifiquement, ce sont surtout aux cellules ciliées qu'on les retrouve le plus souvent associés [30]. Les spermatozoïdes se lient à l'épithélium grâce à un hydrate de carbone présent sur ce dernier. Cet hydrate de carbone n'est pas le même chez toutes les espèces animales et, chez le bovin, il s'agit d'un fucose [31, 33]. Alors, l'isthme joue un rôle important en maintenant les spermatozoïdes relativement immobiles et en leur permettant de demeurer viables en attente de l'ovulation et de la fécondation. [16]. Par contre, lorsque le moment opportun est arrivé, il faut que les spermatozoïdes soient relâchés pour qu'il y ait fécondation. Cette étape serait, entre autre, due à la capacitation des spermatozoïdes qui se produit dans l'oviducte. En effet, la capacitation aurait pour effet de diminuer l'affinité du spermatozoïde pour l'épithélium de l'oviducte, car les spermatozoïdes capités ont moins d'affinité pour les hydrates de carbone impliqués dans la liaison avec l'épithélium bovin [31]. Par la suite, grâce à l'activité musculaire accentuée ainsi qu'au mouvement du fluide de l'oviducte, les spermatozoïdes vont se rendre jusqu'à la jonction isthme-ampoule pour y rencontrer l'ovocyte [7]. Un autre point intéressant est que certains produits de l'isthme tels que les glycosaminoglycanes augmentent la capacitation *in vitro* [34].

1.2.4.4 La fécondation

La section de l'oviducte nommée jonction isthme-ampoule est le lieu où se produit la fécondation [7]. Lorsque les gamètes se rencontrent, il y a liaison entre le spermatozoïde et la zone pellucide de l'ovocyte induisant la réaction d'acrosome du spermatozoïde. Cette étape est essentielle, car uniquement les spermatozoïdes ayant subi cette réaction peuvent traverser la zone pellucide et compléter la fécondation [35]. Cette étape est donc très importante et elle nécessite que le spermatozoïde soit préalablement capité [36]. Alors, le succès de la fécondation dépend des étapes préalablement effectuées dans les différentes sections de l'oviducte. De plus, un autre élément essentiel, afin d'assurer la réussite de la fécondation, est la synchronisation entre l'accouplement et l'ovulation. En effet,

l'accouplement doit avoir lieu au bon moment puisque, chez la vache, l'ovule demeure viable que 10 à 12 heures et les spermatozoïdes que 24 à 48 heures [3].

1.2.4.5 Amorce du développement embryonnaire

La dernière étape, mais non la moindre, dans laquelle est impliqué l'oviducte, c'est l'amorce du développement de l'embryon. En effet, jusqu'au stade de 8 à 16 cellules, l'oviducte sera le site du développement de l'embryon [7]. La principale section de l'oviducte impliquée dans cette fonction est la jonction isthme-ampoule puisque l'embryon y séjourne de 2,5 à 3 jours [7]. Une fois cette étape de développement complétée, le lumen de l'isthme va s'agrandir afin de laisser passer l'embryon jusqu'aux cornes utérines, où il va aller s'implanter. L'activité des cellules ciliées est alors importante afin de permettre à l'embryon de se rendre à ce lieu au moment opportun [7].

1.2.4.6 Une protéine aux multiples fonctions, l'oviductine

Tel que mentionné précédemment, l'oviducte produit une protéine qui lui est spécifique, l'oviductine. Cette dernière est sécrétée par l'épithélium [7] et elle est plus abondante durant la période entourant l'ovulation [16]. Cette protéine interagit avec les gamètes. Chez le spermatozoïde, elle se lie à la tête et à la pièce intermédiaire [37]. De plus, l'oviductine faciliterait la capacitation [38]. Par contre, l'effet qu'aurait cette protéine sur la fécondation lorsque incubée, *in vitro*, avec les spermatozoïdes, est plutôt mitigée. Certains affirment qu'elle a un impact positif [38], tandis que d'autres démontrent qu'elle n'a pas d'influence [39]. Concernant l'ovocyte, l'oviductine s'associe à sa zone pellucide [40, 41]. De plus, il a été démontré, *in vitro*, que le taux de fécondation est augmenté lorsque l'ovocyte est incubé avec l'oviductine [39]. Finalement, cette protéine est également importante pour l'embryon puisqu'elle aiderait ce dernier à se développer [16].

1.2.5 Les hormones dans l'oviducte bovin

Les hormones ont une grande importance durant le cycle oestral bovin. Bien que, dans le tractus reproducteur femelle, on associe souvent les hormones aux ovaires et à l'utérus, ce ne sont pas les seuls organes affectés par le statut hormonal. La présente section traitera du lien entre les hormones et l'oviducte bovin.

1.2.5.1 Hormones détectées et leurs variations cycliques

Bien que l'oviducte ne soit pas connu pour produire des hormones, certaines d'entre elles ainsi que des prostaglandines ont été détectées dans cet organe. Par exemple, il y a la progestérone, l'ocytocine, le 17β -estradiol et la prostaglandine E_2 [42, 43]. En plus de leur présence dans l'oviducte de la vache, il a été montré que certaines d'entre elles variaient durant le cycle oestral. La progestérone est produite par le corps jaune. Il n'est donc pas surprenant qu'elle soit plus fortement produite lorsque ce dernier est bien développé dans l'ovaire, c'est-à-dire durant la phase lutéale. De plus, c'est uniquement durant ce moment du cycle que la progestérone est plus présente du côté ipsilatéral que du côté contralatéral. Par contre, le niveau de la progestérone ne varie pas entre les différentes sections de l'oviducte [42, 43]. Il en est de même pour le 17β -estradiol et de l'ocytocine. Par contre, durant le cycle oestral, ces deux hormones ne suivent pas le même patron que celui de la progestérone. En effet, le 17β -estradiol est plus fortement présent durant la phase folliculaire. Cette observation a uniquement été trouvée du côté contralatéral (où la prochaine ovulation aura lieu). Pour sa part, l'ocytocine ne varie pas ni durant le cycle oestral ni entre les côtés de l'oviducte [43]. En plus de la présence d'hormones dans l'oviducte bovin, les récepteurs α et β de l'oestrogène ainsi que le récepteur de la progestérone ont été découvert dans l'épithélium de cet organe chez la vache [44]. Cela suggère donc que ces hormones jouent un rôle dans l'oviducte.

1.2.5.2 Gènes régulés par les hormones

Certaines études ont déjà démontré que l'estradiol pouvait réguler différents gènes dans l'oviducte bovin *in vivo* et *in vitro*. Parmi ces gènes, on retrouve une protéine spécifique de l'oviducte; l'oviductine, un antioxydant; la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (GPx-4), un pro-oxydant; la forme inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) et un vasoconstricteur; l'endothéline-1 (ET-1) [22, 23, 45].

1.3 Les dérivés actifs de l'oxygène (ROS)

L'oxygène est un élément indispensable à la survie de beaucoup d'organismes vivants puisqu'il est essentiel à la respiration cellulaire. À partir de cet oxygène, il peut y avoir formation de molécules nommées dérivés actifs de l'oxygène (ROS). Ces molécules sont formées dans les conditions normales de la vie. Elles peuvent être néfastes ou bénéfiques selon les circonstances.

1.3.1 Définition, formation et exemples de ROS

Comme leur nom l'indique, les dérivés actifs de l'oxygène (ROS) sont constitués d'au moins un atome d'oxygène. Cet atome confère la réactivité des ROS [46, 47]. Lorsque l'oxygène accepte un électron, il y a formation de l'anion superoxyde (O_2^-). Ce ROS fait parti de la catégorie des radicaux libres, car il possède un électron non apparié. Les ROS ne sont pas uniquement composés de radicaux libres. Par exemple, lorsqu'il y a acceptation d'un électron par l' O_2^- , il y a production du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un ROS qui n'est pas un radical libre [46, 48]. Il existe plusieurs ROS. Parmi ceux-ci, on retrouve l'anion superoxide (O_2^-), l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH \cdot), le peroxynitrite (ONOO \cdot), l'oxyde nitrique (NO), le radical

perhydroxyle (HO_2^\cdot), le radical alkoxy (RO^\cdot) et le radical peroxy (ROO^\cdot) [12, 46, 49, 50]. Les ROS sont produits de plusieurs façons. Parmi les sources de ROS, il y a la chaîne de transport des électrons des mitochondries, le cytochrome P-450 et les leucocytes [46, 49, 51, 52]. De plus, différentes enzymes, telles que la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases, les lipoxygénases, les oxyde nitrique synthases ainsi que celles impliquées dans la phosphorylation oxydative, peuvent être responsables de la formation de ROS [12, 46, 49, 52, 53]. Les radiations, les hautes températures, la lumière visible, la fumée de cigarette et les manipulations *in vitro* peuvent aussi produire des ROS [12, 46, 51, 53]. D'autre part, si les ROS réagissent avec des ions métalliques de transition (réaction 1) ou entre eux (réaction 2,3 et 4), ils peuvent former d'autres ROS [12, 46, 49, 51, 53].

Réaction 1 : Réaction de Fenton : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} (\text{Cu}^+) \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+} (\text{Cu}^{2+})$

Réaction 2 : Réaction d'Harber-Weiss: $\text{O}_2^\cdot + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$

Réaction 3 : Formation de H_2O_2 : $\text{O}_2^\cdot + \text{O}_2^\cdot + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

Réaction 4 : Formation de ONOO^- : $\text{O}_2^\cdot + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$

1.3.2 Cibles des ROS

Les ROS sont des molécules très réactives et certaines d'entre elles, telles que le H_2O_2 , peuvent même diffuser à travers les membranes [54]. Alors, les ROS peuvent causer de graves dommages à des composantes importantes de l'organisme. Les cibles des ROS sont principalement les protéines, les phospholipides des membranes ainsi que l'ADN [48]. La figure 5 illustre la formation de quelques-uns des principaux ROS ainsi que les dommages qu'ils sont susceptibles de créer. Dans cette figure, les ROS identifiés comme causant les dommages sont l' OH^\cdot et l' ONOO^- , car ils sont les plus réactifs [46, 51].

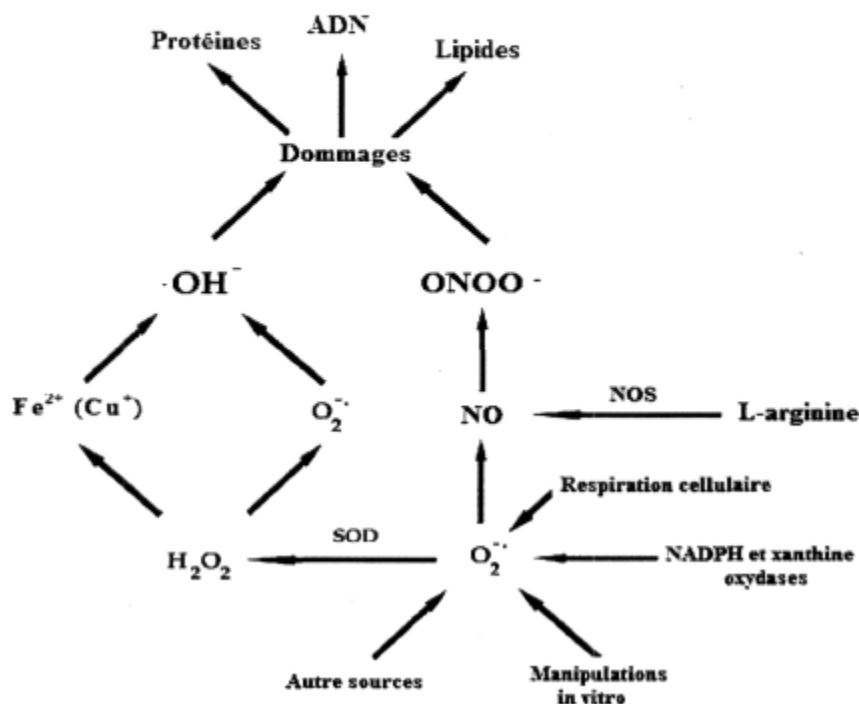


Figure 5 : Formations et actions des principaux ROS. Plusieurs sources sont à l'origine des ROS. Quant à leurs cibles, il s'agit principalement de l'ADN, des protéines et des phospholipides des membranes. Figure adaptée de [51-53].

1.3.2.1 Les protéines

Les ROS peuvent attaquer différents éléments des protéines comme leurs groupements sulfhydriles (SH) [55, 56]. Les tyrosines sont également des composantes des protéines qui peuvent être attaquées par les ROS, dont le peroxy-nitrite. Il en résulte alors la formation de la nitrotyrosine [57]. De plus, lorsqu'une protéine est attaquée par un ROS, il y a fréquemment formation de dérivés carbonyles, c'est pourquoi ces derniers sont souvent utilisés comme indicateurs de l'action des ROS sur les protéines [58]. La formation de ponts disulfures additionnels, des changements dans l'activité enzymatique et des

problèmes lors du transport membranaire sont quelques unes des dysfonctions causées par l'oxydation des protéines [12, 55, 59].

1.3.2.2 Les lipides

Les ROS peuvent également s'attaquer aux lipides et plus particulièrement aux acides gras polyinsaturés des phospholipides des membranes. Les conséquences de la peroxydation lipidique sont nombreuses. Parmi celles-ci, on retrouve une réorganisation ainsi qu'une agglomération des phospholipides, une fluidité des membranes abaissées et cela peut même entraîner la disparition des compartiments cellulaires [48].

1.3.2.3 L'ADN

Les ROS peuvent attaquer les diverses composantes de l'ADN telles que les désoxyriboses et les bases azotées. Des problèmes de transcriptions et de réplifications peuvent être générés. Cela peut alors mener à des changements dans l'expression des gènes et à des mutations. Il est aussi possible que les ROS causent des cassures simples ou doubles brins [46, 48, 60].

1.3.2.4 Autres impacts des ROS

Malgré que les ROS peuvent attaquer des composantes importantes de l'organisme et qu'ils sont en plus associés à certaines maladies comme le Parkinson et l'alzheimer, les ROS ne causent pas que des problèmes [47]. En effet, ils peuvent également avoir de nombreux avantages. Par exemple, ils sont importants dans la défense de l'organisme et dans la communication des signaux à l'intérieur de la cellule [47]. De plus, ils peuvent être

très importants en reproduction, comme nous le verrons plus tard, et dans la guérison du cancer [47, 48].

1.4 Les antioxydants

Tel que mentionné précédemment, les ROS peuvent être très néfastes pour l'organisme. Il existe donc un système de défense contre les ROS, soit les antioxydants. Alors, le rôle principal de ces derniers est de contrôler la production excédentaire de ROS et d'empêcher que ces derniers puissent causer de graves dommages. De plus, la présence d'antioxydants dans différents compartiments cellulaires assure un bon contrôle sur les ROS. En effet, certains antioxydants sont logés dans les membranes, tandis que d'autres sont plutôt retrouvés dans les mitochondries, le cytosol, les peroxysomes et le noyau. De plus, l'organisme peut combattre les ROS avec des antioxydants extracellulaires [49, 54]. Les antioxydants peuvent être classifiés en deux catégories : les antioxydants non-enzymatiques et les antioxydants enzymatiques [54]. Bien qu'on catégorise et classe les antioxydants, ces derniers peuvent également agir de façon synergique pour assurer une meilleure protection contre un large spectre de ROS.

1.4.1 Les antioxydants non-enzymatiques

Cette catégorie d'antioxydants comprend plusieurs membres. Le pyruvate, l'hypotaurine, la taurine, le glutathion (GSH), la cystéamine (CSH), la transferrine, les vitamines E (α -tocophérol), A (β -carotène) et C (acide ascorbique) constituent les principaux antioxydants non-enzymatiques [12]. Chacun des ROS peuvent être éliminés par plusieurs d'entre eux. Par exemple, l' H_2O_2 peut être neutralisé par le GSH, le pyruvate et la vitamine C [53, 59, 61]. Le O_2^\cdot peut être détruit par, entre autres, le GSH, l'acide urique et les vitamines C, E et A [49, 61]. Il existe également d'autres composés qui diminuent l'effet des ROS non pas en les neutralisant, mais plutôt en empêchant leur

formation. La transferrine est l'un de ces exemples puisqu'elle n'agit pas directement sur un ROS, mais elle empêche la formation du OH^\cdot en chélatant le fer, ce qui prévient alors la réaction de Fenton (réaction 1, section 1.3.1 p.18) [12].

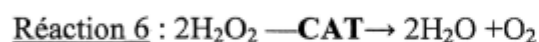
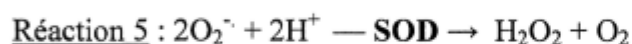
1.4.2 Les antioxydants enzymatiques

Le maintien d'une quantité adéquate de ROS peut également être assuré par des antioxydants ayant une activité enzymatique. Ce groupe d'antioxydants est principalement composé des superoxyde dismutases (SOD), des catalases (CAT) et des glutathion peroxydases (GPx) [54, 62]. La SOD existe sous trois formes chez les mammifères. Chacune a une localisation différente. La Cu,ZnSOD est localisée principalement dans le cytosol. La MnSOD est exclusivement retrouvée dans les mitochondries. Pour sa part, la EC-SOD est retrouvée à l'extérieur des cellules [63, 64]. Les SOD sont la première ligne de défense pour contrer les ROS en dismutant l'O_2^\cdot . Il en résulte alors la formation du H_2O_2 (réaction 5). De plus, pour effectuer leur action, les SOD ont besoin d'un métal de transition à leur site actif. Leur nom vient donc du type de métal nécessaire à leur action [54, 64].

L' H_2O_2 ainsi produit peut alors être neutralisé par un autre groupe d'antioxydants enzymatiques, les catalases (réaction 6) [54, 62]. Il est cependant important de noter que les catalases agissent sur des fortes concentrations de H_2O_2 . La forme classique de la catalase est localisée dans les peroxysomes et un peu dans les mitochondries [54]. Une seconde forme de catalase existe et elle est retrouvée dans le fluide de l'oviducte. Au niveau de la protéine, cette catalase est à 99% similaire à la catalase classique [62].

L' H_2O_2 peut également être neutralisé par un autre groupe d'enzymes, les GPx (réaction 7) [54]. Contrairement aux catalases, les GPx peuvent agir sur de petites quantités de ROS. Pour ce faire, les GPx utilisent le GSH [65]. Les GPx ont également la capacité d'agir sur les hydroperoxydes (réaction 8) [54, 65]. Il existe cinq formes de GPx, dont quatre (GPx-1, GPx-2, GPx-3 et GPx-4) nécessitent la présence de sélénium [65]. La GPx-

1 (glutathion peroxydase classique) est dite cytosolique et mitochondriale. Bien qu'on la retrouve surtout dans le foie, le rein et les érythrocytes, elle est presque ubiquitaire. La GPx-2 (glutathion peroxydase gastro-intestinale) est également cytosolique, et c'est surtout au niveau gastro-intestinal qu'on la retrouve. La GPx-3 (glutathion peroxydase plasmatique) est extracellulaire et elle est surtout présente dans le rein. La GPx-4 ou PHGPx (phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase) est retrouvée dans les membranes et le cytosol. C'est surtout dans les testicules et dans les reins qu'on la détecte. La GPx-4 a également comme caractéristique de pouvoir neutraliser de façon directe les hydroperoxydes des membranes cellulaires. Pour sa part, la GPx-5 (glutathion peroxydase de l'épididyme) ne nécessite pas de sélénium et elle est retrouvée, entre autre, dans l'épididyme de souris [65, 66]. Finalement, il existe aussi des glutathion-S-transférases (GST) qui ne sont pas dépendantes du sélénium et qui sont capables d'agir sur les hydroperoxydes [54, 65].



1.4.3 Les antioxydants et les maladies

Il a été précédemment décrit que les ROS pouvaient être bénéfiques ou néfastes pour la santé. En effet, tout déséquilibre entre les ROS et les antioxydants cause un stress oxydatif qui peut être délétère [65]. Les antioxydants sont donc impliqués dans plusieurs maladies telles que certains cancers, maladies infectieuses, maladies affectant le système nerveux, etc [50, 65]. Le tableau 1 résume quelques-uns des problèmes de santé dans lesquels les antioxydants sont impliqués.

Tableau 1 : Les maladies et les antioxydants. Les différentes formes de chacun des antioxydants ne sont pas énumérées pour faciliter l'interprétation du tableau. Adapté de [50, 65]

Antioxydants	Maladies
SOD	Cancers: Vessie, intestin, sein, rein et foie Autres : Diabète, VIH, perte auditive, leucémie, sclérose latérale amyotrophique, allergie au pollen, athérosclérose, cataracte, trisomie 21, ischémie maladie d'Alzheimer, Crohn et de Huntington
Catalase	Cancers : Colorectum, poumon, intestin, rein et foie Autres : Recto-colite hémorragique, leucémie, diabète, granulomatose chronique familiale allergie aux acariens dermatophagoïdes, cataracte maladie de Parkinson
GPx	Cancers : Peau, sein, foie, rein, intestin, Autres : Leucémie, allergie au pollen, hépatite, VIH maladie de Crohn, de Parkinson et de Huntington

1.5 Les superoxyde dismutases (SOD)

Précédemment, les antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques ont été énumérés. Puisque les SOD sont le sujet de la présente étude, une description plus approfondie de ces dernières sera faite dans cette section.

1.5.1 Généralités

Tel que décrit précédemment, chez les mammifères, il existe trois formes de SOD. La Cu,ZnSOD et la MnSOD sont des formes intracellulaires, tandis que la EC-SOD est extracellulaire [64]. L'action des SOD est de dismuter l' $O_2^{\cdot-}$ et de produire du H_2O_2 (réaction 5, section 1.4.2, page 23) [54]. Bien que cette dismutation peut se faire de façon spontanée, les SOD sont beaucoup plus efficaces à cette tâche [61]. Cette dismutation nécessite deux étapes, lesquelles sont, séquentiellement, l'oxydation, puis la réduction d'un électron. Afin de réaliser cette dismutation, les SOD ont besoin d'être liées à des ions métalliques spécifiques de la SOD en question. Cependant, elles ne nécessitent pas l'aide d'autres co-facteurs [67]. La spécificité de chaque SOD pour un métal de transition sera décrite dans les sections suivantes. La reprise du H_2O_2 par les GPx ou les catalases est très importante, car ce dernier peut inactiver les SOD [68]. Les superoxyde dismutases sont des enzymes très importantes, car en dismutant l' $O_2^{\cdot-}$, elles empêchent qu'il y ait une trop grande quantité de ce ROS. De plus, en dismutant l' $O_2^{\cdot-}$, les SOD préviennent la formation de deux autres ROS très dangereux soit l'ONOO⁻ et l'OH[·]. En effet, lors de la description des ROS, il a été fait mention que l'ONOO⁻ et l'OH[·] pouvaient être formés à partir du $O_2^{\cdot-}$. L'OH[·] est généré via la réaction de Harber-Weiss (réaction 2, section 1.3.1 page 18), tandis que l'ONOO⁻ est formé via l'interaction de l' $O_2^{\cdot-}$ avec le NO (réaction 4, section 1.3.1 page 18) [46]. De plus, l' $O_2^{\cdot-}$ peut réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} . Ce Fe^{2+} peut alors interagir avec l' H_2O_2 et également former du OH[·] (réaction 1, section 1.3.1 page 18) [46]. Finalement, en dismutant l' $O_2^{\cdot-}$, les SOD empêchent que ce ROS inactive les catalases et les GPx [54, 69]. Les SOD sont donc des enzymes clés dans la protection contre les ROS.

1.5.2 Cu,ZnSOD

La Cu,ZnSOD est une enzyme principalement retrouvée dans le cytosol. Cependant, on peut aussi la retrouver dans les lysosomes, le noyau, les peroxysomes et les mitochondries [54, 64, 67]. La Cu,ZnSOD est grandement distribuée et conservée autant

dans le règne animal que dans le règne végétal [70]. La Cu,ZnSOD a un poids moléculaire de 32 kDa et elle existe sous forme d'homodimère. Comme son nom l'indique, on retrouve un atome de zinc et de cuivre au site actif de chacun des monomères de la Cu,ZnSOD [65, 67]. Bien que la Cu,ZnSOD produise du H₂O₂, celui-ci serait l'un des régulateur positif de l'ARNm de la Cu,ZnSOD, tout comme un autre ROS, le NO [64]. Des études ont démontré qu'on retrouvait de grandes quantités de la Cu,ZnSOD dans les neurones moteurs, le foie et le rein. Ces résultats ont été validés chez plusieurs espèces y compris le bovin [67, 71]. De plus, chez le bovin, le gène de la Cu,ZnSOD est sur le chromosome 1, tandis que chez l'humain, la Cu,ZnSOD est positionnée sur le chromosome 21 [64, 72]. La forme cytosolique de la SOD est impliquée dans beaucoup de maladies, dont plusieurs ont été énumérées au tableau 1 dans la section 1.4.3 à la page 24. Parmi les maladies, qui impliquent la Cu,ZnSOD, il y en a certaines d'ordre neurologique. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) fait partie de ce type de pathologies. En effet, il s'agit d'une maladie neurodégénérative où plusieurs mutations (>90) de la Cu,ZnSOD peuvent être impliquées [64, 65]. Concernant le syndrome de Down (trisomie 21), il semble y avoir une relation entre la Cu,ZnSOD et différentes manifestations cliniques de cette maladie. Cependant, son rôle étiologique est moins équivoque que pour la SLA [64]. La Cu,ZnSOD peut également être protecteur. En effet, il a été démontré, *in vitro*, qu'un surplus de Cu,ZnSOD pouvait diminuer les dommages causés à l'organisme suite à différents problèmes de santé tels que la suite à l'ischémie-reperfusion du cœur, l'hyperoxie, l'infarctus, etc. Par contre, de grandes quantités de la Cu,ZnSOD n'ont pas que des avantages, elles peuvent aussi être néfastes. L'atténuation de la force des muscles et des problèmes au niveau du thymus sont deux des nombreux exemples qui peuvent être causés par une trop grande concentration de Cu,ZnSOD [73]. De plus, il semble que la Cu,ZnSOD soit importante dans la tolérance au paraquat, un pesticide, puisque les souris, qui n'expriment plus de Cu,ZnSOD, sont plus affectées par le paraquat [73].

La Cu,ZnSOD est également un antioxydant nécessaire au succès reproducteur. En effet, des études *in vitro* ont démontré que les souris Cu,ZnSOD^{-/-} souffraient d'une baisse de la fécondité. Il est cependant intéressant de noter que ce phénomène est observable uniquement chez les femelles. En effet, les mâles Cu,ZnSOD^{-/-} ne souffraient pas de problème au niveau de leur fécondité [73-75]. Cette baisse de fécondité impliquant la mort

embryonnaire post-implanté ou des problèmes aux niveaux des hormones et/ou au niveau de l'ovaire pourraient en être la cause [73-75].

Ces études de souris Cu,ZnSOD^{-/-} nous donnent une bonne indication de l'importance de cet antioxydant en reproduction chez la femelle. En plus de ces études, il s'avère la Cu,ZnSOD (ARNm, protéine ou activité) a été observée dans différentes composantes du système reproducteur mâle (spermatozoïdes et plasma séminal) et femelle (follicule, corps jaune, ovocyte, cumulus, l'oviducte, utérus, l'embryon, lait maternel, fluide folliculaire) [76-93].

Chez le bovin, la Cu,ZnSOD a différents effets sur la maturation *in vitro* de l'ovocyte. En effet, elle ne semble pas avoir d'effet bénéfique sur le clivage de l'ovocyte [94]. Par contre, lorsqu'elle est en grande quantité (1 500 IU/ml), elle permet à plus d'embryons de se développer à partir de ces ovocytes [94]. En plus petite quantité (< 1000 U/ml), elle n'a pas d'effet sur la quantité d'embryons produits à partir de ces ovocytes [95]. Aussi, elle s'avère bénéfique dans la survie de l'ovocyte cryoconservé de la souris [96]. De plus, la Cu,ZnSOD protège, *in vitro*, l'embryon contre l'arrêt du développement au stade de deux cellules [85, 97]. Selon les conditions d'études ainsi que selon les espèces, la Cu,ZnSOD semble avoir différents impacts (positifs, négatifs ou nuls) sur la fécondation *in vitro*. En effet, chez le bovin, la Cu,ZnSOD n'augmente pas le taux de fécondité [95]. Alors que chez le mouflon, cet antioxydant diminue le succès de cette pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde [98]. Chez la souris, la Cu,ZnSOD a soit aucune influence sur la fécondation soit elle augmente le succès de cette dernière [96, 99]. De plus, chez le bovin, elle peut s'avérer néfaste lorsqu'on analyse le potentiel du développement embryonnaire [100]. Cependant, pour qu'il y ait fécondation, il faut que les spermatozoïdes soient viables et qu'ils aient subi la capacitation et la réaction d'acrosome. Chez la souris, de grandes quantités de Cu,ZnSOD sont plutôt favorables au maintien de la motilité des spermatozoïdes [99]. Par contre, cet antioxydant peut s'avérer néfaste pour la capacitation et la réaction d'acrosome chez l'humain et le bovin [36, 101-104].

1.5.3 MnSOD

La deuxième forme de superoxyde dismutase que l'on retrouve dans la cellule et plus particulièrement dans les mitochondries est la MnSOD. Le métal associé est, comme son nom l'indique, le manganèse. Le poids moléculaire de chacune des quatre unités identiques de la MnSOD est d'environ 23 kDa. C'est dans le site actif de chacun de ces monomères que le manganèse se lie [64, 67]. Tout comme la forme cytosolique de la SOD, la MnSOD est assez conservée entre les espèces [67]. L' H_2O_2 et le NO sont des régulateurs positifs de cette SOD [64, 105]. L' O_2^- est également un régulateur positif potentiel de la MnSOD [105]. La MnSOD se trouve dans une grande quantité d'organes et une étude a démontré qu'elle est fortement présente dans le myocarde, le foie et le rein [71].

Dans l'organisme, la MnSOD a des fonctions à différents niveaux. Par exemple, elle empêche la création de dommages suite à l'hyperoxie pulmonaire et elle est impliquée dans la différenciation cellulaire [64]. De plus, la MnSOD est susceptible de lutter contre l'inflammation [106]. Des changements dans certains acides aminés de la MnSOD accroissent les probabilités d'être atteint d'un cancer du sein ou d'avoir des problèmes aux neurones moteurs. Un tel changement peut également jouer un rôle dans la progérie [64], forme de nanisme peu fréquent où l'enfant ressemble non seulement à une personne âgée, mais qui a également des organes moins développés, une insuffisance de plusieurs glandes et une athérosclérose précoce létale à environ 16 ans [107], dans les cardiopathies idiopathiques et dans le vieillissement accéléré [64]. Des études, *in vitro*, ont été réalisées afin de connaître l'effet d'une grande production de MnSOD. Les résultats obtenus démontraient que cela protège le cœur après une ischémie-reperfusion. De plus, cela diminue les cas de cardiotoxicité suite à une cure à la adriamycine, un antibiotique [73].

L'importance de la MnSOD dans l'organisme est renforcée par des études de souris MnSOD^{-/-}. En effet, les souris MnSOD^{-/-} meurent très tôt après la naissance. Des analyses plus poussées ont démontré qu'il y avait des anomalies à différents niveaux, tels qu'aux cœur, système nerveux, muscles squelettiques, foie et sang [108, 109].

Au niveau de la reproduction, tout comme la Cu,ZnSOD, la forme mitochondriale de la superoxyde dismutase a été détectée dans différentes composantes du système reproducteur. En effet, cet antioxydant a été découvert dans l'ovaire, l'ovocyte, le vagin, le lait maternel, l'utérus, l'oviducte, le corps jaune, l'embryon, les spermatozoïdes et le plasma séminal [12, 76-78, 81, 84, 86-88, 90-92, 110].

Malgré la détection de la MnSOD dans tous ces sites, son rôle en reproduction a été moins étudié que celui de la Cu,ZnSOD, c'est pourquoi moins de détails sur son rôle en reproduction seront mentionnés ici. Parmi les résultats obtenus, il est intéressant de noter que les souris mâles et femelles modifiées pour produire plus de MnSOD pouvaient être moins fécondes [111]. Par contre, il a été démontré que, dans l'ovaire, la MnSOD ne semblait pas être une enzyme clé et que, tel que décrit pour la forme cytosolique de la SOD, la MnSOD permet, *in vitro*, à plus d'embryons de souris de dépasser le stade de deux cellules [74, 85].

1.5.4 EC-SOD

La troisième et dernière forme de superoxyde dismutase que l'on retrouve chez les mammifères, c'est la forme extracellulaire, la EC-SOD. Comme les deux autres SOD, la EC-SOD a besoin d'un métal de transition pour pouvoir effectuer son rôle. Ces métaux sont les mêmes que ceux de la Cu,ZnSOD, soit le cuivre et le zinc [55, 64]. C'est d'ailleurs pour cette raison que, dans ce travail et en général, la forme extracellulaire de la SOD n'est pas identifiée, comme les deux autres SOD, par ses métaux de transitions. En effet, cela a pour but d'éviter toute confusion. En plus d'avoir les mêmes métaux de transition, il y a de 40 à 60% d'homologie entre la partie codante du gène de la EC-SOD et celle du gène de la Cu,ZnSOD [64]. En général, la EC-SOD a un poids moléculaire de 135 kDa et elle est composée de quatre sous-unités identiques [63, 71]. Une autre particularité de la EC-SOD est que le domaine C-terminal de cette glycoprotéine a une affinité très développée pour l'héparine [63]. Basé sur cette caractéristique, il existe trois groupes de EC-SOD. En effet, soit cette affinité est inexistante (A), petite (B) ou grande (C) [63]. La EC-SOD est la

forme de superoxyde dismutase qui est la plus présente dans le plasma, la lymphe et dans le liquide synovial. De plus, elle est exprimée en grande quantité dans les poumons, les reins, le système sanguin et à la surface cellulaire en général [55, 63, 71]. Tout comme les autres SOD, le NO est un ROS qui régule positivement la EC-SOD [64]. Par contre, lorsque le NO est en trop grande quantité, il empêche la localisation normale de la EC-SOD à la surface des cellules endothéliales vasculaires [112].

Concernant l'implication de la EC-SOD dans la santé, des études sur les souris EC-SOD^{-/-} ont également été réalisées et celles-ci ont révélé que ces animaux souffraient de divers troubles tels que des problèmes au niveau de l'apprentissage [64]. Étrangement, il semble que cette capacité soit également affectée de façon négative chez les souris exprimant plus de EC-SOD [64, 113]. De plus, les souris qui expriment de forte quantité de EC-SOD ont, entre autre, moins de troubles suite à une ischémie-reperfusion du coeur [73]. Aussi, il semble que la EC-SOD soit impliquée dans différentes maladies qui peuvent toucher différents systèmes tels que le système cardiaque, le système nerveux et le système respiratoire [63].

Tout comme les deux autres superoxyde dismutases, la EC-SOD a été découvert dans différentes composantes du système reproducteur. En effet, elle a été découvert dans l'utérus, le testicule, le cordon ombilical, l'épididyme, le plasma séminale, les spermatozoïdes et le placenta [55, 63, 81, 114, 115].

Bien que la EC-SOD ait été détectée dans quelques organes du système reproducteur, les rôles qu'elle peut jouer ne sont pas encore bien définis. En effet, cet antioxydant est très peu étudié en reproduction. Parmi les rares études effectuées, il a été découvert que les souris EC-SOD^{-/-} n'avaient pas de problèmes au niveau de leur fécondité [116]. Par contre, il a également été trouvé que la EC-SOD pourrait être importante dans la maturation *in vitro* de l'ovocyte ainsi que pour régler les problèmes d'érection qui arrivent avec le vieillissement [117, 118].

1.6 Les antioxydants dans l'oviducte

Dans cette section, nous traiterons des études concernant l'expression des antioxydants dans l'oviducte, notre sujet d'étude. Certains antioxydants ont déjà été découverts dans l'oviducte bovin. En effet, des études précédentes de notre laboratoire ont montré la présence d'antioxydants tels les GPx-1, GPx-2, GPx-3, GPx-4 et les catalases et une étude préliminaire sur la Cu,ZnSOD a également été réalisée. Ces études ont démontré que certains antioxydants étaient régulés le long de l'oviducte ainsi que durant le cycle oestral bovin [23, 83]. De plus, les hormones joueraient un rôle dans cette régulation [23, 83]. En effet, l'estradiol régulerait positivement la GPx-4 dans l'oviducte bovin [23]. De plus, outre l'oviducte bovin, chez les mammifères, la Cu,ZnSOD et la MnSOD ont également été étudiées dans l'oviducte ou dans son fluide chez l'humain, la souris, le lapin et le rat [77, 84, 85, 97, 110].

1.7 Rôles physiologiques des ROS en reproduction

La présente étude porte sur une famille d'antioxydants, les superoxyde dismutases. Le rôle des antioxydants est de détruire les ROS et dans le cas de la SOD, il y a également production d'un ROS, le H_2O_2 . Afin de bien comprendre l'importance des antioxydants, il est crucial de connaître l'implication des molécules qu'ils neutralisent. En effet, bien que l'implication en reproduction des SOD ait été décrite, ce n'est pas uniquement par leur ajout ou leur élimination qu'on peut comprendre le rôle qu'elles jouent, car si un antioxydant détruit un ROS indispensable à certains niveaux de l'organisme, cela peut avoir des répercussions désastreuses. C'est pourquoi, dans cette partie du travail, il y aura une description de l'implication des ROS en reproduction. De plus, il ne sera pas uniquement question des ROS directement liés aux SOD soit l' O_2^- et le H_2O_2 , car, tel que décrit précédemment, les ROS et les antioxydants sont tous reliés entre eux. De plus, dans l'intention de connaître tous les impacts que peuvent avoir les ROS en reproduction, des exemples chez différentes espèces animales seront décrits lorsque pertinents. De plus, cette

section est décrite après celle des antioxydants, car afin de bien illustrer le rôle des ROS, à quelques reprises dans le texte, il y aura référence à certains antioxydants dont l'identification et la connaissance étaient préalablement nécessaires pour bien comprendre les idées décrites.

1.7.1 Maturation de l'ovocyte

L'ovocyte et l'ovaire produisent des ROS. Alors, une connaissance de l'effet que ceux-ci ont sur la maturation de l'ovocyte est de la plus grande importance [12, 119]. De petites quantités de ROS seraient importantes lors de cette étape. En effet, *in vitro*, il a été démontré que, chez le bovin, plus d'embryons étaient produits lorsque l'ovocyte avait été incubé avec des ROS durant sa maturation [95]. Ceci est supporté par une autre étude qui a démontré que l'ajout de certains antioxydants, telles que la catalase et la Cu,ZnSOD, durant la maturation *in vitro* de l'ovocyte, n'augmente pas la quantité d'ovocytes qui se rendent au stade de morula et de blastocystes [100]. Aussi, il a été constaté, chez le rat, que les antioxydants pouvaient empêcher la maturation de l'ovocyte induite par les gonadotrophines [120, 121]. Il est cependant important de noter que la notion de faible quantité de ROS est très importante puisque, chez la truie, lorsqu'*in vitro*, des ROS sont produits via la combinaison hypoxanthine-xanthine oxydase, la maturation de l'ovocyte, et plus spécifiquement celle des ovocytes ne possédant pas de cumulus, peut être négativement affectée. En effet, il y a un arrêt de la méiose ainsi qu'une dégénérescence plus importante chez ces ovocytes. De plus, chez les ovocytes possédant un cumulus, les ROS, produits par ce même système, affectent négativement la maturation de ces derniers et ce au moment de la métaphase II [122]. Ces bas niveaux peuvent alors être maintenus par des antioxydants présents dans l'ovocyte. En effet, chez certaines espèces animales, telles que l'humain, la souris et le bovin, on a retrouvé différents antioxydants (catalase, SOD, GPx, etc.) [76, 79].

1.7.2 Le corps jaune

L' H_2O_2 est un ROS qui est potentiellement important pour le corps jaune. En effet, ce dernier aurait un effet lutéolytique chez le rat et chez les primates. Lorsqu'il n'y a pas eu fécondation, le corps jaune régresse et l' H_2O_2 aurait un rôle à jouer dans cette étape puisque, lors de cette régression, une plus grande quantité de ce ROS est libérée par la structure lutéale [48]. Aussi, de faibles quantités de H_2O_2 sont nécessaires pour empêcher la formation de la progestérone et de l'AMPc entraînant ainsi un déficit d'ATP à l'intérieur de la cellule lutéale de rat [123-125]. L' H_2O_2 inhibe la production de la progestérone en empêchant le cholestérol de rentrer dans la mitochondrie, où il aurait été transformé en progestérone [48, 124]. De plus, il a été montré, *in vitro*, que l' H_2O_2 pourrait avoir une action lutéolytique chez le bovin, car la présence de H_2O_2 dans les cellules lutéales de cette espèce cause l'apoptose [126]. Le tissu lutéal produit également du $O_2^{\cdot-}$ [124]. Par contre, il a été démontré, chez le rat, que ce ROS ne serait pas impliqué dans la régression puisque la catalase inhibe toute action lutéolytique. Donc, l' $O_2^{\cdot-}$ serait plutôt transformé en H_2O_2 [48]. Cependant, une étude *in vitro*, chez le rat, montre qu'à faible dose l' $O_2^{\cdot-}$ induit la production de la progestérone tandis qu'une forte dose l'inhibe [127]. Alors, on ne peut pas totalement exclure l'action lutéolytique de l' $O_2^{\cdot-}$ à de fortes doses. Le NO est un autre ROS qui a un effet lutéolytique dans le corps jaune et il bloque aussi le stéroïdogénèse de l'ovaire chez l'humain et chez le rat [55, 119]

1.7.3 L'ovulation

L'ovulation se caractérise par la rupture d'un follicule mature [1]. Le processus ovulatoire ressemble beaucoup à celui de l'inflammation, c'est-à-dire qu'il y a augmentation de la production de bradykinines, de prostaglandines, d'histamines et de cytokines. Des plus, des anti-inflammatoires non-stéroïdiens bloquent l'ovulation [48, 68]. Les ROS tels que l' $O_2^{\cdot-}$, l' H_2O_2 et l' OH^{\cdot} sont impliqués dans le processus de l'inflammation. Alors, l'hypothèse a été soulevé que les ROS étaient aussi impliqués dans

l'ovulation [128]. Fait intéressant, dans le follicule, il y a formation de ROS lors de l'ovulation [120]. Parmi ces ROS il semblerait que l' O_2^- soit impliqué dans cette étape. En effet, à la lumière des résultats obtenus suite à une étude *in vitro* avec des SOD long-durées (analogues synthétiques de la Cu,ZnSOD) sur des rats ayant reçu de l'hCG, une équipe est venue à la conclusion qu'il est possible que la perméabilité vasculaire soient accentuée par l' O_2^- . Alors, cela bouleverserait la structure du follicule, ce qui permettrait l'ovulation [68]. Chez la lapin, l'ovulation est également inhibée la Cu,ZnSOD ainsi que par la combinaison Cu,ZnSOD et catalase. Cependant, l'unique action de la catalase, ne bloque pas l'ovulation [128]. Un autre ROS possiblement important lors de l'ovulation est le NO puisqu'il la provoque [55].

1.7.4 Les spermatozoïdes

Les gamètes mâles produisent de façon basale des ROS tels que l' O_2^- et le H_2O_2 [48, 56, 129]. Pour les spermatozoïdes, les ROS peuvent être néfastes ou bénéfiques [48]. Commençons par les conséquences négatives. Tout d'abord, l'exposition du spermatozoïde à des ROS tels que le H_2O_2 , avant la fécondation, peut diminuer sa capacité à pénétrer l'ovocyte [95]. La motilité des spermatozoïdes peut également être diminuée par les ROS [48, 53]. Il semble d'ailleurs que l' H_2O_2 soit un des ROS susceptible de causer ce problème [101, 130]. D'ailleurs, on a caractérisé ce ROS comme étant le plus toxique pour les spermatozoïdes [101]. Chez la vache, ce ROS peut également nuire à la capacitation [104, 130]. Aussi, les ROS, peuvent attaquer les nombreux acides gras polyinsaturés contenus dans les membranes des spermatozoïdes. Cette attaque peut leur causer différents troubles tels que créer la disparition de leur fluidité membranaire et un vieillissement accéléré [53]. De plus, les ROS pourraient être responsables de l'infertilité mâle [131]. Aussi, des problèmes créés au niveau de l'ADN du spermatozoïde par les ROS pourraient entraver le développement de l'embryon voir même causer un avortement [132].

Tel que mentionné précédemment les ROS ne sont pas que nuisibles pour les spermatozoïdes. Voici donc des exemples où les ROS sont importants. Tout d'abord, les

ROS sont importants pour la maturation des spermatozoïdes épидymaires puisqu'il faut que les groupements sulfhydriles des protamines soit oxydés de façon contrôlée [55]. Au niveau de la capacitation et de la réaction d'acrosome, les ROS seraient indispensables. Les deux ROS qui semblent les plus impliqués sont l' $O_2^{\cdot -}$ et l' H_2O_2 . Par contre, leur implication ne serait pas la même selon les espèces [131]. Étant donné que la présente étude concerne le bovin, c'est chez cette espèce que sera décrite l'implication de ces deux ROS. Dans la capacitation, c'est l' $O_2^{\cdot -}$ qui serait impliqué dans ce processus. Pour sa part, l' H_2O_2 est plutôt important dans la réaction d'acrosome du spermatozoïde bovin, sauf qu'il doit être en faible quantité, sinon il diminue la motilité de ces derniers [36, 101, 104]. Le NO est aussi un ROS important en reproduction, car en plus d'être important dans la spermatogénèse, en petite quantité, il serait impliqué dans la capacitation [133, 134].

1.7.5 La fécondation

De la même manière que pour les spermatozoïdes, les ROS peuvent avoir un effet négatif ou un effet positif sur la fécondation. En effet, il a été démontré que, chez le rat, l' H_2O_2 nuisait à la pénétration de la zone pellucide par le spermatozoïde *in vitro* [135]. Par contre, il est connu que les ROS causent de la peroxydation lipidique et, chez l'humain, il a été démontré qu'une faible peroxydation lipidique, n'affectant pas la motilité des spermatozoïdes, était favorable à la fusion du spermatozoïde avec la zone pellucide [136, 137]. Une autre évidence suggérant que les ROS peuvent être importants dans la fécondation a été démontré par une autre équipe. En effet, cette dernière a démontré que l'addition de la catalase durant la fécondation *in vitro* (FIV) avait un effet négatif sur la pénétration de l'ovocyte. Donc, il est possible qu'un peu de H_2O_2 soit requis pour que la fécondation ait lieu [95]. Finalement, une petite quantité de NO serait favorable à la fusion entre le spermatozoïde et l'ovule [133].

1.7.6 L'embryon

L'embryon produit des ROS qui peuvent l'affecter. Le NO est l'un de ces ROS. En effet, ce ROS joue un certain contrôle dans son développement et son implantation. Certains mentionnent que le NO n'a pas d'effet négatif sur l'embryon [12], alors que d'autres affirment qu'il y a une relation inverse entre la quantité de ce ROS dans le fluide folliculaire et la qualité de l'embryon [132]. Cette même relation a été démontrée au niveau de sa division cellulaire. De plus, le NO serait associé à l'apoptose et à des problèmes d'implantation [132]. Bien que ce ROS soit important, il ne fait pas parti des trois ROS les plus retrouvés chez l'embryon. En effet, ces derniers sont l' O_2^- , l' H_2O_2 et l' OH^- [12]. La tolérance de l'embryon à certains ROS est variable au cours du développement. En effet, l' H_2O_2 a moins d'effet sur les embryons bovins de 9 à 16 cellules que sur les zygotes et les blastocystes [12]. Parmi les impacts négatifs que peuvent avoir les ROS sur les embryons, il y a les dommages causés aux mitochondries, à l'ADN, aux organelles des cellules ainsi que l'altération des voies métaboliques. Ils peuvent aussi créer l'apoptose, tout comme ils peuvent être participants à des maladies embryonnaires fœtales. Ils peuvent même causer des problèmes de santé à long terme chez l'enfant et l'adulte. De plus, la peroxydation lipidique peut causer l'arrêt du développement embryonnaire au stade de deux cellules. [12, 60, 84, 119, 138]. Les effets négatifs des ROS sur les embryons ne sont pas causés uniquement lorsque l'embryon est en développement. En effet, des ROS produits par les spermatozoïdes lors de la fécondation *in vitro* peuvent causer des tords à l'embryon [12]. De plus, les ROS ne sont pas que dommageables pour l'embryon. En effet, les ROS seraient importants dans le développement de l'embryon précoce qui se déroule avant l'implantation [84]. De plus, lors de cette étape de la reproduction, les ROS réguleraient certains gènes et facteurs transcriptionnels tels que facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1) et la protéine activatrice 1 (AP-1) [132, 139].

1.7.7 Autres effets des ROS

Tel que décrit précédemment, les ROS affectent différentes étapes de la reproduction. Plusieurs autres paramètres de la reproduction sont affectés par les ROS. Parmi ceux-ci il y a l'endométriase, les fausses couches, l'infertilité, les accouchements prématurés et ceux normaux, le diabète gestationnel, les maladies de grossesse telles que la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin [119, 140]. De plus, toutes les connaissances acquises sur l'effet que peuvent avoir les ROS sont utiles afin d'augmenter les chances de succès autant dans les techniques de reproduction assistée chez l'humain que lors de la reproduction *in vitro* chez les animaux [12, 119].

1.8 Problématique, hypothèse et objectifs

À plusieurs niveaux, les antioxydants et les ROS sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. La reproduction n'y fait pas exception. En effet, il a été démontré que plusieurs antioxydants et ROS y jouent des rôles capitaux. Parmi ces antioxydants on retrouve les superoxyde dismutases. De plus, les ROS neutralisés et produits par les SOD (O_2^- et H_2O_2 respectivement) sont également impliqués dans plusieurs de ces étapes. Ceci a d'ailleurs été démontré à de nombreuses reprises *in vitro* (section 1.7)

Étant donné que l'oviducte est vraisemblablement un organe important en reproduction dû à la grande quantité d'étapes qui s'y déroulent (la maturation finale des gamètes, la fécondation et les premières étapes du développement de l'embryon), il est fort probable que plusieurs antioxydants y soient exprimés. Ceci a d'ailleurs été démontré dans notre laboratoire [23, 83]. De plus, à ce jour, les superoxyde dismutases ont été détectées dans l'oviducte de plusieurs mammifères. En effet, la forme cytosolique (Cu,ZnSOD) et mitochondriale (MnSOD) ont été rapportées dans l'oviducte ou son fluide chez l'humain, la

souris et le lapin. Cependant, leur régulation dans l'oviducte de la vache demeure à ce jour inconnue.

Les bovins représentent une grande importance économique pour le Canada. Une meilleure connaissance de ce qui se produit dans le site naturel de la fécondation, l'oviducte, permettra d'augmenter le succès de plusieurs techniques de productions d'animaux telles que l'insémination artificielle ainsi que de diagnostiquer l'infertilité.

Vu l'importance, précédemment décrite, des SOD en reproduction ainsi que leur découverte dans l'oviducte de différentes espèces animales, nous croyons que les trois formes de superoxyde dismutases seront présentes dans l'oviducte bovin et que leur patron d'expression spatio-temporel variera afin de leur permettre de jouer un rôle adéquat dans les processus reproducteurs associés à l'oviducte tel que fournir des niveaux appropriés de ROS nécessaires aux différents processus reproducteurs.

Les objectifs de la présente étude sont, en premier lieu, d'identifier dans quelles sections de l'oviducte (isthme, jonction isthme-ampoule et ampoule) et dans quels types cellulaires (muscle, *lamina propria* et épithélium) les superoxyde dismutases sont exprimées. De plus, suite à cette identification, une analyse comparative pour chacun de ces paramètres (sections et types cellulaires) sera réalisée. En second lieu, l'objectif est de caractériser l'expression des SOD durant le cycle oestral en fonction du statut hormonal, c'est-à-dire de vérifier si les différents niveaux d'hormones durant le cycle oestral affectent l'expression des SOD. En dernier lieu, l'objectif est de déterminer si les SOD sont exprimées de façon différentielle entre les oviductes ipsilatéraux et contralatéraux afin d'étudier si la proximité du corps jaune ou du follicule dominant affecte leur expression. Dans cette étude, c'est la forme protéique des SOD qui a été caractérisée, car nous voulions étudier la forme active et les rôles potentiels de ces antioxydants. Cette caractérisation a été réalisée par deux techniques, soit l'immunobuvardage et l'immunohistochimie. Une étude préliminaire sur l'ARNm de la EC-SOD a été amorcée par PCR quantitatif en temps réel. Les travaux réalisés pour atteindre ces objectifs sont présentés au chapitre 2 et dans l'annexe I.

Chapitre 2 : L'expression des superoxyde dismutases (SOD) dans l'oviducte bovin durant le cycle oestral

Superoxide dismutases (SODs) expression in the bovine oviduct during the estrous cycle

Monica ROY^{a,b}, Danny GAUVREAU^{a,b} and Jean-François BILODEAU^{1,a,b,c}.

^aUnité de Recherche en Ontogénie et Reproduction, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec, Canada G1V 4G2.

^bCentre de Recherche en Biologie de la Reproduction (CRBR), Université Laval, Québec, G1V 4G2.

^cDépartement d'Obstétrique et Gynécologie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4.

Running Title: Expression of SODs in the oviduct

¹Corresponding author:

Unité d'Ontogénie et Reproduction

CHUQ, Pavillon du CHUL, Local T-1-49

2705 Boul. W. Laurier

Ste-Foy, Québec, G1V 4G2

Tél: (418) 525-4444 x 46153

Fax: (418) 654-2765

E-mail: jean-francois.bilodeau@crchul.ulaval.ca

2.1 Résumé

Les antioxydants et les dérivés actifs de l'oxygène (ROS) jouent des rôles importants en reproduction. En effet, ils sont, entre autre, essentiels à la capacitation, l'hyperactivation et la fécondation. L'oviducte est le site naturel de la fécondation. Jusqu'à maintenant, les antioxydants enzymatiques dans l'oviducte bovin sont peu étudiés *in vivo*. Dans notre étude, nous avons analysé la forme protéique de la superoxyde dismutase cytosolique (Cu,ZnSOD) et mitochondriale (MnSOD). Ces antioxydants dismutent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et génèrent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'immunobuvardage a permis d'étudier l'expression des SOD dans chacune des sections de l'oviducte à chaque étape du cycle oestral, tandis que l'immunohistochimie a été utilisée pour identifier les types cellulaires exprimant les SOD. Nos résultats montrent que tout au long du cycle oestral, la Cu,ZnSOD et la MnSOD sont moins exprimées dans l'isthme. Durant le cycle oestral, la Cu,ZnSOD est moins exprimée suite à l'ovulation. Bien que l'expression de MnSOD ne change pas durant le cycle, elle est plus exprimée durant la phase lutéale du côté ipsilatéral. Tous les types cellulaires expriment la Cu,ZnSOD et la MnSOD, mais à différents niveaux selon les sections étudiées. Nos résultats suggèrent que le statut hormonal affecte l'expression des SOD étudiées. De plus, les variations dans l'expression spatiale des SOD dans l'oviducte laisse supposer leur rôle indispensable dans le stockage et la capacitation des spermatozoïdes.

2.2 Abstract

Antioxidants and reactive oxygen species (ROS) play an essential role in reproductive events such as sperm capacitation/hyperactivation and fertilization. The oviduct is the natural site of fertilization and early embryo development in which antioxidants and prooxidants are likely to play a crucial role. So far, only few enzymatic antioxidants were characterized in the bovine oviduct throughout the estrous cycle. In this study, we characterized the protein expression of two superoxide dismutases (SODs): the cytosolic (Cu,ZnSOD or SOD1) and the mitochondrial (MnSOD or SOD2) forms. The SODs are first line enzymatic antioxidants that dismutate superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) to produce hydrogen peroxide (H_2O_2). The Cu,ZnSOD and MnSOD protein expression was assessed in three sections of the oviduct (isthmus, isthmic-ampullary junction and ampulla) during the estrous cycle by western blot analysis. The cell types that expressed the SODs in the oviduct were localized by immunohistochemistry. Our results revealed that Cu,ZnSOD and MnSOD proteins were less expressed in the isthmus than in other sections at all stages of the estrous cycle. Also, the expression of Cu,ZnSOD was the lowest early after ovulation. In general, MnSOD levels did not vary during the estrous cycle, but in the luteal phase, MnSOD was significantly more expressed in the oviduct ipsilateral. The Cu,ZnSOD and MnSOD proteins were found in all cell types of the oviduct, but their relative expression vary among sections of the oviduct. Our results suggest that the expression of SODs is influenced in part by the hormonal status. Also, the protein expression profile of SODs along the oviduct suggested that the latter play an important role in the preservation and the capacitation of male gametes.

Keywords: oviduct; estrous cycle; superoxide dismutase; cow; reactive oxygen species

2.3 Introduction

In cows as in other animal species, the oviducts play a critical role in early reproductive processes such as gamete maturation, fertilization and early embryo development (10,16,20,28,31,33). In order to ensure the success of these processes, an adequate balance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidants is essential as shown by many *in vivo* and *in vitro* studies (5,22,24-26,29). Reactive oxygen species (ROS) exist in several forms ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , NO , $ONOO^{\cdot-}$) (12) and can be either beneficial or detrimental to reproductive events (5,22,24-26,29). Indeed, low levels of ROS can be beneficial in promoting the binding of spermatozoa to the zona pellucida (2,8,30). In bovine, the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) are essential in the process of sperm capacitation and in acrosome reaction respectively *in vitro* (24,26). However, high hydrogen peroxide (H_2O_2) concentrations reduce bull sperm motility *in vitro* (26) and may impair fertilization and embryo development (15,27,35). The combined interactions of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 can generate the hydroxyl radical (OH^{\cdot}), one of the most powerful ROS that can damage lipids, proteins and nucleic acids (12). The H_2O_2 can also form OH^{\cdot} via the Fenton reaction in the presence of transition metals such as iron (12,22). The $O_2^{\cdot-}$ can also react with nitric oxide (NO) to form the peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$) (12), a powerful oxidant, that reduces the bioavailability of NO .

The ROS production is controlled by enzymatic and nonenzymatic antioxidants. Among the nonenzymatic molecules, there are glutathione (GSH), α -tocopherol, β -carotene, ascorbate and vitamin C (1,7). The main antioxidant enzymes include superoxide dismutases (SODs) that neutralize superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), catalases that scavenge hydrogen peroxide (H_2O_2) and glutathione peroxidases (GPx) that detoxify H_2O_2 and lipid hydroperoxides (ROOH) (7).

The balance between antioxidants and ROS is very important for the reproductive success as mentioned earlier. However, there are only few studies *in vivo* about the antioxidants in the oviduct, especially for the SODs in bovine. The SODs exist in three forms: the cytosolic (Cu,ZnSOD or SOD1), the mitochondrial (MnSOD or SOD2) and the

extracellular form (CuSOD or SOD3) (37). The SODs are on the first line of defense against ROS in dismutating two superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) into one hydrogen peroxide (H_2O_2) (11). Then, the produced H_2O_2 can be metabolized by either GPx or catalases (7). Thus, SODs are important defense enzyme against the $O_2^{\cdot-}$, in order to avoid the formation of OH^{\cdot} and $ONOO^{\cdot}$. The SODs also play a role in the female reproductive success, since a study on Cu,ZnSOD female knock-out mice have shown a reduction of fertility (13). So far in mammals, Cu,ZnSOD and MnSOD were studied in the mouse, rat and human oviducts by other investigators (6,9,23,34).

We have shown previously that antioxidant enzymes such as glutathione peroxidases (GPx) and prooxidant enzymes such as nitric oxide synthases (NOS) that produce NO are spatially and timely regulated in the bovine oviduct during the estrous cycle (17,19). However, the specific protein regulation of superoxide dismutases (SOD) remains to be determined in the cow. In this study, we analyzed the expression of Cu,ZnSOD and MnSOD proteins during the estrous cycle in three different sections in the ipsilateral and the contralateral oviducts. Our results revealed that Cu,ZnSOD and MnSOD proteins have specific expression profiles in the different sections of the oviduct throughout the estrous cycle. We also determined the cellular localization of SODs and found that both, Cu,ZnSOD and MnSOD were present in all cell types, but their relative expression varied between the different sections of the oviduct.

2.4 Materials and methods

Oviducts

Oviducts were transported on ice to the laboratory from the slaughterhouse within 4 h. Genital tracts were examined and those with anomalies were eliminated. The stages of the estrous cycle were determined by a visual examination of the ovaries as described by Arosh and al (3). The oviducts were divided into three groups: the postovulatory (days 0-3), the luteal (days 10-15) and the follicular (days 18-21) stages. To analyze the influence of the corpus luteum, the ipsilateral and the contralateral oviducts were studied separately. The ipsilateral oviduct is located on the side where the ovulation occurred. The contralateral oviduct is the oviduct proximal to the next dominant follicle. Only animals that ovulated by ovarian alternations were used. Oviducts were dissected to remove blood vessels and other contaminating tissues. The oviducts were also cut in three sections: isthmus, isthmic-ampullary junction and ampulla. The oviducts were frozen in liquid nitrogen and kept at -86°C until analyzed.

Tissue preparation

A sample from each section of the oviduct (isthmus, isthmic-ampullary junction and ampulla) was mixed in ice-cold PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing a protease inhibitor cocktail (1 mM EDTA, 0.5 mg/ml Leupeptin, 1.4 mg/ml Pepstatin A, 70 mg/ml PMSF; Boehringer Mannheim, Laval, PQ) and homogenized with a polytron. Homogenates were mixed in Laemmli sample buffer (5% (v:v) 2-mercaptoethanol) and boiled for 10 min (17, 19). The quantity of proteins was determined using BCA protein assay according to manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL).

Western analysis

Thirty micrograms of proteins from each section (isthmus, isthmic-ampullary junction and ampulla) were loaded on a 15% polyacrylamide-SDS gel. After the electrophoresis, the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (0,2µm) (Bio-Rad Laboratories, Montreal, Qc). The membranes were incubated for 1 h at room temperature with 5% dry milk in TBS-T. After, the membranes were incubated for 2 h at room temperature with primary rabbit polyclonal antibodies against bovine SOD1 (dilution 1: 10000) (17) and SOD2 (dilution 1: 5000) (GeneTex, San Antonio, TX). The signal was revealed using ECLTM (Amersham, Littlechanfont, BH). Alpha Imager 2000 was used to perform densitometry analyses (Alpha Innotech, San Leandro, CA). Five pairs of oviducts cut in three sections were used for each stage of the estrous cycle.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as previously described (19). Briefly, immediately after the dissection, each section of the oviduct (isthmus, isthmic-ampullary junction and ampulla) was fixed overnight in 4% paraformaldehyde. Optimum cutting temperature medium (OCT) (Canemco, St.Laurent, Québec, Canada) was used to embed the sections before freezing in liquid nitrogen. Samples were kept at -86°C until analysis. Blocks were cut in 8 µm cryosections with a cryotome (Shandon, Pittsburgh, PA). From each OCT block, eight cryosections were cut and deposited on a microscope slide. Vectastain Elite ABC kit was used according to manufacturer's instructions to perform immunohistochemistry analysis (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). The slides were incubated 30 min in 3% H₂O₂ (v:v) with methanol to inactivate endogenous peroxidases. Then, the slides were incubated 1 h at room temperature with 10% goat serum (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) in PBS to block non-specific binding. After, the cryosections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody. The primary

antibodies were rabbit polyclonal antibody against bovine SOD2 (dilution 1: 1000) (GeneTex, San Antonio, TX) and SOD1 (dilution 1: 1000) (Stressgen, Victoria, BC). A negative control was also done with non-specific IgGs. After washing in PBS, the slides were incubated using a biotinylated goat anti-rabbit IgG for 1 h hour at room temperature (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Finally, the slides were incubated 30 min with the ABC elite reagent and with 3-amino-9-ethylcarbazole until the immunostaining is revealed. Mayer's hematoxylin was used as a counterstain (Sigma-Aldrich). A Axioskop 2 Plus microscope (Zeiss, Toronto, Ontario, Canada) coupled to a digital camera was used to take color pictures of the results.

Statistical analysis

The densitometry values obtained from the western blot analysis were normalized. Values shown in graphics are mean \pm SEM. All data were normally distributed and passed equal variance testing. Model variables included oviduct section (isthmus, isthmic-ampullary junction, and ampulla), oviduct side (ipsilateral vs. contralateral to the corpus luteum), and stages of the estrous cycle (d 0–3, d 10–15 and d 18–20). Main effects of each variables and interactions between these variables were determined. The experiments were analyzed with the general linear model of SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Multiple means were compared by ANOVA, and when a significant effect was obtained, the difference between means was determined by Duncan multiple range test. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

2.5 Results

Overview of Cu,ZnSOD and MnSOD expression along the oviduct throughout the estrous cycle

To determine the protein expression of Cu,ZnSOD and MnSOD in the different sections of the oviduct, western blot analysis were performed. The isthmus, isthmio-ampullary junction and ampulla sections were studied at all stages of the estrous cycle in the ipsilateral and the contralateral oviducts. The results shown in figure 1 are one representative experiment out of five (a total of 15 pairs of oviducts were analyzed). The Cu,ZnSOD and MnSOD were found in the three segments of the oviduct, but their respective levels varied between sections. Indeed, the results revealed that most of the time, at each stage of the estrous cycle, the lowest expression for Cu,ZnSOD was in the isthmus segment of the oviduct (Fig. 2A and B). The latter result was found in both, the ipsilateral and the contralateral oviducts. The same pattern of expression was found for MnSOD protein, but it was only significant during the postovulatory and luteal stages in the ipsilateral oviduct and during the postovulatory stage in the contralateral oviduct (Fig. 2C and D). Moreover, MnSOD protein levels tended to be lower in the isthmus than in the ampulla section of the oviduct at the other stages ($P < 0.1$; Fig. 2C and D).

Specific analysis of Cu,ZnSOD expression in the oviduct sections and during the estrous cycle

To determine whether the hormonal status had an influence on Cu,ZnSOD, we studied its protein levels during the estrous cycle. The three stages studied were the postovulatory (d 0-3), luteal (d 10-16) and follicular stages (d 18-21). At first, the data were pooled for the three sections and compared (Fig. 3A and B). We found in the whole oviduct

that the Cu,ZnSOD was significantly less expressed at the postovulatory stage. This result was found in both, the ipsilateral and the contralateral oviducts (Fig. 3 A and B).

Also, to investigate whether this variation in expression was found in all sections of the oviduct as well, we further analyzed the Cu,ZnSOD expression in the isthmus, isthmic-ampullary junction and ampulla sections of the oviduct (Fig. 3C and D). The Cu,ZnSOD protein was found significantly lowest at the beginning of the estrous cycle in the ampulla from the ipsilateral oviduct and in the isthmus from the contralateral oviduct (Fig. 3C and D). Moreover, in the isthmus and in the isthmic-ampullary junction from the ipsilateral oviduct, the same pattern of expression was observed, but it was a non-significant trend ($P < 0.1$).

The same type of analysis as Cu,ZnSOD (Fig. 3) was performed with MnSOD. However, no significant difference was found for MnSOD expression during the estrous cycle in the whole oviduct or in each section of the oviduct (data not shown).

Specific analysis of the expression of Cu,ZnSOD and MnSOD in the ipsilateral and the contralateral oviducts during the estrous cycle

Here, we analyzed specifically the expression of SODs in the whole ipsilateral and contralateral oviducts to determine the influence of the corpus luteum during the estrous cycle. The expression of Cu,ZnSOD was not significantly different between the ipsilateral and contralateral sides (Fig. 4A). Of note, during the postovulatory and luteal stages, the expression of Cu,ZnSOD in the contralateral oviduct tended to be higher than in the ipsilateral oviduct ($P=0.09$ and $P=0.07$; Fig. 4A). As observed with Cu,ZnSOD during the postovulatory and the follicular stages, MnSOD expression was not significantly affected in the ipsilateral and the contralateral oviducts (Fig. 4B). However, MnSOD expression was significantly higher in the ipsilateral oviduct than in the contralateral oviduct during the luteal stage.

Cellular localization of Cu,ZnSOD and MnSOD proteins in the bovine oviduct

To study the localization of Cu,ZnSOD and MnSOD proteins in the oviduct, we did an immunohistochemistry study on cryosections of the oviduct. Since the relative staining between cell types did not vary for the SODs during the estrous cycle, we showed only one stage in Figure 5. In the isthmus, isthmic-ampullary junction and ampulla, Cu,ZnSOD was found in each cell types of the oviduct, but the staining intensities varied between the different cell types of each section (Fig. 5). Indeed, in the isthmus Cu,ZnSOD was mostly detected in the lamina propria, whereas in the isthmic-ampullary junction the staining was homogenous. Interestingly, in the ampulla, Cu,ZnSOD was mostly observed in the epithelial cells. The MnSOD was also observed in all cell types in each section of the oviduct. Specifically, in the isthmus and isthmic-ampullary junction, the staining intensity was stronger in the epithelial cells and in the lamina propria than in the smooth muscle cells. In the ampulla section, MnSOD was mostly observed in the epithelial cells as seen with Cu,ZnSOD (Fig. 5).

2.6 Discussion

In this work, we clearly showed the presence of both, Cu,ZnSOD and MnSOD proteins in the bovine oviduct. Previously, we have reported the presence of Cu,ZnSOD protein and SODs enzymatic activities in the bovine oviductal fluid (17). Here, we further analyzed the protein localization of SODs in the different cell types of the oviduct. The oviduct is composed of epithelial cells, lamina propria and of smooth muscle cells (10). It is interesting to note that Cu,ZnSOD and MnSOD were present in all cell types in each section of the oviduct. Indeed, only staining intensities varied among cell types between the three sections of the oviduct. Of note, the estrous cycle had no apparent effect on the relative distribution of SODs among cell types. The variations of the staining intensities in the different segments of the oviduct were of interest. In the ampulla, Cu,ZnSOD staining intensity was the highest in the epithelium. In contrast to the isthmus, the epithelium of the ampulla have been shown to be very active in the secretion of proteins, especially at estrous (14). We showed that Cu,ZnSOD was mostly expressed just before estrous in the ampulla. Thus, the strong staining intensity of Cu,ZnSOD in the epithelium of the ampulla can be partly explained by a higher level of secretory activity of this epithelium prior estrous. Also, our findings showed that Cu,ZnSOD and MnSOD were always present in the epithelial cells. These results also suggest the importance of Cu,ZnSOD and MnSOD in the protection of the oviduct and gametes that are in contact with the fluid or/and epithelial cells of the oviduct.

There is little information on the presence of SODs in the oviducts of many species. The MnSOD protein was found in the epithelium of human fallopian tubes and Cu,ZnSOD protein was detected in the epithelial cells of the isthmus, but not in the ampulla of the oviduct in contrast to what we have reported in bovine (34). In the rat, MnSOD mRNA was not detected in the epithelial cells of the oviduct (23).

In this work, we showed that Cu,ZnSOD and MnSOD proteins were less expressed in the isthmus at all stages of the estrous cycle. This is in accordance with our previous findings which showed that total SOD activity was lower in the oviductal fluid of the

isthmus than in the ampulla (17). *In vitro*, studies showed that O_2^- is important in the capacitation process of cryopreserved bovine spermatozoa (24,26). The isthmus is considered as a sperm reservoir in bovine, a section of the oviduct where the capacitation is believed to occur (20). Thus, it is possible that the low levels of Cu,ZnSOD and MnSOD are necessary to leave enough superoxide available in order to allow the capacitation to occur.

As mentioned earlier, the SODs dismutate O_2^- to produce H_2O_2 . This H_2O_2 is then metabolized by the glutathione peroxidase family (GPx) or by the catalase (17,18,21). *In vitro*, it was shown that an important quantity of H_2O_2 decreases the motility of bovine spermatozoa (26). This is probably why catalase and total GPx activities that detoxify H_2O_2 in oviductal fluid are very high to counter balance the activity of SODs (17). Moreover, we have detected, the mRNA of the extracellular GPx (eGPx or GPx-3) mainly in the isthmus, known to be a sperm reservoir (17). The GPx-3 is an enzyme that can also counter balance the SODs by detoxifying H_2O_2 in the sperm reservoir.

Previous studies have shown that the corpus luteum or the dominant follicle had an influence on the expression of many genes (4,18,19). Indeed, more than 27 genes were found more expressed in the ipsilateral than in the contralateral oviduct in bovine epithelial cells (4), while the expression of some antioxidant genes like catalase were unaffected (17). However, the latter studies did not include the analysis of SODs protein expression. In the present study, we obtained different results. Indeed, neither the corpus luteum nor the dominant follicle appeared to affect Cu,ZnSOD protein expression during the estrous cycle. This result is in accordance with our previous study that showed no difference in Cu,ZnSOD mRNA expression between the ipsilateral and the contralateral oviducts (17). However, we found a significant difference in MnSOD protein expression between the ipsilateral and contralateral oviducts, specifically during the luteal stage. The literature indicates that various hormones can affect MnSOD *in vitro*, the progesterone being one that upregulates MnSOD expression (32). The progesterone is secreted by the corpus luteum and it was shown that the oviduct was exposed to the highest concentration of this hormone during the middle of the estrous cycle and in the ipsilateral oviduct (36).

Thus, our results support the hypothesis of a direct relationship between high MnSOD levels and the proximity of the progesterone production.

Interestingly, the protein expression of Cu,ZnSOD reported here is very similar to the profile of expression of eNOS reported by our earlier studies (19). Indeed, the highest expression for both proteins is in the ampulla during all stages of the estrous cycle. In addition, these proteins are both located in the epithelium nearby gametes. This is of interest, since $O_2^{\cdot -}$ can react with NO, produced by NOS, to generate a strong oxidant; the peroxynitrite ($ONOO^{\cdot -}$) (12). Thus, Cu,ZnSOD could protect against the formation of toxic $ONOO^{\cdot -}$, which was already detected *in vivo* as nitrotyrosine residues along the oviduct (19).

In summary, our results revealed that both, Cu,ZnSOD and MnSOD are specifically regulated along the oviduct during the estrous cycle of the cow. The direct or indirect actions of hormonal variations during the estrous cycle influenced the expression of both SODs. In general, levels of SODs increased from the isthmus to the ampulla, and towards the end of the estrous cycle. The proximity of the corpus luteum appeared to positively affect the expression of MnSOD during the luteal phase. The regulation of the SODs can directly affects the $O_2^{\cdot -}$ levels and hence, its role on sperm capacitation and hyperactivation processes. Moreover, because of the interaction of $O_2^{\cdot -}$ with other ROS like NO and H_2O_2 , the SODs are on the first line of control of both, physiological and deleterious effects of ROS in reproductive events.

2.7 Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC grant #238570-02 to J.-F.B.). J.-F. B. is the recipient of a Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Institute of Aging, New Investigators award. M.R. is the recipient of a scholarship from Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).

2.8 References

1. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3: 28.
2. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989;41: 183-197.
3. Arosh JA, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2002;67: 161-169.
4. Bauersachs S, Blum H, Mallok S, Wenigerkind H, Rief S, Prella K, Wolf E. Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. *Biol Reprod* 2003;68: 1170-1177.
5. Blondin P, Coenen K, Sirard MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 1997;18: 454-460.
6. Breque C, Surai P, Brillard JP. Antioxidant status of the lower oviduct in the chicken varies with age and dietary vitamin E supplementation. *Mol Reprod Dev* 2006;73: 1045-1051.
7. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999;37: 949-962.
8. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997;2: 48-54.
9. El Mouatassim S, Guerin P, Menezo Y. Mammalian oviduct and protection against free oxygen radicals: expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;89: 1-6.
10. Ellington JE. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet* 1991;81: 313-328.
11. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975;44: 147-159.

12. Hemnani T, Parihar MS. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J Physiol Pharmacol* 1998;42: 440-452.
13. Ho YS, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, Hutz RJ. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1998;273: 7765-7769.
14. Kavanaugh JF, Grippo AA, Killian GJ. Cannulation of the bovine ampullary and isthmic oviduct. *J Invest Surg* 1992;5: 11-17.
15. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000;74: 1200-1207.
16. Killian GJ. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83: 141-153.
17. Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2003;68: 1157-1164.
18. Lapointe J, Kimmins S, Maclaren LA, Bilodeau JF. Estrogen selectively up-regulates the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the oviducts. *Endocrinology* 2005;146: 2583-2592.
19. Lapointe J, Roy M, St-Pierre I, Kimmins S, Gauvreau D, MacLaren LA, Bilodeau JF. Hormonal and spatial regulation of nitric oxide synthases (NOS) (neuronal NOS, inducible NOS, and endothelial NOS) in the oviducts. *Endocrinology* 2006;147: 5600-5610.
20. Lefebvre R, Chenoweth PJ, Drost M, LeClear CT, MacCubbin M, Dutton JT, Suarez SS. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biol Reprod* 1995;53: 1066-1074.
21. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999;4: D339-345.

22. Menezo Y, Guerin P. [Gamete and embryo protection against oxidative stress during medically assisted reproduction]. *Bull Acad Natl Med* 2005;189: 715-726; discussion 726-718.
23. Nomura T, Sasaki J, Mori H, Sato EF, Watanabe S, Kanda S, Matsuura J, Watanabe H, Inoue M. Expression of manganese superoxide dismutase mRNA in reproductive organs during the ovulatory process and the estrous cycle of the rat. *Histochem Cell Biol* 1996;105: 1-6.
24. O'Flaherty C, Beorlegui N, Beconi MT. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int J Androl* 2003;26: 109-114.
25. O'Flaherty C, Breininger E, Beorlegui N, Beconi MT. Acrosome reaction in bovine spermatozoa: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. *Biochim Biophys Acta* 2005;1726: 96-101.
26. O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 1999;52: 289-301.
27. Ozawa M, Nagai T, Fahrudin M, Karja NW, Kaneko H, Noguchi J, Ohnuma K, Kikuchi K. Addition of glutathione or thioredoxin to culture medium reduces intracellular redox status of porcine IVM/IVF embryos, resulting in improved development to the blastocyst stage. *Mol Reprod Dev* 2006;73: 998-1007.
28. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 1989;40: 1020-1025.
29. Riley JC, Behrman HR. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991;198: 781-791.
30. Sengoku K, Tamate K, Yoshida T, Takaoka Y, Miyamoto T, Ishikawa M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1998;69: 522-527.
31. Suarez SS. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol Reprod* 1987;36: 203-210.

32. Sugino N, Karube-Harada A, Kashida S, Takiguchi S, Kato H. Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone withdrawal in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2002;8: 68-74.
33. Talbot P, Geiske C, Knoll M. Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Mol Biol Cell* 1999;10: 5-8.
34. Tamate K, Sengoku K, Ishikawa M. The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube. *J Obstet Gynaecol* 1995;21: 401-409.
35. Velez-Pardo C, Morales AT, Del Rio MJ, Olivera-Angel M. Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kappaB and p53 activation in bovine embryos. *Theriogenology* 2007;67: 1285-1296.
36. Wijayagunawardane MP, Miyamoto A, Cerbito WA, Acosta TJ, Takagi M, Sato K. Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology* 1998;49: 607-618.
37. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu,Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002;33: 337-349.

2.9 Figure legends

Figure 1: Cu,ZnSOD, MnSOD protein levels in the isthmus (I), isthmic-ampullary junction (I-A) and ampulla (A) at the postovulatory (d 0-3), luteal (d 10-16) and follicular (d 18-21) stages of the estrous cycle from the ipsilateral and the contralateral oviducts. (C): positive control. The β -actin is the loading control. The results shown are one representative experiment out of five.

Figure 2: Cu,ZnSOD and MnSOD protein expression in the oviduct segments at all stages of the estrous cycle. The protein levels were determined by western analysis followed by a densitometry analysis. The expression of Cu,ZnSOD and MnSOD in the isthmus (\square), isthmic-ampullary junction (\square) and ampulla (\blacksquare) of the oviduct at the postovulatory (d 0-3), luteal (d 10-15) and follicular (d 18-21) stages of the estrous cycle from the ipsilateral (A,C) and contralateral (B,D) oviducts. Data are mean \pm SEM of five animals for each estrous cycle time (one pair of oviduct per animal). The results significantly different are represented by different letters ($P < 0.05$), Trends are also shown ($P < 0.1$).

Figure 3: Specific Cu,ZnSOD protein expression analysis at all stages of the estrous cycle. The protein levels were determined by western analysis followed by a densitometry analysis. The expression of Cu,ZnSOD was in the whole oviduct (A and B) at each stage of the estrous cycle in the ipsilateral (A) and contralateral (B) oviducts. The expression of Cu,ZnSOD (C and D) at the postovulatory (\square), luteal (\square) and follicular (\blacksquare) stages of the estrous cycle in the isthmus, isthmic-ampullary junction and ampulla of the oviduct from the ipsilateral (C) and contralateral (D) oviducts. Data are mean \pm SEM of five animals for each estrous cycle time (one pair of oviduct per animal). The results significantly different are represented by different letters ($P < 0.05$). Trends are also shown ($P < 0.1$).

Figure 4: Cu,ZnSOD and MnSOD protein expression in the ipsilateral and the contralateral oviducts at all stages of the estrous cycle. The protein levels were determined by western analysis followed by a densitometry analysis. The expression of Cu,ZnSOD (A) and MnSOD (B) in the whole oviduct at the postovulatory (d 0-3), luteal (d 10-16) and follicular (d 18-21) stages of the estrous cycle from the ipsilateral (□) and contralateral (■) oviducts. Data are mean \pm SEM of five animals for each estrous cycle time (one pair of oviduct per animal). The results significantly different are represented by different letters ($P < 0.05$). Trends are also shown ($P < 0.1$).

Figure 5: Immunolocalization of Cu,ZnSOD and MnSOD in the different sections of the bovine oviduct. Three animals were analyzed at each stage of the estrous cycle. Since no difference in relative staining was observed throughout the estrous cycle, only the three sections are shown. The red color represents the positive results. The counterstain is the Mayer's hematoxylin. Final magnification x 200 and x 400.

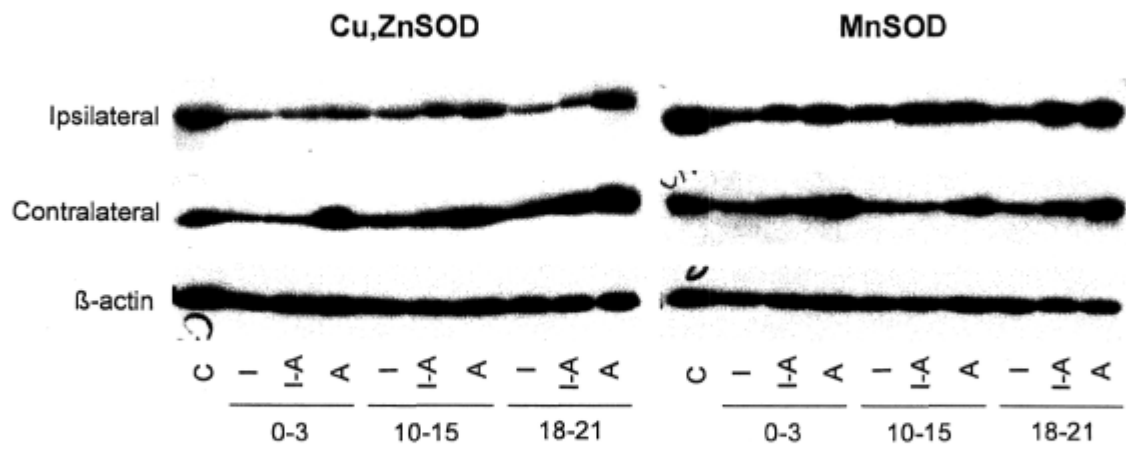


Figure 1
Roy et al.

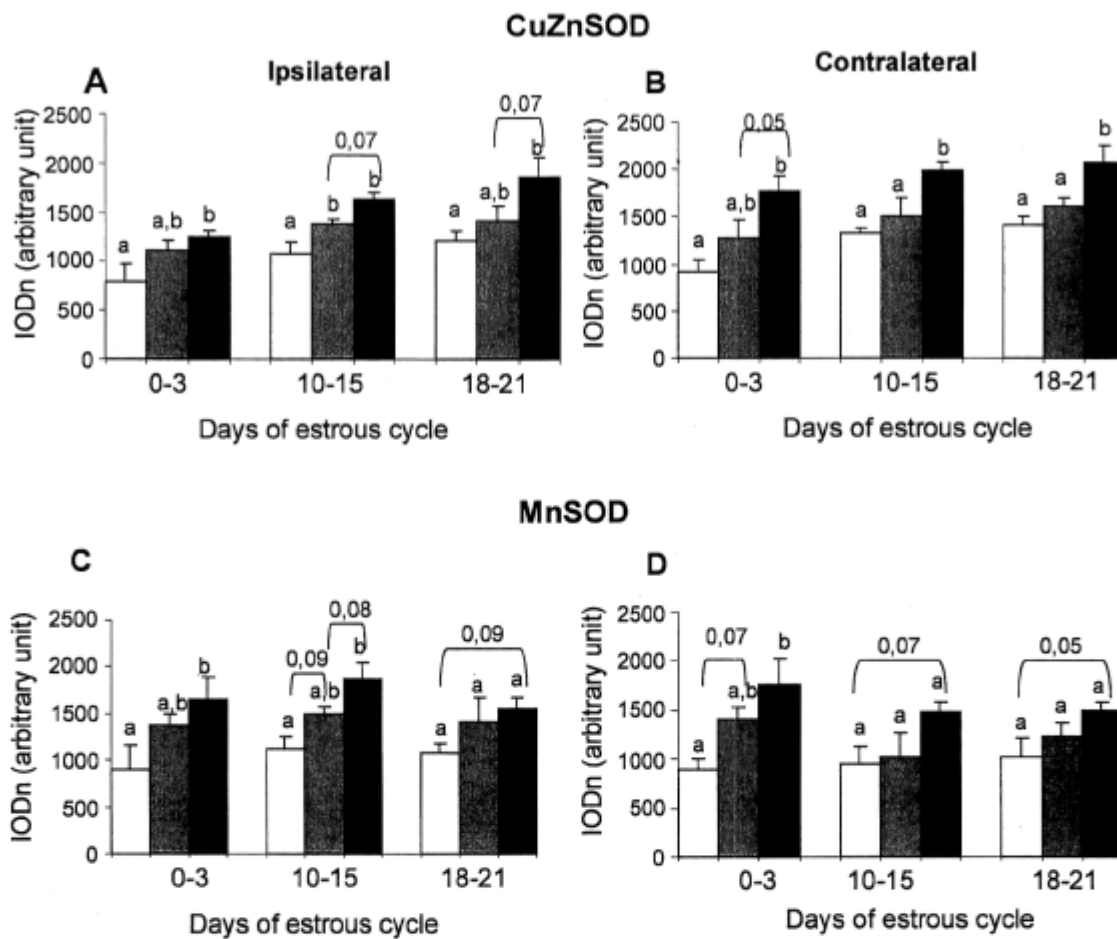


Figure 2

Roy et al.

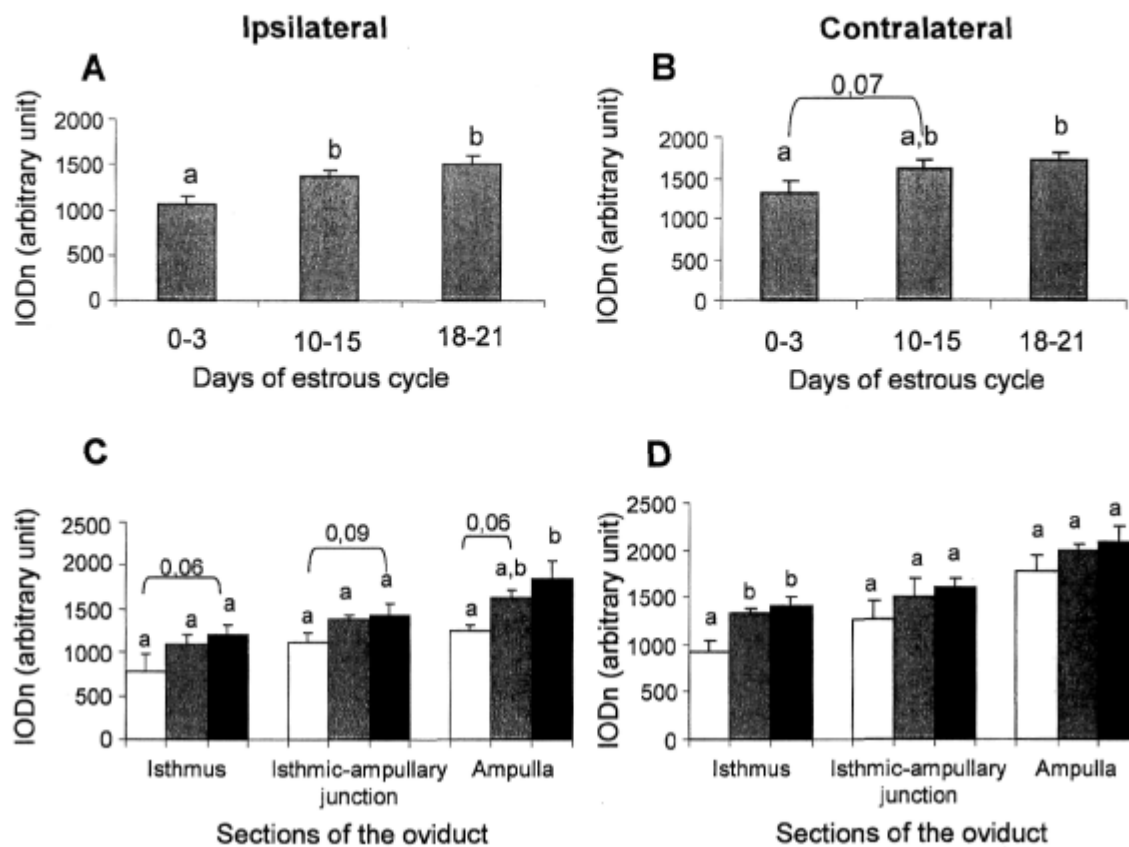


Figure 3

Roy et al.

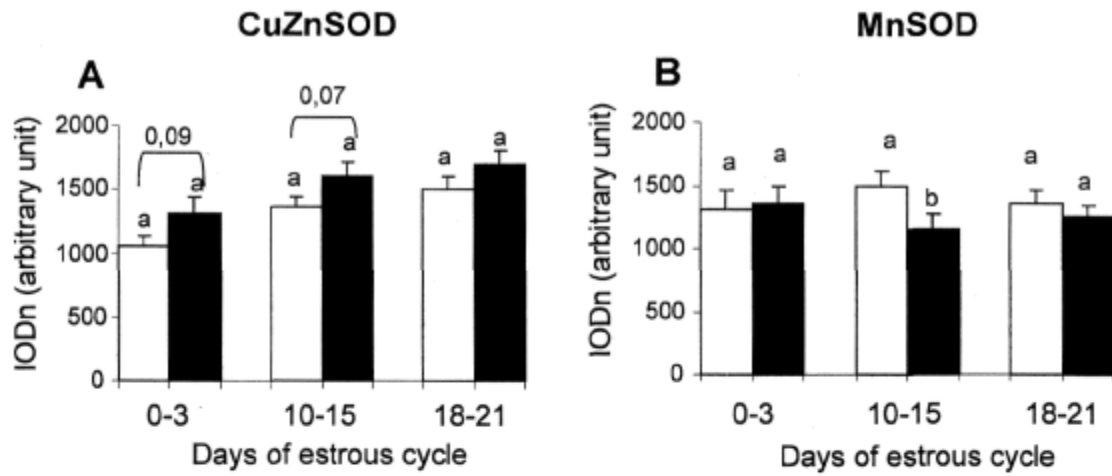


Figure 4

Roy et al.

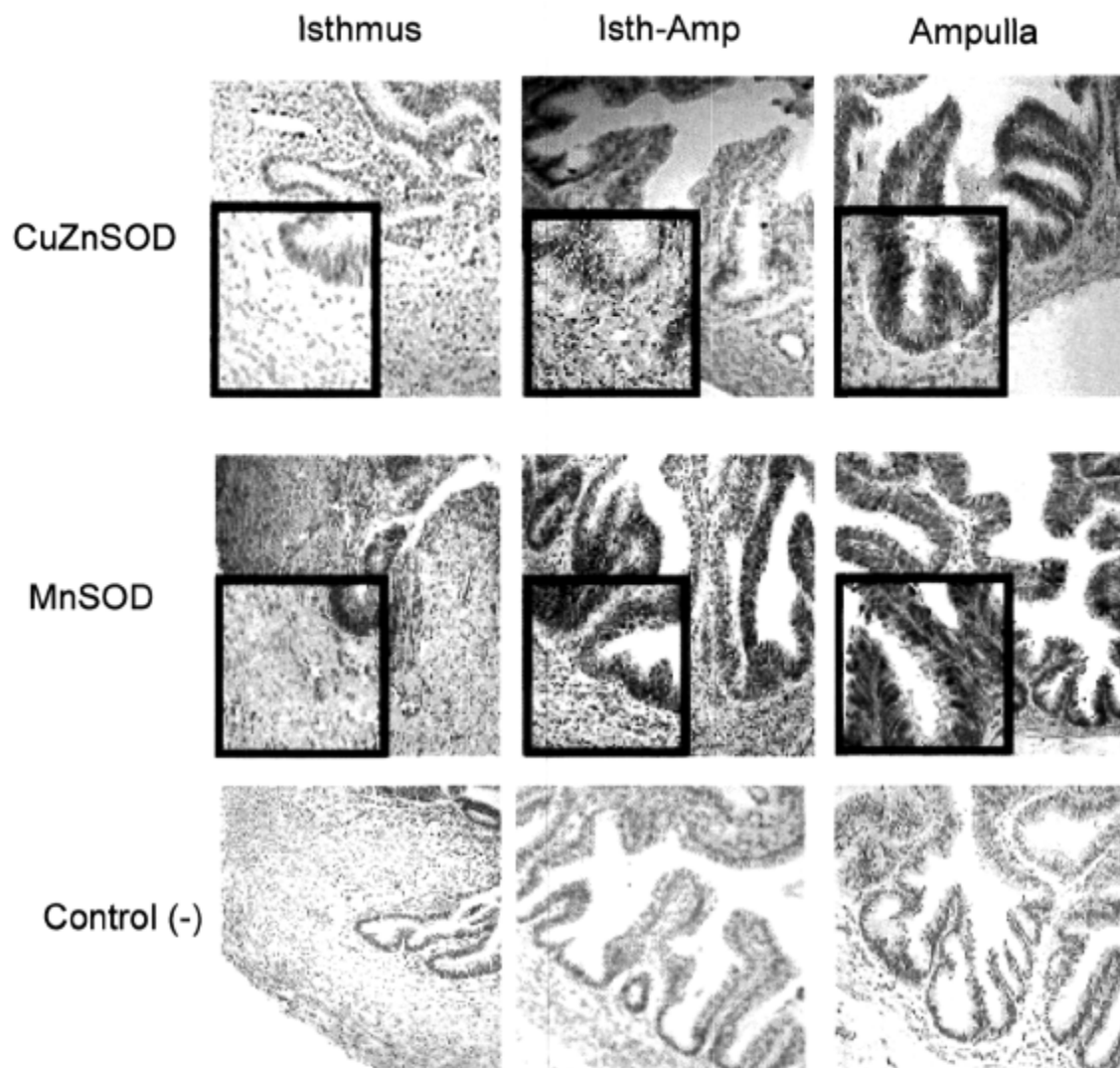


Figure 5

Roy et al.

Chapitre 3 : Conclusion générale

Les ROS et les antioxydants sont essentiels à la reproduction [12, 48]. Certains événements nécessitent une présence accrue de ROS, alors que d'autres ont plutôt besoin d'antioxydants. L'équilibre entre les antioxydants et les ROS est donc un élément clé dans le succès de la reproduction. De plus, il a été démontré que les différentes formes de superoxyde dismutases (Cu,ZnSOD, MnSOD et EC-SOD) ainsi que les ROS qu'elles neutralisent ($O_2^{\cdot-}$) et produisent (H_2O_2) font partis des modulateurs des processus reproductifs [75, 85, 101, 118]. Étant donné que l'oviducte est le site de plusieurs événements de la reproduction telles que la maturation finale des gamètes, la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire, il est fort probable que les SOD y jouent des rôles capitaux (chapitre 2) [7]. Ce concept est renforcé par la découverte de MnSOD et Cu,ZnSOD dans l'oviducte ou le fluide de l'oviducte de l'humain, la souris et le lapin [77, 84, 85, 97].

À la lumière des différentes connaissances sur les SOD en reproduction, nous avons poursuivi l'analyse des superoxyde dismutases dans l'oviducte bovin et ce, afin d'analyser leur régulation. Nous avons démontré que c'est dans la section de l'isthme que l'on retrouve la plus petite quantité de Cu,ZnSOD et de MnSOD. Nous avons obtenu ce résultat aussi bien durant la phase post-ovulatoire que durant les phases lutéales et folliculaires du cycle oestral. Ce résultat est très intéressant puisque cette section de l'oviducte est un réservoir de spermatozoïdes chez le bovin. C'est d'ailleurs à cet endroit que se produit la capacitation des spermatozoïdes, étape essentielle à la fécondation [30]. Ce résultat est en accord avec des études *in vitro* qui ont démontré, chez le bovin, que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), ROS neutralisé par les SOD, joue un rôle dans la capacitation de spermatozoïdes cryoconservés [36, 101]. Alors, une baisse de l'expression protéique de la Cu,ZnSOD et de la MnSOD augmente la quantité d' $O_2^{\cdot-}$ dismuté, lequel peut alors permettre la capacitation. De plus, ces résultats sont supportés par une autre de nos études qui démontre que, dans le fluide de l'oviducte, l'activité totale de SOD est diminuée dans l'isthme par rapport à l'ampoule au début et à la fin du cycle oestral [83].

Des études effectuées dans notre laboratoire ont révélé que, dans l'oviducte bovin, l'expression de certains gènes pouvait varier durant le cycle oestral [22, 23, 83]. Dans la présente étude, nous avons démontré que la forme protéique de la Cu,ZnSOD ne faisait pas exception. En effet, autant dans l'oviducte situé du même côté que l'ovulation que celui situé du côté opposé, on note une plus faible expression de la Cu,ZnSOD au début du cycle oestral. Ceci a été obtenu lorsque l'organe a été considéré dans son entier. Il s'agit d'un résultat très intéressant puisqu'il a été démontré que la Cu,ZnSOD a des effets négatifs sur les différents événements qui se produisent à ce moment du cycle oestral tels que l'ovulation ainsi que la sécrétion de LH et d'oestrogène. En effet, la Cu,ZnSOD affecte négativement la sécrétion de LH chez la brebis. Al-Gubory et Locatelli (1999) ont démontré une réduction de la quantité de LH plasmatique après l'injection de la Cu,ZnSOD bovine dans le cerveau des brebis, lesquelles avaient préalablement subi une ovariectomie [141]. De plus, cette équipe suggère que la Cu,ZnSOD n'a pas besoin d'être originaire du cerveau pour avoir cette influence. En effet, il serait possible que la Cu,ZnSOD puisse se rendre au niveau du site de régulation de la sécrétion des gonadotrophines [142]. Dans les cellules de granulosa du rat, il a été démontré, *in vitro*, que la Cu,ZnSOD avait un impact négatif sur la production d'oestrogène [143]. Finalement, c'est chez le lapin que la Cu,ZnSOD s'est avérée être nuisible à l'ovulation puisqu'*in vitro*, c'est-à-dire lorsque l'ovulation est induite par l'hCG, l'injection de la Cu,ZnSOD dans l'ovaire a atténué la capacité à ovuler [128]. Étant donné que tout le système reproducteur semble être interrelié, entre autre, via leur circulation sanguine [7], il est possible, à la lumière des résultats obtenus des expériences précédemment décrites, que la Cu,ZnSOD de l'oviducte ait un effet indirect sur la régulation de la fonction de l'ovaire et sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. En effet, le pic de LH, hormone nécessaire à l'ovulation, est dû à la sécrétion d'oestrogène produit par l'ovaire, lequel peut être intimement relié à l'oviducte via leur système vasculaire [3, 7].

Concernant la MnSOD, il n'y a pas eu de fluctuation de l'expression de sa forme protéique durant le cycle oestral. Ce résultat s'est avéré le même pour les oviductes ipsilatéraux et contralatéraux ainsi que pour tous les segments de cet organe. Ce résultat ne signifie probablement pas que la MnSOD est peu importante dans l'oviducte. Ce résultat

peut simplement être expliqué par le fait que la MnSOD n'a pas besoin de varier durant le cycle oestral pour jouer son rôle d'antioxydant au niveau des mitochondries.

Afin de caractériser complètement l'expression de la Cu,ZnSOD et de la MnSOD dans l'oviducte bovin, nous avons analysé si la proximité du corps jaune et/ou du follicule dominant pouvait influencer l'expression de ces deux formes de superoxyde dismutases. Nos résultats démontrent que la Cu,ZnSOD ne semble pas être influencée par l'une ou l'autre de ces structures présentes dans l'ovaire. En effet, la forme protéique de la Cu,ZnSOD ne varie pas entre les côtés ipsilatéraux et contralatéraux de l'oviducte bovin. Il est d'ailleurs intéressant de noter que, lors de l'étude de l'ARNm de la Cu,ZnSOD, dans notre laboratoire, le même résultat avait été obtenu [83]. Par contre, ce n'est pas le même patron d'expression qui a été observé pour la MnSOD. En effet, durant la phase lutéale, des quantités plus importantes de la MnSOD ont été détectées du côté ipsilatéral. Cette expression différentielle peut être due à la forte sécrétion de progestérone à ce stade du cycle oestral [6]. En effet, il a été démontré, *in vitro*, que la MnSOD est plus exprimée suite à une exposition à la progestérone [144]. De plus, il est connu que c'est au milieu du cycle oestral, dans l'oviducte proximal du corps jaune, lequel est responsable de la sécrétion de progestérone, que l'on retrouve le plus de progestérone [43]. Alors, il est possible que la progestérone soit responsable de l'augmentation de l'expression protéique de la MnSOD dans l'oviducte ipsilatéral durant la phase lutéale *in vivo*.

Nous avons poursuivi notre analyse au niveau cellulaire afin de déterminer les types cellulaires qui expriment les Cu,ZnSOD et MnSOD. Tous les types cellulaires expriment les deux formes de SOD, mais à des niveaux différents lorsqu'on analyse les différentes parties de l'oviducte. Il est d'ailleurs intéressant de noter que, dans l'ampoule, c'est dans les cellules épithéliales qu'on retrouve le plus de MnSOD et Cu,ZnSOD. En effet, cette section de l'oviducte est caractérisée par une activité sécrétoire élevée associée avec une quantité de fluide élevée, lequel provient, entre autre, des sécrétions de l'épithélium [7, 20]. Cette dernière information nous amène à supposer, que même s'il ne s'agit pas de la forme extracellulaire de la SOD, grâce à leur localisation cellulaire épithéliale dans l'ampoule, la MnSOD et la Cu,ZnSOD sont potentiellement sécrétées de façon apocrine. Il s'agit donc d'une hypothèse qui serait intéressante à vérifier. Concernant les deux autres sections de

l'oviducte (isthme et jonction isthme-ampoule) la MnSOD et la Cu,ZnSOD sont également détectées dans l'épithélium. Alors, bien qu'elles ne soient pas plus exprimées dans ce type cellulaire que dans les autres, leur détection à cet endroit suggère quand même qu'elles peuvent empêcher que les gamètes présents dans l'oviducte soient endommagés par les ROS. De plus, il semble que l'oviducte bovin soit plus protégé que celui de d'autres espèces animales. En effet, bien que chez l'humain la MnSOD et la Cu,ZnSOD soient présentes dans l'épithélium de l'isthme, c'est uniquement la MnSOD qui est exprimée de façon considérable dans les cellules épithéliales de l'ampoule [77]. De plus, l'ARNm de la MnSOD n'a pas été trouvé dans l'épithélium de l'oviducte du rat [110].

Tel que décrit précédemment, les SOD génèrent du H_2O_2 lorsqu'elles neutralisent $O_2^{\cdot-}$. Ensuite, les GPx et les catalases vont à leur tour neutraliser ce H_2O_2 . Le patron d'expression des GPx et des catalases, préalablement étudiées dans notre laboratoire, a été comparé avec le patron des SOD. Les résultats de cette comparaison démontrent des concordances entre l'expression de la Cu,ZnSOD et de la MnSOD avec au moins une GPx (GPx-1 et GPx-3) et/ou les catalases et ce, autant dans les sections de l'oviducte que durant le cycle oestral [77]. De plus, l'expression protéique de la Cu,ZnSOD suit celle d'un autre gène exprimé dans l'oviducte bovin : la eNOS (oxyde nitrique synthase endothéliale) [22]. La eNOS produit le NO, un ROS. Alors, en dismutant $O_2^{\cdot-}$, la Cu,ZnSOD empêche que ce dernier réagisse avec le NO, ce qui produirait le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$), un ROS très réactif et délétère [51]. Alors, la similarité des patrons d'expression de la Cu,ZnSOD et de la MnSOD avec ceux de d'autres antioxydants et/ou pro-oxydants suggère que l'oviducte bovin a un système de contrôle du statut redox élaboré qui travaille en synergie.

Les résultats que nous venons de décrire sont ceux du chapitre 2. Notre étude ne s'est cependant pas limitée à la caractérisation de la forme cytosolique et mitochondriale de la superoxyde dismutase. En effet, nous avons également tenté de caractériser la forme extracellulaire de la superoxyde dismutase (EC-SOD). Les résultats de ces analyses ne se retrouvent pas dans l'article, mais plutôt dans l'annexe I, car nous n'avons pas encore eu de résultats concluants. En effet, en immunobuvardage, nous avons toujours obtenu deux bandes, l'une de la hauteur désirée et une autre de hauteur légèrement différente (annexe I, I.1). Ce résultat n'était pas uniquement présent dans les échantillons d'oviductes, mais

également dans l'utérus bovin, tissus où la EC-SOD a été détectée chez l'humain [145]. Trois anticorps ont été testés et dans les trois cas, il y avait deux bandes qui apparaissaient et ce, peu importe qu'elle était la hauteur prévue. Les anticorps ont été conçus pour reconnaître la EC-SOD chez la souris et/ou l'humain, car, au moment de l'étude, il n'existait pas d'anticorps dirigé contre le bovin. Étant donné que les anticorps n'étaient pas créés pour reconnaître spécifiquement la EC-SOD chez le bovin, nous ne pouvons pas conclure à la présence de la EC-SOD chez le bovin. Alors, des études supplémentaires telles que le séquençage des deux bandes seront nécessaires pour poursuivre l'étude de la forme protéique de la EC-SOD dans l'oviducte bovin, si elle existe.

Nous avons concentré notre étude exclusivement sur les formes protéiques des SOD, mais puisque nous n'avons pas pu caractériser celle de la EC-SOD, nous avons tenté de détecter l'ARNm de la EC-SOD (Annexe I, I.2). Par contre, nous n'avons pas pu révéler la présence de la EC-SOD dans l'oviducte bovin. En effet, au moment de l'étude, la séquence de la EC-SOD était uniquement prédite (Annexe I, I.2). Cela ne nous a toutefois pas empêché de tenter de faire l'analyse à partir de cette séquence prédite. Malgré les huit paires d'amorces élaborées à partir de cette séquence prédite ainsi qu'à partir des régions conservées des séquences de cinq espèces animales (humain, souris, rat, lapin et bovin prédite), nous n'avons pas pu, par PCR quantitatif en temps réel, étudier l'ARNm de la EC-SOD chez le bovin. En effet, le séquençage des produits amplifiés a révélé qu'il ne s'agissait jamais de l'ARNm de la EC-SOD bovin. Alors, nous en sommes venus à la conclusion que l'étude de l'ARNm de la EC-SOD pourra être réalisée uniquement avec la séquence véritable et non avec celle prédite.

En conclusion, les patrons spatio-temporels des formes protéiques de la Cu,ZnSOD et de la MnSOD suggèrent que ces antioxydants et les ROS qu'ils neutralisent et produisent sont potentiellement très importants dans l'oviducte bovin en ayant une influence sur les fonctions jouées par cet organe. En effet, de grandes quantités d'antioxydants ne sont pas toujours souhaitables tout au long du cycle oestral et dans toutes les sections de l'oviducte. Il en est de même pour les ROS. Alors, notre étude suggère que les patrons d'expression de la Cu,ZnSOD et de la MnSOD sont régulés de façon à permettre qu'il y ait des niveaux

adéquats d'antioxydants et de ROS pour chacune des étapes de la reproduction. Notre étude a aussi contribué à mettre en lumière la régulation fine des ROS par les antioxydants. Ce contrôle permet de réguler des événements physiologiques en reproduction, donc d'assurer le succès reproducteur. Ceci contraste avec le rôle des antioxydants dans le stress oxydatif impliqué dans les maladies où une production de ROS à de fortes concentrations est alors retrouvée. Il serait donc maintenant intéressant de valider les différentes hypothèses soulevées par nos résultats obtenus. Par exemple, vérifier si, *in vivo*, les hormones sont reliées à l'expression des SOD. De plus, la poursuite des études sur EC-SOD est très importante, car cette forme de SOD pourrait avoir des influences capitales sur les rôles joués par l'oviducte. Pour ce faire, tel que précédemment décrit, la réalisation de nouvelles techniques dont, entre autre, le séquençage des bandes obtenues par immunobuvarde sera nécessaire à la poursuite de cette étude.

Bibliographie

1. R Parker, C Mathis: Reproductive Tract Anatomy and Physiology of the Cow. 2003
http://www.cahe.nmsu.edu/pubs/_b/b-212.pdf
2. U Muglia, PM Motta: A new morpho-functional classification of the Fallopian tube based on its three-dimensional myoarchitecture. *Histol Histopathol* 2001, 16:227-37.
3. RT Duby, RW Prange: Physiology and endocrinology of the estrous cycle. 2003.
<http://www.wvu.edu/~exten/infores/pubs/livepoul/dirm2.pdf>
4. OJ Ginther, L Knopf, JP Kastelic: Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 1989, 87:223-30.
5. JD Savio, L Keenan, MP Boland, JF Roche: Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 1988, 83:663-71.
6. JC Whittier: Reproductive Anatomy and Physiology of the Cow. 1993.
<http://extension.missouri.edu/xplor/agguides/ansci/g02015.htm>
7. JE Ellington: The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet* 1991, 81:313-28.
8. J Lapointe: Caractérisation de l'expression des enzymes impliquées dans le contrôle du statut redox de l'oviducte chez le bovin. Ste-Foy: Université Laval; 2005.
9. JL Yaniz, F Lopez-Gatius, P Santolaria, KJ Mullins: Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat Rec* 2000, 260:268-78.
10. S Hugentobler, DG Morris, MT Kane, JM Sreenan: In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology* 2004, 61:1419-27.
11. J Brundin: Distribution and function of adrenergic nerves in the rabbit fallopian tube. *Acta Physiol Scand Suppl* 1965, 259:1-57.
12. P Guerin, S El Mouatassim, Y Menezo: Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001, 7:175-89.
13. DH Maas, BT Storey, L Mastroianni, Jr.: Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril* 1976, 27:1312-7.
14. B Fischer, BD Bavister: Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 1993, 99:673-9.
15. SL Stone, CD Hamner: Biochemistry and physiology of oviductal secretions. *Gynecol Invest* 1975, 6:234-52.
16. GJ Killian: Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 2004, 82-83:141-53.
17. E Ehrenwald, RH Foote, JE Parks: Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 1990, 25:195-204.
18. GJ Killian, DA Chapman, JF Kavanaugh, DR Deaver, HB Wiggin: Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1989, 86:419-26.
19. P Holm, H Callesen: In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev* 1998, 38:579-94.

20. JF Kavanaugh, AA Grippo, GJ Killian: Cannulation of the bovine ampullary and isthmic oviduct. *J Invest Surg* 1992, 5:11-7.
21. S Bauersachs, H Blum, S Mallok, H Wenigerkind, S Rief, K Prella, E Wolf: Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. *Biol Reprod* 2003, 68:1170-7.
22. J Lapointe, M Roy, I St-Pierre, S Kimmins, D Gauvreau, LA MacLaren, JF Bilodeau: Hormonal and spatial regulation of nitric oxide synthases (NOS) (neuronal NOS, inducible NOS, and endothelial NOS) in the oviducts. *Endocrinology* 2006, 147:5600-10.
23. J Lapointe, S Kimmins, LA Maclaren, JF Bilodeau: Estrogen selectively up-regulates the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the oviducts. *Endocrinology* 2005, 146:2583-92.
24. JE Ellington, DH Schlafer: Uterine tube disease in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1993, 202:450-4.
25. P Talbot, C Geiske, M Knoll: Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Mol Biol Cell* 1999, 10:5-8.
26. PF Ceccaldi, F Carre-Pigeon, Y Youinou, B Delepine, PE Bryckaert, G Harika, C Quereux, D Gaillard: [Kartagener's syndrome and infertility: observation, diagnosis and treatment]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2004, 33:192-4.
27. A Abu-Musa, A Nassar, I Usta: In vitro fertilization in two patients with Kartagener's syndrome and infertility. *Gynecol Obstet Invest* 2008, 65:29-31.
28. TK Lin, RK Lee, JT Su, WY Liu, MH Lin, YM Hwu: A successful pregnancy with in vitro fertilization and embryo transfer in an infertile woman with Kartagener's syndrome: a case report. *J Assist Reprod Genet* 1998, 15:625-7.
29. RJ Blandau: Comparative aspects of tubal anatomy and physiology as they relate to reconstructive procedures. *J Reprod Med* 1978, 21:7-15.
30. R Lefebvre, PJ Chenoweth, M Drost, CT LeClear, M MacCubbin, JT Dutton, SS Suarez: Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biol Reprod* 1995, 53:1066-74.
31. SS Suarez: Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* 2002, 37:140-3.
32. R Talevi, R Gualtieri: In vivo versus in vitro fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004, 115 Suppl 1:S68-71.
33. R Lefebvre, MC Lo, SS Suarez: Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol Reprod* 1997, 56:1198-204.
34. SH Anderson, GJ Killian: Effect of macromolecules from oviductal conditioned medium on bovine sperm motion and capacitation. *Biol Reprod* 1994, 51:795-9.
35. PM Wassarman, L Jovine, ES Litscher: A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* 2001, 3:E59-64.
36. C O'Flaherty, N Beorlegui, MT Beconi: Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int J Androl* 2003, 26:109-14.
37. RS King, GJ Killian: Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. *Biol Reprod* 1994, 51:34-42.
38. RS King, SH Anderson, GJ Killian: Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* 1994, 15:468-78.

39. NS Martus, HG Verhage, PA Mavrogianis, JK Thibodeaux: Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *J Reprod Fertil* 1998, 113:323-9.
40. CC Wegner, GJ Killian: In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 1991, 29:77-84.
41. F Gandolfi: Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells. *Microsc Res Tech* 1995, 32:1-12.
42. MP Wijayagunawardane, WA Cerbito, A Miyamoto, TJ Acosta, M Takagi, K Miyazawa, K Sato: Oviductal progesterone concentration and its spatial distribution in cyclic and early pregnant cows. *Theriogenology* 1996, 46:1149-58.
43. MP Wijayagunawardane, A Miyamoto, WA Cerbito, TJ Acosta, M Takagi, K Sato: Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology* 1998, 49:607-18.
44. SE Ulbrich, A Kettler, R Einspanier: Expression and localization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003, 84:279-89.
45. KC Reinhart, RK Dubey, B Cometti, PJ Keller, M Rosselli: Differential effects of natural and environmental estrogens on endothelin synthesis in bovine oviduct cells. *Biol Reprod* 2003, 68:1430-6.
46. T Hemnani, MS Parihar: Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J Physiol Pharmacol* 1998, 42:440-52.
47. K Datta, S Sinha, P Chattopadhyay: Reactive oxygen species in health and disease. *Natl Med J India* 2000, 13:304-10.
48. JC Riley, HR Behrman: Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991, 198:781-91.
49. BP Yu: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994, 74:139-62.
50. JM Mates: Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000, 153:83-104.
51. A Korkmaz, H Yaren, T Topal, S Oter: Molecular targets against mustard toxicity: implication of cell surface receptors, peroxy-nitrite production, and PARP activation. *Arch Toxicol* 2006, 80:662-70.
52. JA Leopold, J Loscalzo: Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:1332-40.
53. Y Menezo, P Guerin: [Gamete and embryo protection against oxidative stress during medically assisted reproduction]. *Bull Acad Natl Med* 2005, 189:715-26; discussion 726-8.
54. J Chaudiere, R Ferrari-Iliou: Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999, 37:949-62.
55. J Fujii, Y Iuchi, F Okada: Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 2005, 3:43.
56. R Miesel, PJ Drzejczak, M Kurpisz: Oxidative stress during the interaction of gametes. *Biol Reprod* 1993, 49:918-23.
57. JS Beckman, WH Koppenol: Nitric oxide, superoxide, and peroxy-nitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996, 271:C1424-37.

58. ER Stadtman, RL Levine: Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003, 25:207-18.
59. P Karihtala, Y Soini: Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis* 2007, 115:81-103.
60. A Agarwal, SS Allamaneni: Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2004, 9:338-47.
61. Ö Blokhina, E Virolainen, KV Fagerstedt: Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 2003, 91 Spec No:179-94.
62. S Lapointe, C Legare, C Gaudreault, R Sullivan, MA Sirard: cDNA sequence and deduced amino acid sequence of bovine oviductal fluid catalase. *Mol Reprod Dev* 1998, 51:265-73.
63. CL Fatman, LM Schaefer, TD Oury: Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003, 35:236-256.
64. IN Zelko, TJ Mariani, RJ Folz: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002, 33:337-49.
65. JM Mates, F Sanchez-Jimenez: Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999, 4:D339-45.
66. NB Ghyselinck, JP Dufaure: A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res* 1990, 18:7144.
67. VC Culotta, M Yang, TV O'Halloran: Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1763:747-58.
68. EF Sato, H Kobuchi, K Edashige, M Takahashi, T Yoshioka, K Utsumi, M Inoue: Dynamic aspects of ovarian superoxide dismutase isozymes during the ovulatory process in the rat. *FEBS Lett* 1992, 303:121-5.
69. I Fridovich: Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1986, 247:1-11.
70. I Fridovich: Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975, 44:147-59.
71. SL Marklund: Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 1984, 222:649-55.
72. O Elroy-Stein, Y Bernstein, Y Groner: Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *Embo J* 1986, 5:615-22.
73. YS Ho, JL Magnenat, M Gargano, J Cao: The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect* 1998, 106 Suppl 5:1219-28.
74. MM Matzuk, L Dionne, Q Guo, TR Kumar, RM Lebovitz: Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology* 1998, 139:4008-11.
75. YS Ho, M Gargano, J Cao, RT Bronson, I Heimler, RJ Hutz: Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1998, 273:7765-9.
76. S El Mouatassim, P Guerin, Y Menezo: Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol Hum Reprod* 1999, 5:720-5.
77. K Tamate, K Sengoku, M Ishikawa: The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube. *J Obstet Gynaecol* 1995, 21:401-9.

78. T Suzuki, N Sugino, T Fukaya, S Sugiyama, T Uda, R Takaya, A Yajima, H Sasano: Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Fertil Steril* 1999, 72:720-6.
79. PD Cetica, LN Pintos, GC Dalvit, MT Beconi: Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life* 2001, 51:57-64.
80. JF Bilodeau, S Chatterjee, MA Sirard, C Gagnon: Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000, 55:282-8.
81. R Peeker, L Abramsson, SL Marklund: Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997, 3:1061-6.
82. SJ Nair, AS Brar, CS Ahuja, SP Sangha, KC Chaudhary: A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim Reprod Sci* 2006, 96:21-9.
83. J Lapointe, JF Bilodeau: Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2003, 68:1157-64.
84. S El Mouatassim, P Guerin, Y Menezo: Mammalian oviduct and protection against free oxygen radicals: expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000, 89:1-6.
85. Y Noda, H Matsumoto, Y Umaoka, K Tatsumi, J Kishi, T Mori: Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 1991, 28:356-60.
86. N Sugino, S Takiguchi, S Kashida, A Karube, Y Nakamura, H Kato: Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000, 6:19-25.
87. N Sugino: The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. *Placenta* 2007, 28 Suppl A:S133-6.
88. AS Lequarre, JM Feugang, O Malhomme, I Donnay, A Massip, F Dessy, A Van Langendonck: Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture. *Mol Reprod Dev* 2001, 58:45-53.
89. H Tatemoto, N Muto, I Sunagawa, A Shinjo, T Nakada: Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol Reprod* 2004, 71:1150-7.
90. KE Valdez, SP Cuneo, AM Turzillo: Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. *Reproduction* 2005, 130:71-81.
91. P Lonergan, A Gutierrez-Adan, D Rizos, B Pintado, J de la Fuente, MP Boland: Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev* 2003, 66:297-305.
92. J Kasapovic, S Pejic, M Mladenovic, N Radlovic, SB Pajovic: Superoxide dismutase activity in colostrum, transitional and mature human milk. *Turk J Pediatr* 2005, 47:343-7.
93. M Shiotani, Y Noda, K Narimoto, K Imai, T Mori, K Fujimoto, K Ogawa: Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. *Hum Reprod* 1991, 6:1349-53.

94. GC Luvoni, L Keskinetepe, BG Brackett: Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Dev* 1996, 43:437-43.
95. P Blondin, K Coenen, MA Sirard: The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 1997, 18:454-60.
96. S Dinara, K Sengoku, K Tamate, M Horikawa, M Ishikawa: Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. *Hum Reprod* 2001, 16:1976-81.
97. YS Chun, JH Kim, HT Lee, KS Chung: Effect of superoxide dismutase on the development of preimplantation mouse embryos. *Theriogenology* 1994, 41:511-20.
98. F Berlinguer, S Ledda, I Rosati, L Bogliolo, G Leoni, S Naitana: Superoxide dismutase affects the viability of thawed European mouflon (*Ovis g. musimon*) semen and the heterologous fertilization using both IVF and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev* 2003, 15:19-25.
99. T Nonogaki, Y Noda, K Narimoto, Y Umaoka, T Mori: Effects of superoxide dismutase on mouse in vitro fertilization and embryo culture system. *J Assist Reprod Genet* 1992, 9:274-80.
100. AA Ali, JF Bilodeau, MA Sirard: Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 2003, 59:939-49.
101. CM O'Flaherty, NB Beorlegui, MT Beconi: Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 1999, 52:289-301.
102. H Zhang, RL Zheng: Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. *Free Radic Res* 1996, 24:261-8.
103. C O'Flaherty, E Breininger, N Beorlegui, MT Beconi: Acrosome reaction in bovine spermatozoa: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1726:96-101.
104. C O'Flaherty, M Beconi, N Beorlegui: Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 1997, 29:269-75.
105. S Shull, NH Heintz, M Periasamy, M Manohar, YM Janssen, JP Marsh, BT Mossman: Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 1991, 266:24398-403.
106. M Gorecki, Y Beck, JR Hartman, M Fischer, L Weiss, Z Tochner, S Slavin, A Nimrod: Recombinant human superoxide dismutases: production and potential therapeutical uses. *Free Radic Res Commun* 1991, 12-13 Pt 1:401-10.
107. Le grand dictionnaire terminologique. Office québécois de la langue français; 2000. <http://www.granddictionnaire.com>
108. Y Li, TT Huang, EJ Carlson, S Melov, PC Ursell, JL Olson, LJ Noble, MP Yoshimura, C Berger, PH Chan, et al: Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995, 11:376-81.
109. RM Lebovitz, H Zhang, H Vogel, J Cartwright, Jr., L Dionne, N Lu, S Huang, MM Matzuk: Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:9782-7.

110. T Nomura, J Sasaki, H Mori, EF Sato, S Watanabe, S Kanda, J Matsuura, H Watanabe, M Inoue: Expression of manganese superoxide dismutase mRNA in reproductive organs during the ovulatory process and the estrous cycle of the rat. *Histochem Cell Biol* 1996, 105:1-6.
111. I Raineri, EJ Carlson, R Gacayan, S Carra, TD Oberley, TT Huang, CJ Epstein: Strain-dependent high-level expression of a transgene for manganese superoxide dismutase is associated with growth retardation and decreased fertility. *Free Radic Biol Med* 2001, 31:1018-30.
112. M Yamamoto, H Hara, T Adachi: Nitric oxide and its decomposed derivatives decrease the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett* 2001, 505:296-300.
113. ED Levin, TC Brady, EC Hochrein, TD Oury, LM Jonsson, SL Marklund, JD Crapo: Molecular manipulations of extracellular superoxide dismutase: functional importance for learning. *Behav Genet* 1998, 28:381-90.
114. J Sandstrom, K Karlsson, T Edlund, SL Marklund: Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human plasma and tissues. *Biochem J* 1993, 294 (Pt 3):853-7.
115. KA Boggess, TD Oury, HH Kay, JD Crapo: Extracellular superoxide dismutase localization and activity within the human placenta. *Placenta* 1998, 19:417-22.
116. LM Carlsson, J Jonsson, T Edlund, SL Marklund: Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:6264-8.
117. SR Lee, MO Kim, SH Kim, BS Kim, DH Yoo, YS Park, YB Park, JH Ha, ZY Ryoo: Effect of conditioned medium of mouse embryonic fibroblasts produced from EC-SOD transgenic mice in nuclear maturation of canine oocytes in vitro. *Anim Reprod Sci* 2007, 99:106-16.
118. TJ Bivalacqua, JS Armstrong, J Biggerstaff, AB Abdel-Mageed, PJ Kadowitz, WJ Hellstrom, HC Champion: Gene transfer of extracellular SOD to the penis reduces O₂-* and improves erectile function in aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 284:H1408-21.
119. A Agarwal, S Gupta, RK Sharma: Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005, 3:28.
120. HR Behrman, PH Kodaman, SL Preston, S Gao: Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 2001, 8:S40-2.
121. M Takami, SL Preston, VA Toyloy, HR Behrman: Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol* 1999, 276:E684-8.
122. H Tatamoto, N Sakurai, N Muto: Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 2000, 63:805-10.
123. HR Behrman, SL Preston: Luteolytic actions of peroxide in rat ovarian cells. *Endocrinology* 1989, 124:2895-900.
124. E de Lamirande, C Gagnon: Reactive oxygen species (ROS) and reproduction. *Adv Exp Med Biol* 1994, 366:185-97.
125. E Gatzuli, RF Aten, HR Behrman: Inhibition of gonadotropin action and progesterone synthesis by xanthine oxidase in rat luteal cells. *Endocrinology* 1991, 128:2253-8.

126. T Nakamura, T Ishigami, N Makino, K Sakamoto: The down-regulation of glutathione peroxidase causes bovine luteal cell apoptosis during structural luteolysis. *J Biochem (Tokyo)* 2001, 129:937-42.
127. M Sawada, JC Carlson: Intracellular regulation of progesterone secretion by the superoxide radical in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 1996, 137:1580-4.
128. T Miyazaki, K Sueoka, AM Dharmarajan, SJ Atlas, GB Bulkley, EE Wallach: Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fertil* 1991, 91:207-12.
129. JG Alvarez, BT Storey: Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1984, 30:833-41.
130. N Kemal Duru, M Morshedi, S Oehninger: Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000, 74:1200-7.
131. E de Lamirande, H Jiang, A Zini, H Kodama, C Gagnon: Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997, 2:48-54.
132. A Agarwal, S Gupta, R Sharma: Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online* 2005, 11:641-50.
133. K Sengoku, K Tamate, T Yoshida, Y Takaoka, T Miyamoto, M Ishikawa: Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1998, 69:522-7.
134. PC Rodriguez, CM O'Flaherty, MT Beconi, NB Beorlegui: Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim Reprod Sci* 2005, 85:231-42.
135. PC Hsu, CC Hsu, YL Guo: Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the zona pellucida. *Toxicology* 1999, 139:93-101.
136. RJ Aitken, JS Clarkson, S Fishel: Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989, 41:183-97.
137. H Kodama, Y Kuribayashi, C Gagnon: Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl* 1996, 17:151-7.
138. C Velez-Pardo, AT Morales, MJ Del Rio, M Olivera-Angel: Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kappaB and p53 activation in bovine embryos. *Theriogenology* 2007, 67:1285-96.
139. PA Dennery: Role of redox in fetal development and neonatal diseases. *Antioxid Redox Signal* 2004, 6:147-53.
140. JF Bilodeau, CA Hubel: Current concepts in the use of antioxidants for the treatment of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can* 2003, 25:742-50.
141. KH Al-Gubory, A Locatelli: Intracerebroventricular administration of copper-zinc superoxide dismutase inhibits pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes. *Neurosci Lett* 1999, 272:159-62.
142. KH Al-Gubory, JC Huet, JC Pernollet, J Martal, A Locatelli: Corpus luteum derived copper, zinc-superoxide dismutase serves as a luteinizing hormone-release inhibiting factor in sheep. *Mol Cell Endocrinol* 2003, 199:1-9.
143. PS LaPolt, LS Hong: Inhibitory effects of superoxide dismutase and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate on estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1995, 136:5533-9.

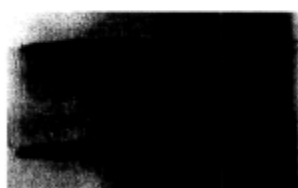
144. N Sugino, A Karube-Harada, S Kashida, S Takiguchi, H Kato: Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone withdrawal in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2002, 8:68-74.
145. SL Marklund: Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 1984, 74:1398-403.

Annexe I : Résultats préliminaires de l'étude sur la superoxyde dismutase extracellulaire (EC-SOD) dans l'oviducte bovin

I.1 Immunobuvardage

35KDa

26KDa



Utérus

Oviducte

Figure I.1 : Expression de la forme protéique de la EC-SOD dans l'oviducte et l'utérus bovin. Le résultat a été obtenu par la technique d'immunobuvardage telle que décrite dans le chapitre 2 (Roy et al., accepté dans *Theriogenology*). Étant donné que la méthodologie est la même que celle expliquée dans cet article, elle ne sera pas décrite une nouvelle fois. La seule particularité est les dilutions de l'anticorps primaire, soit 1/1000, 1/2000, 1/2500 et 1/4000. Trois anticorps ont été testés soit deux de Stressgen (San Diego, CA, USA) et un de Cedarlane (Hornby, Ontario, Canada). Ces anticorps reconnaissent la séquence N-terminale de la EC-SOD chez l'humain et/ou la souris. Ce résultat est représentatif des résultats obtenus pour les trois anticorps, c'est-à-dire qu'il y a toujours eu présence de deux bandes, dont seulement une était de la hauteur prédite et dans ce cas-ci, il s'agissait de la bande à 26 KDa. Alors, il n'est pas possible d'assurer avec certitude à quelle bande correspond la EC-SOD chez le bovin.

I.2 PCR quantitatif en temps réel

Tableau I.1 : Caractéristiques des huit paires d'amorces utilisées pour étudier l'ARNm de la EC-SOD dans l'oviducte bovin.

Paires d'amorces	Longueur (bases)	Température d'appariement (T_m) (°C)	Longueur du fragment amplifié (pb)
5'-TCTGTGGTCCTGGTGGCCTATG-3' 5'-GGCGTTACCGTTCTCCAGACTG-3'	22 22	70 70	585
5'-CCAACACGGAGGAGCAGATC-3' 5'-GCGTTACCGTTCTCCAGACTG-3'	20 21	68 68	529
5'-TGCTCTGTGCCTCTGTGGTC-3' 5'-GCGTTACCGTTCTCCAGACTG	20 21	68 68	594
5'-CCAAGGTGACGGAGATCTG-3' 5'-TACCGTTCTCCAGACTGGC-3'	19 19	66 66	492
5'-CTTCTTCCACCTTGAGGG-3' 5'-GCTTTACACTCGCTCTCG-3'	18 18	64 64	432
5'-AACACGGAGGAGCAGATC-3' 5'-CTCAAGGTGGAAGAAGGC-3'	18 18	64 64	188
5'-CATCCACGTGCACCAGTTTG-3' 5'-GCGTTACCGTTCTCCAGATCG-3'	20 21	66 68	267
5'-GGCCTTCTTCCACCTTGAG-3' 5'-GAGCGGTACTIONCCAGACCTC-3'	19 20	66 66	201

La technique de PCR quantitatif a été réalisée telle que décrite dans l'annexe III (Lapointe et al., 2006) avec différentes dilutions de l'ADNc. Les amorces ont été synthétisées à partir de la séquence prédite du gène de la EC-SOD chez le bovin et des régions conservées de cette séquence et de celles de la EC-SOD de quatre autres espèces animales (lapin, rat, humain, souris). Le séquençage des produits amplifiés par ces amorces a été fait et aucune de ces amorces n'a pu amplifier la EC-SOD bovin dans les contrôles positifs testés (utérus et poumon bovin). L'étude de l'ARNm s'est donc arrêtée avec ces résultats.

Annexe II : Lettre d'acceptation de la revue Theriogenology pour l'article : Superoxide dismutases (SODs) expression in the bovine oviduct during the estrous cycle

Ms. Ref. No.: THERIO-D-07-00434

Title: Superoxide dismutases (SODs) expression in the bovine oviduct during the estrous cycle

Theriogenology

Dear Dr. Bilodeau,

I am pleased to inform you that your paper, "Superoxide dismutases (SODs) expression in the bovine oviduct during the estrous cycle", has been found acceptable for publication in *Theriogenology*, provided you are ready to consider the modifications detailed in the Reviewers' comments included below.

When revising this paper, please prepare a letter responding to the individual comments made by each reviewer. Please indicate, on a point-by-point basis, how you responded to each comment made by the reviewers (or offer a brief rebuttal if you chose to not make the requested change). Identify by number the specific criticisms of the reviewers and explain how they have been answered. It is important that all concerns of the reviewers be addressed completely.

Please remove any previous version of your manuscript and adhere strictly to journal format following the Instructions in the Guide for Authors

Your electronic submission should include the following:

1. A cover letter with responses to the reviewers' comments and editorial comments
2. A nonhighlighted ("clean") copy of your revised manuscript. Put "revised" in the upper-right-hand corner of the first page of the manuscript.
3. A clearly highlighted copy of your revised manuscript. Put "revised highlighted" in the upper-right-hand corner of the first page of the manuscript.

Please refer to the *Theriogenology* pages on the Elsevier website (www.elsevier.com) for additional information regarding journal style. Also, feel free to contact me if you require further information. Please return the revised manuscript at your earliest convenience, and certainly within 45-90 days.

To submit your revision, please go to <http://ees.elsevier.com/therio/> and login as an Author.

Your username is: JBILODEAU

Your password is: *****

On your Main Menu page is a folder entitled "Submissions Needing Revision". You will find your submission record there.

Thank you for submitting your work to this journal.

Sincerely,

John P. Kastelic, DVM, PhD

Co-Editor-in-Chief
Theriogenology

Annexe III : Régulation spatiale et hormonale des oxyde nitrique synthases (NOS) (NOS neuronale, NOS inductible et NOS endothéliale) dans les oviductes

Hormonal and spatial regulation of nitric oxide synthases (NOS) (neuronal NOS, inducible NOS, and endothelial NOS) in the oviducts.

J Lapointe, M Roy, I St-Pierre, S Kimmins, D Gauvreau, LA MacLaren, JF Bilodeau.
Endocrinology 2006, 147:5600-10.

III.1 Résumé

L'oxyde nitrique (NO) est un radical libre produit par les oxyde nitrique synthases (NOS) qui est reconnu pour être impliqué dans plusieurs fonctions reproductrices chez les mammifères. D'ailleurs, plusieurs évidences indiquent que le NO peut influencer une grande quantité d'évènements reproducteurs qui se déroulent dans l'oviducte comme la maturation des gamètes, la fécondation ainsi que dans le développement précoce et le transport de l'embryon. Dans cette étude, nous avons procédé à la caractérisation de l'expression de nNOS, iNOS et eNOS dans les différentes régions de l'oviducte bovin durant le cycle oestral. Les résultats de PCR quantitatif en temps réel montre que les NOS sont sous régulation hormonale et qu'elles varient entre les sections de l'oviducte durant le cycle oestral. Fait intéressant, ces enzymes sont majoritairement exprimées durant la période péri-ovulatoire et nous avons aussi observé que chaque NOS possède un patron d'expression cellulaire spécifique le long de l'oviducte. De plus, l'expression de l'enzyme iNOS est spécifiquement régulée par l'estradiol. Ces résultats suggèrent donc que les niveaux de NO sont finement régulés dans l'oviducte bovin et que chaque NOS semble avoir un rôle spécifique à jouer dans les fonctions physiologiques de cet organe *in vivo*.

Hormonal and Spatial Regulation of Nitric Oxide Synthases (NOS) (Neuronal NOS, Inducible NOS, and Endothelial NOS) in the Oviducts

J erome Lapointe, Monica Roy, Isabelle St-Pierre, Sarah Kimmins, Danny Gauvreau, Leslie A. MacLaren, and Jean-François Bilodeau

Unité de Recherche en Ontogénie et Reproduction (J.L., M.R., I.S.-P., D.G., J.-F.B.), Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval, and Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction (J.L., M.R., I.S.-P., D.G., J.-F.B.), Université Laval, Québec, Canada G1V 4G2; Department of Plant and Animal Sciences (S.K., L.A.M.), Nova Scotia Agricultural College, Truro, Nova Scotia, Canada B2N 5E3; and Département d'Obst trique et Gyn cologie (J.-F.B.), Faculté de M decine, Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4

Nitric oxide (NO) is a free radical produced by the action of NO synthases (NOS) and is known to be involved in the regulation of many reproductive events that occur in the oviducts. The oviducts are highly specialized organs that play crucial roles in reproduction by providing an optimal environment for the final maturation of gametes, fertilization, and early embryo development. In this study, we analyzed the expression, hormonal regulation, and cellular distribution of neuronal, inducible, and endothelial NOS in different bovine oviduct segments to better understand the roles played by these enzymes in oviductal functions *in vivo*. Quantitative RT-PCR analysis revealed that NOS isoforms are hormonally regulated and differentially expressed along the oviduct throughout the estrous cycle. All NOS were highly expressed around the time of

estrus, and immunohistochemistry studies determined that neuronal NOS, inducible NOS (iNOS), and endothelial NOS are differentially distributed in cells along the oviduct. Interestingly, our results showed that estradiol selectively up-regulates iNOS expression in the oviduct during the periovulatory period corresponding to the window of ovulation, oocyte transport, and fertilization. The resulting NO production by this high-output NOS may be of crucial importance for reproductive events that occur in the oviduct. This study provided the first demonstration that NO production is hormonally regulated in the mammalian oviducts *in vivo*. Our results suggest that neuronal NOS, iNOS, and endothelial NOS contribute to oviductal functions in a timely and site-specific manner. (*Endocrinology* 147: 5600–5610, 2006)

NITRIC OXIDE (NO) is a free radical gas synthesized from L-arginine by NO synthase (NOS), a family of three different enzyme isoforms encoded by three distinct genes (1). These isoforms are neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), and endothelial NOS (eNOS) (2–4). Both nNOS and eNOS are present in many cell types and activated by calcium and calmodulin. Although these two enzymes were initially considered as constitutively expressed, it is now established that the expression of nNOS and eNOS can be regulated at the transcriptional level under various conditions (5). The third isoform, iNOS, is a calcium-independent enzyme known to be expressed in macrophages, smooth muscle cells, monocytes, endothelial cells, neurons, and hepatocytes (6, 7). In these cells, iNOS expression can be induced by immunostimulatory cytokines, oxidative stress and bacterial products (8, 9).

NO freely diffuses through the membranes and acts as an intracellular and extracellular biological messenger in a variety of physiological processes such as host defense, neuronal communication, and regulation of vascular tone (10–12). In addition to this wide range of physiological actions,

NO has also been implicated in the regulation of mammalian reproduction (13–16). Moreover, male mice deficient in neuronal NOS are infertile and ejaculatory abnormalities were observed in mice lacking the gene for eNOS (15, 17). NO also mediates many female reproductive functions in mammals and appears to be a major paracrine regulator of various female reproductive processes such as gonadotrophin secretion, ovulation, corpus luteum regression, implantation, embryonic development, uterine contractility, cervical ripening, and parturition (14, 18–20). All three NOS isoforms have been detected alone or in combination in the vaginal, cervical, placental, and uterine tissues of many species (21–24). eNOS knockout mice have reduced numbers of ovulated oocytes after superovulation and abnormal estrous cycle length (25, 26). Reduced fertility is also observed in knockout female mice lacking both eNOS and iNOS isoforms (27). Additionally, recent experiments provide convincing evidence that nitric oxide can affect all the reproductive events that take place in the oviduct *in vivo* (28–31).

The mammalian oviducts are highly specialized organs that provide the optimal conditions for the gamete maturation, fertilization, and early embryo development (32, 33). Within the oviducts the male and female gametes are transported to the site of fertilization at the isthmic-ampullary junction, followed by embryo transfer to the uterus (34, 35). If one of these oviductal functions is altered, reproductive success is seriously compromised (36, 37). The importance of

First Published Online August 24, 2006

Abbreviations: eNOS, Endothelial NOS; iNOS, inducible NOS; nNOS, neuronal NOS; NO, nitric oxide; NOS, NO synthase.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

NO has been linked to essential oviduct functions. NO was first implicated in oocyte maturation because severe maturation defects were observed in oocytes recovered from the oviducts of rats treated with NOS inhibitors (30). Interestingly, it was reported that low concentration of NO was beneficial to the maintenance of sperm viability and the induction of sperm capacitation in several species (13, 38). Moreover, several studies revealed that the binding of sperm to the zona pellucida and gametes fusion are promoted by low levels of NO and blocked by NOS inhibitors as well as high concentrations of NO-releasing compounds (29, 39–41). Critical concentrations of NO are also required for normal preimplantation embryo development. Deviations from these concentrations lead to developmental arrest of the embryo (31, 42, 43). Other studies indicated that NO is involved in the regulation of oviductal smooth muscle contractions (44–46). It was found that NO plays a role as a relaxing agent in mammalian oviduct and NO inhibition increases tubal motility that results in accelerated ovum transport (47, 48). Thus, it appears that NO production must be tightly regulated in the oviduct to favor the proper condition for gametes maturation, fertilization, early embryonic development, and embryo transfer to the uterus. To date, few studies have reported NOS activity as well as the presence of NOS enzymes in mammalian oviducts (49–51). However, almost nothing is known on NOS expression and distribution in the different segments of the mammalian oviduct. Furthermore, the factors controlling the expression of the different NOS isoforms in the oviduct are not clearly established.

We determined the regulation and distribution of nNOS, iNOS, and eNOS in the oviduct segments during the estrous cycle of the cow. We found a specific expression pattern for each NOS isoforms in the oviduct throughout the estrous cycle. Importantly, our results revealed that estradiol selectively up-regulates iNOS expression in the oviduct *in vivo*. We propose that this specific regulation of the inducible high-output NOS could play important roles in reproductive events that naturally occur in the oviducts during the peri-ovulatory stage.

Materials and Methods

Tissue samples

Oviducts as well as the other bovine tissues analyzed in this study were transported on ice to the laboratory within 4 h of the animal being killed. Animals that showed anomalies of the genital tract were rejected after examination by a veterinarian. The stage of the estrous cycle was defined by postmortem examination of the ovaries (follicle and corpus luteum), and the oviducts were classified into four groups: postovulatory (d 0–3), midluteal (d 10–12), late luteal (d 15–17), and follicular (d 18–20) stages according to the criteria documented by Arosh *et al.* (52). Oviducts ipsilateral and contralateral to the corpus luteum were analyzed separately. During the follicular phase, the contralateral oviduct is the oviduct opposite to the regressing corpus luteum and proximal to the ovary that contains the dominant follicle. We examined ovaries to select the oviducts from cows characterized only by a change of ovulation side between two consecutive estrous cycles. All other cases were excluded. The oviducts were dissected on an ice-cold glass plate to remove blood vessels and cut into three sections (isthmus, isthmico-ampullary junction, and ampulla). The tissues were frozen in liquid nitrogen and kept at -86°C until analysis.

Treatments

All procedures were performed in accordance to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were reviewed and approved by the Nova Scotia Agricultural College Animal Care and Committee. Six healthy, sexually mature mixed-breed beef heifers (1.5–3 yr of age, 520 ± 31 kg body weight) were randomly assigned to control (BSA, $n = 3$) or 17β -estradiol ($n = 3$) intrauterine infusion treatments as previously described by Kimmins *et al.* (53). Briefly, animals were treated midcycle with Estrumate (500 mg cloprostenol; Schering Canada Inc., Pointe-Claire, Québec, Canada) to synchronize estrus. In the morning of d 14 after estrus, each heifer received intrauterine infusions in both horns of BSA (0.1% in saline) or 17β -estradiol (117 ng/dose; Sigma, St. Louis, MO) using 12-gauge Foley catheters (Agtech, Manhattan, KS). At the time of treatment, the horns were gently massaged to ensure distribution to the oviducts. Treatments were delivered five times at 12-h intervals. The animals were slaughtered 7 h after the last treatment on d 16 of the estrous cycle and the oviducts were collected.

Measurement of 17β -estradiol levels in serum

Serum estradiol levels were measured by a gas chromatographic mass spectrometric method developed to measure steroid hormone levels in rat and monkey serum (54). Briefly, 17β -estradiol was extracted from serum by liquid-liquid and solid-phase extraction. Derivatization reactions were performed to improve chromatographic and detection response of the steroids. Unconjugated estradiol was quantified by means of a sensitive gas chromatographic/mass spectrometric method, using chemical ionization.

Preparation of RNA and cDNA

The RNA was extracted using TRIzol as described in the manufacturer's instructions (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Four micrograms of total RNA were reverse transcribed with random hexamer primers and the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). The first-strand cDNA was diluted 20 times in sterile water and used as the template in the quantitative RT-PCR mixture. Ipsilateral and contralateral oviducts were pooled together before RNA extraction to prepare whole oviduct samples.

Quantitative RT-PCR

Sets of specific primers were designed based on known bovine sequences to amplify specific products for nNOS (forward: 5'-gtcattcttgcctctctctcaaac-3'; reverse: 5'-gctgggtcacacggatggtcttg-3'), iNOS (forward: 5'-agcacgggaatgagtctcc-3'; reverse: 5'-cgtcagctggtgagttctg-3'), and eNOS (forward: 5'-ccttcgctaccagccaga-3'; reverse: 5'-cagagatcttcacgcgtggcca-3'). Classical PCRs were first conducted to confirm the specificity of primers. As an internal control, 18S rRNA was amplified using specific primers (forward: 5'-gtaaccggtgaacccatt-3'; reverse: 5'-ccatccaatcggtagtagcg-3'). The expected PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis, eluted, and sequenced (Center of Genomic, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec, Canada). These specific NOS PCR products were serially diluted from 500 pg to 5 fg and used as templates in quantitative RT-PCR to establish the standard curves. The quantitative RT-PCRs were carried out in a LightCycler (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). Reactions were performed in a 20- μl reaction mixture containing either 5 μl diluted cDNA or PCR product, 0.58 μM of each primer, 3 mM of MgCl_2 , 2 μl of FastStart Master SYBRGreen I mix (Roche Diagnostics), and PCR-grade water up to the final volume. The RT-PCRs were performed as follows: denaturation at 95°C for 10 min followed by 45 cycles of amplification (95°C for 0 sec, annealing temperature for 5 sec, and 72°C for 20 sec) with single acquisition of fluorescence at the end of extension step. The annealing temperatures for each gene were: nNOS (66°C); iNOS (63°C); eNOS (67°C); and 18S (58°C). After amplification, the samples were slowly heated at $0.1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ from 60°C to 95°C with continuous reading of fluorescence to obtain a melting curve. The specificity of each amplicon was then determined by using the melting curve analysis program of the LightCycler software. The amplicon of each NOS and 18S showed only one peak in the analysis. The specificity of the amplified products was confirmed by agarose gel electrophoresis. The quantification analysis of

the data were performed by using the LightCycler analysis software as previously described (55). Relative gene expression was expressed as a ratio of target gene concentration to 18S rRNA. All total RNA samples were reverse transcribed twice. Each cDNA was quantified in duplicate and the average value of each sample was used for quantification.

Western analysis

Protein samples (50 μ g) from isthmus, isthmus-ampullary junction and ampulla sections were boiled in Laemmli's sample buffer containing 5% (vol/vol) of 2-mercaptoethanol for 10 min and loaded (50 μ g of protein per track) on 10% polyacrylamide gels, blotted, and processed as previously described using rabbit polyclonal antirat nNOS (Abcam, Cambridge, MA), rabbit polyclonal antimouse iNOS (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada), mouse monoclonal antibovine eNOS (Stressgen, San Diego, CA), and polyclonal rabbit antinitrotyrosine (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) (56). All the antibodies for NOS isoforms were known to cross-react with the corresponding bovine protein. Isthmus, isthmus-ampullary junction and ampulla sections from five different specimens were analyzed for NOS expression at each phase of the estrous cycle.

Immunohistochemistry

Oviduct segments were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, embedded in optimum cutting temperature medium, frozen in liquid nitrogen, and stored at -86°C (Canemco, St. Laurent, Québec, Canada). Cryosections of 8 μ m were prepared from frozen oviductal tissues using a cryotome (Shandon, Pittsburgh, PA). Immunohistochemical detection of each NOS isoform was performed using Vectastain Elite ABC kit according to the manufacturer's protocols (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Endogenous peroxidase activity was first inactivated with 3% H_2O_2 (vol/vol) in methanol for 30 min. Nonspecific binding sites were then blocked with 10% goat serum (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) in PBS for 1 h at room temperature. Incubation with the primary NOS antibody was performed overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. Antibodies used were rabbit polyclonal antirat nNOS (Abcam), rabbit polyclonal antimouse iNOS (Cedarlane), mouse monoclonal antibovine eNOS (Calbiochem, San Diego, CA), and polyclonal rabbit antinitrotyrosine (Upstate). Each antibody was used at a dilution of 1:400 (vol/vol). Corresponding nonspecific IgGs were used as negative control and processed in parallel. The oviduct cryosections were further washed with PBS and incubated at room temperature with the second antibody (goat anti-rabbit or antimouse IgG biotinylated, 1:200) for 1 h and ABC elite reagent for 30 min. Immunostaining was revealed using 3-amino-9-ethylcarbazole, and sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich).

Three separate experiments were performed on five specimens using eight cryosections per specimen. Because no differences in NOS expression pattern were observed between the different stages of the estrous cycle, we showed only specimens from postovulatory stage. Images were acquired in color directly from the stained tissue with a Axioskop 2 Plus microscope (Zeiss, Toronto, Ontario, Canada) linked to a digital camera using Spot software (Diagnostics Instruments, Sterling Heights, MI). The isthmus and ampulla sections from estradiol-treated and untreated animals were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. The immunohistochemical detection of iNOS was performed as previously described (57). The antibody dilution was 1:200 (vol/vol). Relative quantification of the specific staining was performed by densitometry analysis using Image Pro software (Carsen Medical Scientific, Markham, Ontario, Canada) as previously described (58).

Statistical analysis

Values shown in the text and tables are mean \pm SEM. All data were normally distributed and passed equal variance testing. Model variables included oviduct section (isthmus, isthmus-ampullary junction, and ampulla), oviduct side (ipsilateral vs. contralateral to the corpus luteum), and stage of the estrous cycle (d 0–3, 10–12, 15–17, and 18–20). Main effects of each variable and interactions between these variables were determined. The experiments were analyzed with the general linear model of SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Multiple means were compared by ANOVA, and when a significant effect was obtained,

the difference between means was determined by Duncan multiple range test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The three NOS isoforms (nNOS, iNOS, and eNOS) are expressed in the bovine oviduct

We first used quantitative RT-PCR to detect and measure NOS mRNA expression in the bovine oviduct. The relative abundance of each NOS mRNA in the oviduct in comparison with other tissues is shown in Fig. 1. We found that all NOS isoforms (nNOS, iNOS, and eNOS) were expressed in the oviduct. It was known that nNOS was expressed at a high level in the neuronal connections, and our results revealed that nNOS mRNA expression in the oviducts is similar to the levels found in the liver and the kidney and was five times lower than in the brain (Fig. 1A). Surprisingly, we observed that the inducible NOS was strongly expressed in the oviduct. Indeed, iNOS expression in the oviduct was significantly higher than in the majority of other tissues investigated and attained the levels of expression measured in the heart (Fig. 1B). As expected, our analysis also revealed that eNOS mRNA was present in the oviducts. Of note, eNOS is the only NOS isoform found expressed in the oviduct and uterus to the same extent (Fig. 1C).

The NOS isoforms are differentially expressed throughout the estrous cycle and along the oviduct

To analyze the effect of hormonal status on the expression of the NOS, we first measured NOS mRNA expression at the postovulatory (d 0–3), midluteal (d 10–12), late luteal (d 15–17), and follicular (d 18–20) stages of the estrous cycle by quantitative RT-PCR. Interestingly, we found that all NOS were differentially expressed in the whole oviduct during the estrous cycle (Fig. 2). Indeed, a significant impact of the estrous cycle on nNOS expression was observed. We demonstrated that nNOS expression was highest during the periovulatory period (d 0–3 and 18–20; Fig. 2A).

The highest expression level for iNOS mRNA was observed after ovulation, between d 0 and 3 of the estrous cycle (Fig. 2C). However, in contrast to nNOS, iNOS expression decreased significantly during the luteal phases and remained low at the follicular stages. Furthermore, our results revealed a different expression pattern for eNOS throughout the estrous cycle (Fig. 2E). Indeed, eNOS expression was maximal at the end of the estrous cycle and decreased subsequently to reach its minimal level during the luteal phases.

To further investigate the regional mRNA and protein expression of the three NOS along the oviduct, three equidistant sections of the oviduct were examined at the same four stages of the estrous cycle. Quantitative RT-PCR analysis above revealed that nNOS was highly expressed in the isthmus region of the oviduct at all times of the estrous cycle, but no significant variations were measured (Fig. 2B). However, we observed that the protein level of nNOS was higher in the isthmus during the luteal phase and in the ampulla section during the periovulatory period of the cycle (Fig. 3). In contrast to nNOS, we found that iNOS expression was higher in the ampulla shortly after the ovulation (Fig. 2D).

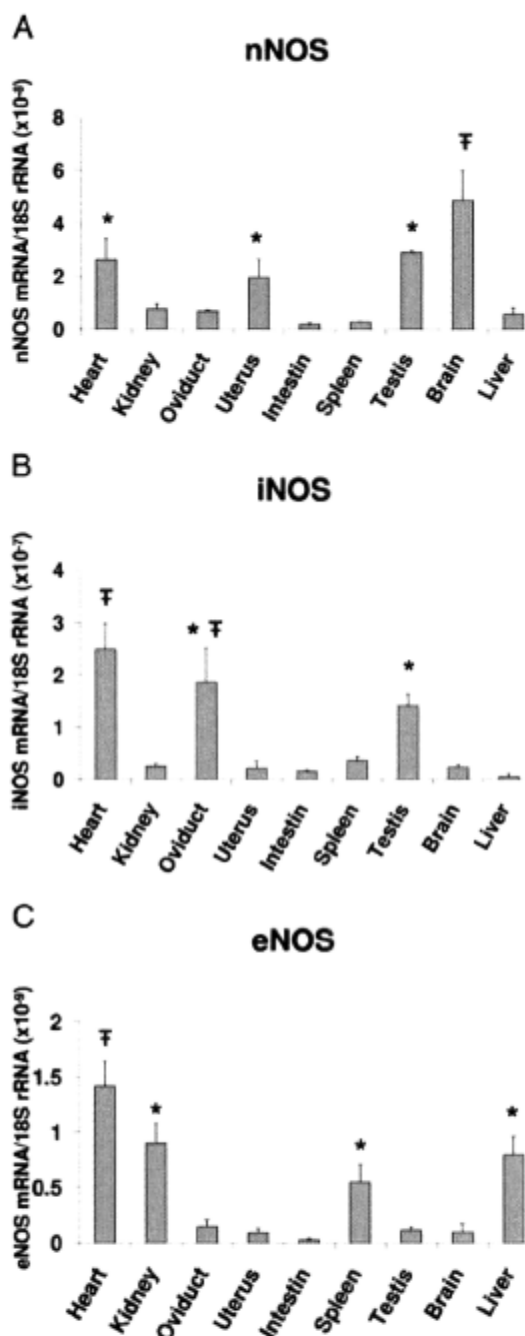


FIG. 1. NOS mRNA expression in bovine oviduct and other tissues. The mRNA levels of nNOS (A), iNOS (B), and eNOS (C) were quantified by real-time quantitative PCR. The 18S rRNA was used as an internal standard and results are expressed as a ratio of NOS to 18S. Oviduct and uterus samples were constituted from a pool of RNA including equal parts of the four stages of the estrous cycle. Data are means \pm SEM of four animals. Means with designation are significantly different at $P < 0.05$ and means with different symbols (*, †) are significantly different from each other (Duncan's test).

During the others stages of the estrous cycle, iNOS mRNA expression was significantly lower in the isthmus region than in the isthmic-ampullary junction and the ampulla segment (Fig. 2D). In accordance with mRNA results, iNOS protein

was highly expressed in the ampulla section during the postovulatory stage of the estrous cycle (Fig. 3). In contrast to iNOS, the expression of eNOS mRNA was 2-fold higher in the isthmus than the ampulla sections. This was observed only during the periovulatory period (Fig. 2F). Furthermore, we found that eNOS protein was mostly expressed in the ampulla during the middle and end of the estrous cycle, which contrast to mRNA expression (Fig. 3).

Cellular distribution of nNOS, iNOS, and eNOS proteins along the oviduct

We localized the cellular expression of the three NOS isoforms along the bovine oviduct using immunohistochemistry. Our analysis revealed specific expression patterns for each NOS protein in the isthmus, the isthmic-ampullary junction, and the ampulla segment of the oviduct. The cellular distribution of nNOS, iNOS, and eNOS in isthmus, isthmic-ampullary junction, and ampulla is consistent throughout the estrous cycle (data not shown). Neuronal NOS protein was observed in oviductal epithelium, lamina propria and smooth muscle cells of all sections (Fig. 4, A–C). In the isthmus, strong staining intensity for nNOS is observed in the thick smooth muscle layer and epithelial cells, whereas the signal was weaker in the lamina propria (Fig. 4A). Although similar nNOS distribution was found in the ampulla, nNOS expression appeared to be more homogenous in the isthmic-ampullary junction of all cryosections investigated (Fig. 4, B and C).

Inducible NOS was mainly detected in the smooth muscle and epithelial cells of the ampulla sections (Fig. 4F). Indeed, only weak iNOS-specific staining was observed in the smooth muscle cells of the isthmic-ampullary junction as well as in the lamina propria of the isthmus (Fig. 4, D and E). Interestingly, we also found that iNOS was principally localized on the luminal surface of the epithelial cells in the ampulla (Fig. 4F).

In Fig. 4, we showed that eNOS cellular distribution varied between the oviduct segments. In the isthmus, eNOS was detected in the epithelial cells as well as the endothelium of blood vessels present in the lamina propria and serosa (Fig. 4G). eNOS was expressed in all oviduct cell types in the isthmic-ampullary junction and ampulla (Fig. 4, H and I).

To gain further insight into NOS functions in the different oviduct segments, nitration of tyrosine residues in oviduct proteins, a marker of NOS biological activity, was evaluated by immunohistochemical staining using antinitrotyrosine antibody. In the isthmus, strong protein nitrotyrosination signal was detected in the smooth muscle layer as well as in the epithelium, whereas weaker signal was seen in the lamina propria (Fig. 4J). In contrast, homogenous staining was observed in all oviduct tissues in the isthmic-ampullary junction (Fig. 4K). In the ampulla segment, specific protein nitrotyrosination staining was also found in all cellular types, but we observed that the epithelial staining was restricted to the luminal surface of the cells like iNOS expression (Fig. 4, L and F). No significant signal was detected with the non-specific IgG in the control sections (Fig. 4, M–O).

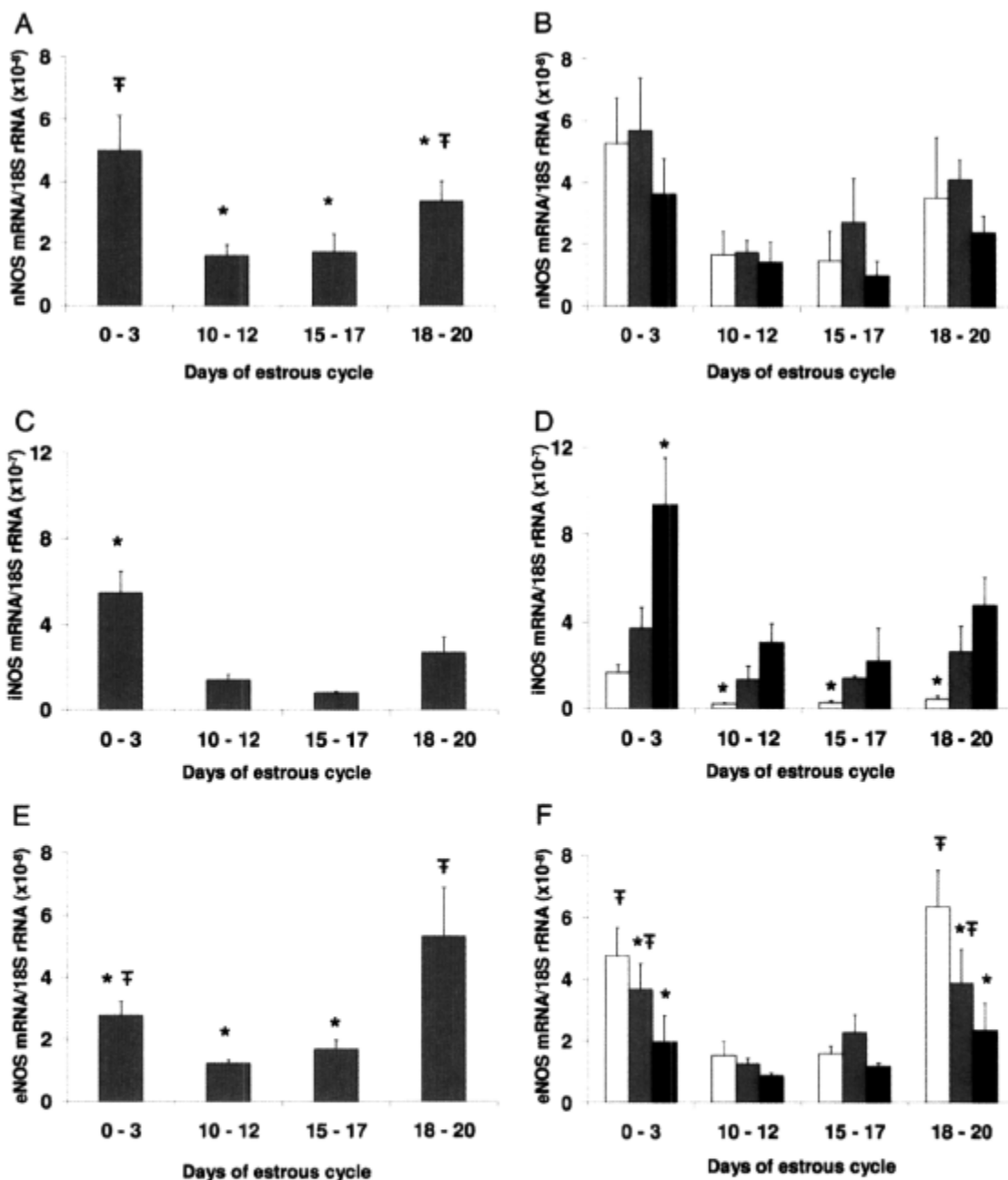


FIG. 2. NOS mRNA expression in the bovine oviduct throughout the estrous cycle. The mRNA levels were measured by real-time quantitative PCR. The 18S rRNA was used as an internal standard and results are expressed as a ratio of nNOS to 18S. A, C, and E, Expression of nNOS, iNOS, and eNOS in the whole oviduct at the postovulatory (d 0–3), midluteal (d 10–12), late luteal (d 15–17), and follicular (d 18–20) stages of the estrous cycle. B, D, and F, nNOS, iNOS, and eNOS expression in the isthmus (□), isthmus-ampullary junction (▨), and ampulla (■) segments of the oviduct at the four stages of the estrous cycle. Data are means \pm SEM of five animals. Means with different designations (*, ∇) are significantly ($P < 0.05$) different from each other (Duncan's test).

Expression of nNOS, iNOS, and eNOS in the ipsilateral and contralateral oviducts during the estrous cycle

To better characterize NOS regulation during the estrous cycle, we analyzed their expression in oviducts ipsilateral and contralateral to the cycling ovary. No significant variation of nNOS and eNOS expression was found between the ipsilateral and contralateral oviducts sections during the es-

trous cycle (Fig. 5, A and C). However, we observed that in the isthmus section, iNOS expression was significantly higher in the oviduct proximal to the dominant follicle during the follicular phase (Fig. 5B). Interestingly, iNOS expression was not modulated between the ipsilateral and contralateral oviducts at the isthmus-ampullary junction and ampulla levels during the estrous cycle (Fig. 5B).

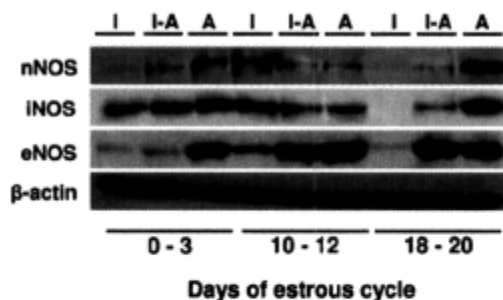


FIG. 3. nNOS, iNOS, and eNOS protein levels in isthmus (I), isthmic-ampullary junction (I-A), and ampulla (A) sections of the oviduct at three stages of the estrous cycle. Immunodetection of nNOS, iNOS, eNOS, and β -actin as loading control at the postovulatory (d 0–3), midluteal (d 10–12), and follicular (d 18–20) stages of the estrous cycle (one representative experiment is shown).

Effects of 17β -estradiol on NOS expression in the oviducts *in vivo*

We previously demonstrated that 17β -estradiol modulates the expression of certain antioxidant genes in the oviduct *in vivo* (55). Because we found in this study that each NOS transcripts are mostly expressed during the periovulatory period estrous cycle, we decided to test the hypothesis that estradiol regulates NOS expression in the bovine oviduct. Thus, heifers were treated with intrauterine infusions of 17β -estradiol or saline control, and we analyzed the mRNA expression levels of nNOS, iNOS, and eNOS in the whole oviduct. The 17β -estradiol levels for saline control animals were 2.46 ± 0.65 pg/ml of plasma. The treatment with estradiol caused a significant increase in circulating levels to 7.94 ± 2.06 pg/ml (mean \pm SEM, $P < 0.05$, bilateral t test, $n = 3$). Our analysis revealed that 17β -estradiol specifically up-regulates iNOS expression in the oviduct. Indeed, iNOS expression was 2-fold higher in the oviducts of cows treated with uterine infusions of 17β -estradiol, whereas no variations were observed for nNOS and eNOS (Fig. 6, A–C). Interestingly, immunohistochemistry analysis also revealed that iNOS protein was up-regulated by estradiol in the isthmus and ampulla sections of oviducts from treated animals (Fig. 7, A–D). Moreover, relative quantification of iNOS-specific staining by densitometry analysis clearly indicated that iNOS protein expression was induced by about 3-fold in both isthmus and ampulla segments.

Discussion

Several *in vitro* and *in vivo* studies showed that nitric oxide is implicated in all the reproductive events that naturally occur in the mammalian oviduct (28, 31, 48, 59). Here we demonstrated that the three NOS were expressed in this specific organ of the female reproductive tract. Importantly, we found that iNOS mRNA was strongly expressed in the oviduct in comparison with other bovine tissues. Moreover, we observed that iNOS expression in the oviduct was significantly higher than in the uterus. Because it has been proposed that iNOS was implicated in crucial uterine functions in mammals, the latter observation also suggest an important role for iNOS in oviduct functions (18, 60).

The mammalian oviduct is a steroid-responsive organ, and

it was shown that the expression of specific genes was modulated in the oviduct throughout the estrous cycle (36, 56, 61). Because it is now recognized that the level of NO produced by NOS, especially iNOS, could be regulated at the transcription level, we quantified the expression of each NOS isoform at different stages of the estrous cycle (5, 9). Consistent with transcriptional regulation, we observed a relationship between the mRNA expression measured by quantitative RT-PCR and the levels of proteins detected by immunoblots and immunohistochemistry along the oviduct throughout the estrous cycle, especially for iNOS. However, some differences between mRNA and proteins levels during the estrous cycle were observed for nNOS and eNOS and can probably be attributed to posttranscriptional regulation (62, 63). Of note, our RT-PCR analysis did not discriminate between the numerous spliced transcripts of the exon 1 and referred only to nNOS mRNA transcripts that contain exon 2, which is known to be deleted in two nNOS alternatively spliced forms (64). It might be of further interest to analyze the expression of these variants in the oviduct to ascribe specific functions to particular nNOS isoforms.

Strikingly, we found that all NOS were highly expressed during the periovulatory period. Indeed, the mRNA expression of nNOS and iNOS is maximal shortly after ovulation, whereas the highest eNOS expression level was measured at the end of the estrous cycle. This discovery is of high importance because this phase of the estrous cycle was characterized by an increase in oviductal muscular and secretory activity, two physiological processes that can be influenced by NO. The volume of fluid in the lumen of the mammalian oviduct is highest around the time of estrus and is formed in part by selective transudation from the blood (65). Indeed, the increasing accumulation of luminal fluid is closely related to the phase of dilatation of the neighboring blood vessels. Therefore, because NO was known to be a strong vasodilator, it is reasonable to believe that the high expression of NOS measured during the periovulatory period must be important to the formation of oviductal fluid. Moreover, the vasodilatation of blood and lymphatic vessels at the time of estrus also induces edematous conditions in the isthmus mucosa and reduces lumen diameter (66, 67). These actions are essential to maintain the direction of fluid flow and restrict sperm access to the oviduct. Thus, our data suggest that eNOS, which was mainly detected in the endothelium of the lamina propria blood vessels around estrus, may contribute to edema formation.

Contraction and relaxation of smooth muscle cells in the oviduct are the major factors involved in promoting and regulating the transport of gametes and embryo during the periovulatory period (35). NO has proved to be a mediator of smooth muscle relaxation in various tissues, and *in vitro* studies using organ baths have revealed that NO is involved in oviductal contractility (45, 46). Additionally, it was shown that NO inhibition increases oviductal motility that results in accelerated oocyte and embryo transport *in vivo* in rats (48). NO can modulate oviductal contractility by either inhibiting cyclooxygenase enzymes and prostanoids synthesis or activating cyclic GMP-dependent pathway (28, 68). Our current observations indicate that NOS are highly expressed at the appropriate time of the estrous cycle in the smooth muscle

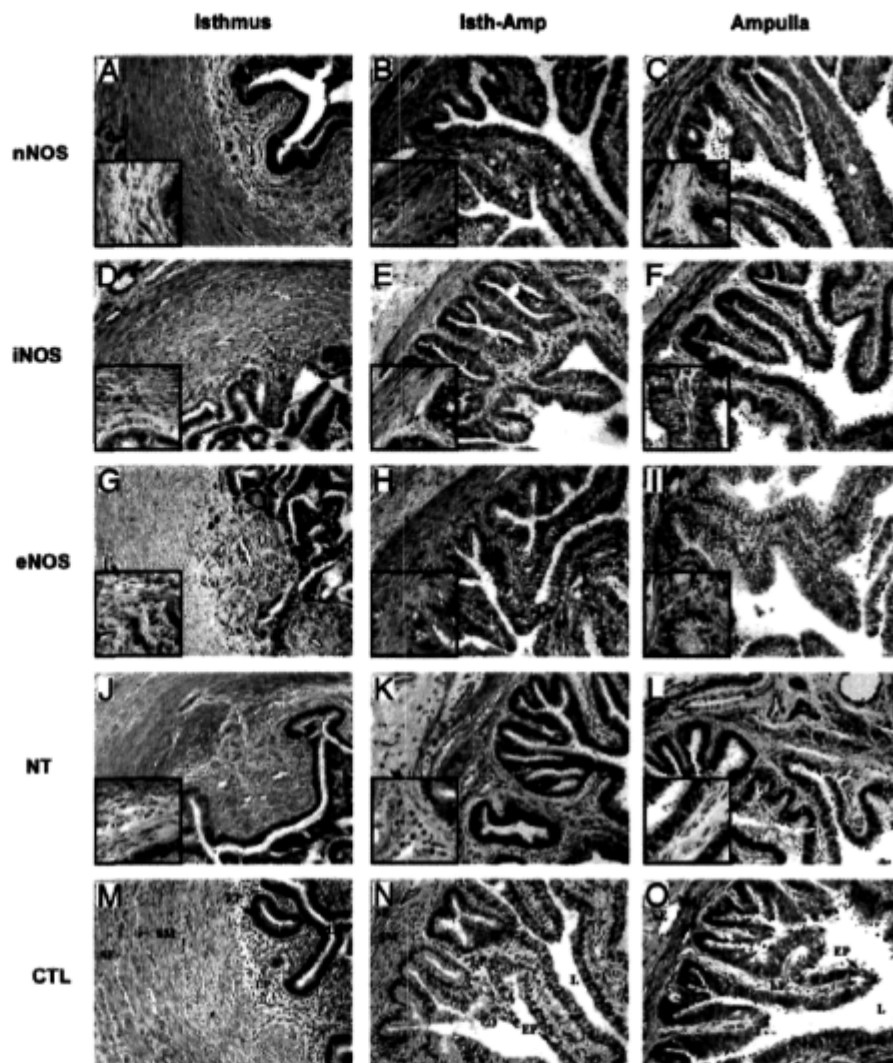


FIG. 4. Immunolocalization of NOS proteins and protein nitrotyrosine (NT) along the bovine oviduct. The immunohistochemical detection of each NOS isoforms and protein nitrotyrosine was performed on transversal cryosections of isthmus, isthmico-ampullary junction, and ampulla segments using specific NOS antibodies. nNOS is expressed in the three sections of the oviduct (A–C). iNOS is principally detected in the ampulla but was also expressed in the lamina propria and the smooth muscle cells of the isthmus and the isthmico-ampullary junction (D–F). In the epithelium of the ampulla, iNOS was localized at the apical surface of the epithelial cells (F). eNOS was mainly expressed in the isthmus and the isthmico-ampullary junction (G–I). In the isthmus, eNOS expression was located in the epithelium and endothelial cells of the blood vessels (G). Weak staining for eNOS was also detected in the ampulla segment (I). Specific nitrotyrosine immunostaining was detected in all oviduct sections (J–L). Corresponding nonspecific IgG were used as negative control (M–O, representative controls demonstrating absence of staining). Positive reactivity is shown in red. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. EP, Epithelial cells; L, oviduct lumen; LP, lamina propria; SE, serosa; SM, smooth muscle cells. Final magnification, $\times 100$ and $\times 400$.

to modulate oviductal contractility *in vivo*. Interestingly, we reported that nNOS is the only isoforms expressed in the thick circular smooth muscle layer of the isthmus regions, which is known to be a very richly innervated region with high densities of adrenergic nerve terminals (69). Moreover, extreme constriction of this muscular region was observed during the follicular stage of the estrous cycle to control sperm transport to the site of fertilization at the isthmico-ampullary junction (35). In the postovulatory phase, this constriction decreases progressively to allow the passage of the embryo to the uterus. This latter observation is in concordance with our results showing that nNOS expression increases gradually from the follicular to postovulatory stage of the estrous cycle and the strong signal of protein nitrotyrosination detected in smooth muscle layer. This strongly suggests that nNOS is the NOS isoform that produces NO in the smooth muscle cells of the isthmus to regulate the smooth muscle relaxation as well as the passage of the embryo to the implantation site in the uterus.

The oviduct is composed of distinct segments of charac-

teristic morphology, reflecting their different functional roles. In the present study, we clearly demonstrated that eNOS and iNOS were differentially expressed along the oviduct, whereas nNOS was equally expressed in all segments. The isthmus segment of the oviduct has been described as a sperm reservoir in several mammalian species, and we found that eNOS, nNOS, and iNOS are all expressed in the epithelial cells of this specialized region (70). We also observed a high level of protein nitrotyrosination in the epithelium of the isthmus.

These findings are important because it is well recognized that sperm bind to the isthmico epithelium and that NO production has beneficial effects on the maintenance of sperm viability and reduces sperm motility (13, 71). Therefore, we propose that exogenous NO production by the NOS isoforms in the reservoir during the follicular and postovulatory stages may contribute to maintain sperm in the appropriate physiological state for fertilizing oocytes. Moreover, NO is involved in events leading to fertilization in the oviduct such as sperm hyperactivation, capacitation, acrosome reaction,

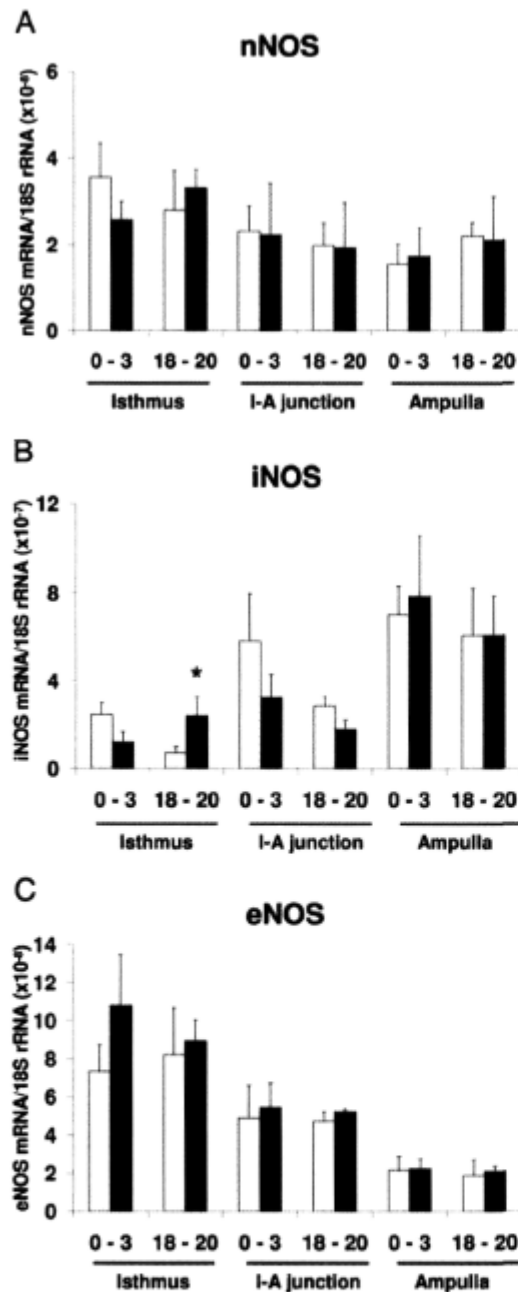


FIG. 5. NOS mRNA expression in ipsilateral and contralateral oviducts. The mRNA levels for each NOS were measured by real-time quantitative PCR. The 18S rRNA was used as an internal standard, and results are expressed as a ratio of NOS to 18S. The mRNA levels of nNOS (A), iNOS (B), and eNOS (C) were quantified in the isthmus, isthmus-ampullary junction, and ampulla of ipsilateral (□) and contralateral (■) oviducts at the postovulatory (d 0–3) and follicular (d 18–20) stages of the estrous cycle. Means with designations (*) are significantly different at $P < 0.05$ (Duncan's test). Data are means \pm SEM of eight animals.

and binding of sperm to zona pellucida (72, 73). Thus, NOS expression at the fertilization site in the isthmus-ampullary junction may be important to promote the fusion of gametes.

We also demonstrated that iNOS was highly expressed in the ampulla region during the periovulatory period. We

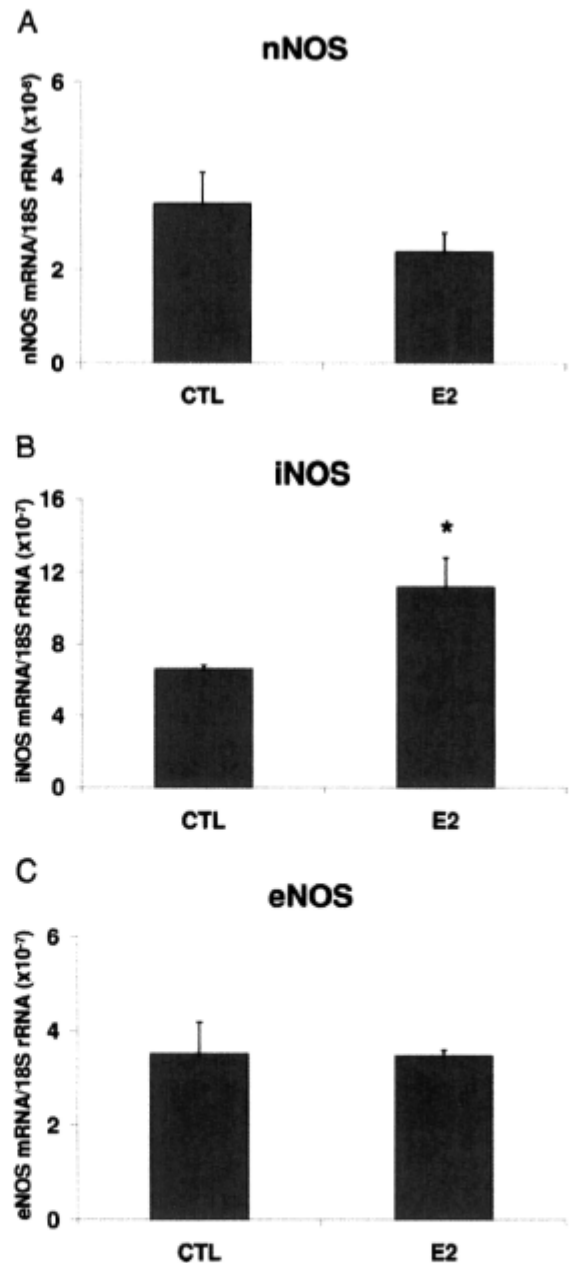


FIG. 6. Effects of 17 β -estradiol on NOS expression in the oviducts *in vivo*. The mRNA levels of NOS isoforms were measured by real-time quantitative PCR (LightCycler). The 18S rRNA was used as an internal standard and results are expressed as a ratio of NOS to 18S. Cows received either uterine infusion of saline control (CTL) or 17 β -estradiol (E2) at d 14 of the estrous cycle. The mRNA levels of each gene were quantified in the whole oviducts from both groups. A, nNOS. B, iNOS. C, eNOS. Data are means \pm SEM of three animals. Means with designations (*) are significantly different at $P < 0.05$ (Duncan's test).

found that iNOS was located at the luminal surface of the epithelial cells shortly after ovulation. Interestingly, we also showed that this specific region of the epithelial cells is characterized by a high level of protein nitrotyrosination. Thus, our data clearly revealed that iNOS protein is in close contact with ovulated oocyte, and these observations may be of

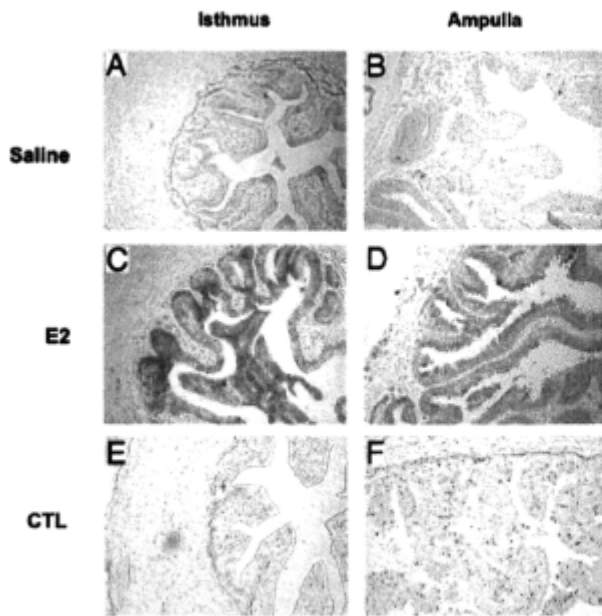


FIG. 7. Effects of 17β -estradiol treatment on iNOS protein expression in the isthmus and ampulla sections of the oviduct. In saline-treated animals, iNOS protein is principally detected in the epithelium but was also expressed in the lamina propria and the smooth muscle cells of the isthmus (A) and ampulla (B) segments. Estradiol (E2) treatment strongly increased the levels of iNOS-positive staining in these cells in both isthmus (C) and ampulla (D) sections of the oviduct. Corresponding nonspecific IgG were used as negative control (CTL) (E and F). Positive reactivity is shown in red. Quantitative analysis of iNOS-positive staining based on integrated OD was performed, and we found that iNOS signal was significantly increased by 3-fold in isthmus and ampulla sections of treated animals ($P < 0.05$, Duncan's test, $n = 3$). Final magnification, $\times 100$.

crucial importance because NO positively affects final oocyte maturation *in vitro* (30, 59). Furthermore, histological analysis has revealed that the epithelium of the bovine ampulla exhibits numerous ciliated cells (74). The activity of these cilia is greatest at or just after the time of ovulation and contributes to oocyte transport toward the site of fertilization (75). Interestingly, several studies demonstrated that NOS isoforms were expressed in different ciliated epithelium in mammals and that NO plays an important role in the control of ciliary activity in airway (21, 76). Indeed, it was notably shown that NO produced by iNOS up-regulates ciliary beat frequency in sinus epithelium (77). Therefore, our findings indicate that iNOS may also be involved in the increases of ciliary activity and the transport of the oocyte to the ampulla in the oviduct.

The heterogenous expression of NOS in the oviduct segment throughout the estrous cycle suggests that these enzymes are regulated by hormonal status at the transcriptional level. There are numerous reports that sex steroids, especially the estrogens, can regulate the mRNA expression of the NOS isoforms in a variety of cells (5, 7, 9). Consistent with estrogen regulation, our analysis clearly demonstrated that the expression of each NOS isoform increases during the maturation of the dominant follicle when maximal estrogen level is measured. Taken together, these findings prompted us to analyze the *in vivo* effects of the estradiol on the NOS

mRNA expression in the bovine oviduct. Surprisingly, we found that estradiol selectively up-regulates iNOS expression, whereas nNOS and eNOS expression remains unchanged.

In accordance with these findings, our current observations demonstrated that iNOS expression is up-regulated in the isthmus region of the oviduct ipsilateral to the dominant follicle, which is known to contain higher estradiol levels. Recent studies also revealed that NOS isoforms are differently regulated by estradiol in a specific reproductive organ. Indeed, it was shown that the expression of nNOS and eNOS in the sheep uterus are differentially regulated by estrogen (21). Furthermore, estradiol increases iNOS expression and had no effect on eNOS expression in the rat uterus (78). Other reports indicated that iNOS expression was also up-regulated by estrogens in different cell types such as macrophages and cardiac myocytes (79, 80). It has been proposed that estrogen receptors- α and - β mediate transcriptional activation of iNOS by estradiol (81, 82). Interestingly, these receptors are known to be expressed in the bovine oviductal cells at all stages of the estrous cycle (83). We previously reported that 17β -estradiol also induces the transcription of GPx-4, an antioxidant gene, in the bovine oviductal epithelium (55). Because it is known that NO regulates GPx activity (84), this increase in iNOS expression should affect GPx-4 ability to neutralize products of lipid peroxidation in these cells. Furthermore, the estrogens are also known to regulate oviductal contraction and secretion in several species (85–87). Therefore, because iNOS produces a higher amount of NO than the other two low-output NOS isoforms, our data strongly suggest that the estradiol can significantly increase the NO concentration in the oviducts. We propose that this augmentation of NO may be of crucial importance for reproductive events that occur in the oviduct during the periovalutary period.

In summary, we report that nNOS, iNOS, and eNOS are hormonally regulated and differentially expressed in the oviduct segments throughout the estrous cycle. We also provide the first information on NOS localization in the oviduct cell types. Thus, the dynamic expression and the specific cellular distribution of nNOS, iNOS, and eNOS along the oviduct during the estrous cycle allow us to suggest specific roles for each NOS isoform in oviductal functions. Furthermore, despite the fact that there are more evidences that NO is involved in all oviductal functions, very little is known about the mechanisms of control of NOS expression by extracellular signals in the mammalian oviduct. In this study, we show that estradiol selectively up-regulates iNOS expression and provide the first demonstration that NO production is regulated by a specific endocrine hormone in the oviducts *in vivo*. This finding suggests that NO produced by iNOS may modulate the numerous effects of estradiol in the oviduct. Collectively, our observations shed some light on the implication of each NOS isoforms in the physiological functions of the oviduct *in vivo*.

Acknowledgments

Received December 5, 2005. Accepted August 16, 2006.

Address all correspondence and requests for reprints to: Jean-François Bilodeau, Unité d'Ontogénie et Reproduction, Local T-1-49, 2705 Boulevard Laurier, Ste-Foy, Québec, Canada G1V 4G2. E-mail: jean-francois.bilodeau@crchul.ulaval.ca.

This work was supported by Grant 238570-02 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to J.-F.B.). J.-F.B. is the recipient of a Canadian Institutes of Health Research, Institute of Aging, New Investigators award.

References

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG 2001 Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593–615
- Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW 1993 Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon- γ and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 268:1908–1913
- Mayer B, John M, Bohme E 1990 Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* 277:215–219
- Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F 1991 Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10480–10484
- Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H 1998 Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12:773–790
- Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS 1994 Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 269:6765–6772
- Aktan F 2004 iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75:639–653
- Han YJ, Kwon YG, Chung HT, Lee SK, Simmons RL, Billiar TR, Kim YM 2001 Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF- κ B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Nitric Oxide* 5:504–513
- Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U 2003 Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384:1343–1364
- Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H 2003 Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 199:8–17
- Shen W, Hintze TH, Wolin MS 1995 Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation* 92:3505–3512
- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM 1997 Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol Psychiatry* 2:300–310
- Herrero MB, Gagnon C 2001 Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *J Androl* 22:349–356
- Dixit VD, Parvizi N 2001 Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim Reprod Sci* 65:1–16
- Kriegsfeld LJ, Demas GE, Huang PL, Burnett AL, Nelson RJ 1999 Ejaculatory abnormalities in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase (eNOS^{-/-}). *Physiol Behav* 67:561–566
- Maul H, Longo M, Saade GR, Garfield RE 2003 Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des* 9:359–380
- Gyurko R, Leupen S, Huang PL 2002 Deletion of exon 6 of the neuronal nitric oxide synthase gene in mice results in hypogonadism and infertility. *Endocrinology* 143:2767–2774
- Dong YL, Gangula PR, Yallampalli C 1996 Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. *J Reprod Fertil* 107:249–254
- Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K, Garfield RE 1997 Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod* 3:995–1003
- Motta AB, Estevez A, Tognetti T, Gimeno MA, Franchi AM 2001 Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 7:43–47
- Zhang J, Massmann GA, Mirabile CP, Figueroa JP 1999 Nonpregnant sheep uterine type I and type III nitric oxide synthase expression is differentially regulated by estrogen. *Biol Reprod* 60:1198–1203
- Thomson AJ, Telfer JF, Kohonen G, Young A, Cameron IT, Greer IA, Norman JE 1997 Nitric oxide synthase activity and localization do not change in uterus and placenta during human parturition. *Hum Reprod* 12:2546–2552
- Ledingham MA, Thomson AJ, Young A, Macara LM, Greer IA, Norman JE 2000 Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod* 6:1041–1048
- Chwalisz K, Garfield RE 2000 Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum Reprod* 15(Suppl 3):96–111
- Drazen DL, Klein SL, Burnett AL, Wallach EE, Crone JK, Huang PL, Nelson RJ 1999 Reproductive function in female mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 3:366–374
- Jablonka-Shariff A, Ravi S, Beltsos AN, Murphy LL, Olson LM 1999 Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biol Reprod* 61:171–177
- Tranguch S, Huet-Hudson Y 2003 Decreased viability of nitric oxide synthase double knockout mice. *Mol Reprod Dev* 65:175–179
- Ekerhovd E, Norstrom A 2004 Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of fallopian tube contractility. *Gynecol Endocrinol* 19:239–246
- Wu TP, Huang BM, Tsai HC, Lui MC, Liu MY 2004 Effects of nitric oxide on human spermatozoa activity, fertilization and mouse embryonic development. *Arch Androl* 50:173–179
- Jablonka-Shariff A, Basuray R, Olson LM 1999 Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *J Soc Gynecol Investig* 6:95–101
- Manser RC, Leese HJ, Houghton FD 2004 Effect of inhibiting nitric oxide production on mouse preimplantation embryo development and metabolism. *Biol Reprod* 71:528–533
- Hunter RH 1988 The Fallopian tubes (their role in fertility and infertility). Berlin, Heidelberg, and New York: Springer-Verlag
- Hafez ESE, Blandau RJ 1969 The Mammalian oviduct (comparative biology and methodology). Chicago: The University of Chicago Press
- Mwanza AM, Elmarsson S, Madej A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Kindahl H 2002 Postovulatory effect of repeated administration of prostaglandin F_{2 α} on the endocrine status, ova transport, binding of accessory spermatozoa to the zona pellucida and embryo development of recently ovulated sows. *Theriogenology* 58:1111–1124
- Bennett UA, Watts TL, Blair WD, Waldhalm SJ, Fuquay JW 1988 Patterns of oviductal motility in the cow during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 83:537–543
- Ellington JE 1991 The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet* 81:313–328
- Hunter RH 2002 Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs. *Reprod Domest Anim* 37:186–190
- Rodriguez PC, O'Flaherty CM, Beconi MT, Beorlegui NB 2005 Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim Reprod Sci* 85:231–242
- Sengoku K, Tamate K, Yoshida T, Takaoka Y, Miyamoto T, Ishikawa M 1998 Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil Steril* 69:522–527
- Francavilla F, Santucci R, Macerola B, Ruvolo G, Romano R 2000 Nitric oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding. *Biol Reprod* 63:425–429
- Kim BH, Kim CH, Jung KY, Jeon BH, Ju EJ, Choo YK 2004 Involvement of nitric oxide during *in vitro* fertilization and early embryonic development in mice. *Arch Pharm Res* 27:86–93
- Tranguch S, Steuerwald N, Huet-Hudson YM 2003 Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 68:1538–1544
- Chen HW, Jiang WS, Tzeng CR 2001 Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril* 75:1163–1171
- Perez Martinez S, Franchi AM, Viggiano JM, Herrero MB, Gimeno M 1998 Effect of prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) on oviductal nitric oxide synthase (NOS) activity: possible role of endogenous NO on PGF_{2 α} -induced contractions in rat oviduct. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 56:155–166
- Rosselli M, Inturum B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK 1994 Endogenous nitric oxide modulates endothelin-1 induced contraction of bovine oviduct. *Biochem Biophys Res Commun* 201:143–148
- Ekerhovd E, Brannstrom M, Weijdegard B, Norstrom A 1999 Localization of nitric oxide synthase and effects of nitric oxide donors on the human Fallopian tube. *Mol Hum Reprod* 5:1040–1047
- Francis M, Arkie M, Martin L, Butler TM, Cruz MC, Opere-Aryee G, Dacke CG, Brown JF 2003 Relaxant effects of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptides on oviduct motility in birds and mammals: possible role of nitric oxide. *Gen Comp Endocrinol* 133:243–251
- Perez Martinez S, Viggiano M, Franchi AM, Herrero MB, Ortiz ME, Gimeno MF, Villalon M 2000 Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovum transport and oviductal smooth muscle activity in the rat oviduct. *J Reprod Fertil* 118:111–117
- Gawronska B, Bodek G, Ziecik AJ 2000 Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase (NOS) in different regions of porcine oviduct during the estrous cycle. *J Histochem Cytochem* 48:867–875
- Majewski M, Sienkiewicz W, Kalczyk J, Mayer B, Czaja K, Lakomy M 1995 The distribution and co-localization of immunoreactivity to nitric oxide synthase, vasoactive intestinal polypeptide and substance P within nerve fibres supplying bovine and porcine female genital organs. *Cell Tissue Res* 281:445–464
- Rosselli M, Dubey RK, Rosselli MA, Macas E, Fink D, Lauper U, Keller PJ, Inturum B 1996 Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Mol Hum Reprod* 2:607–612
- Arsh JA, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA 2002 Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biol Reprod* 67:161–169
- Kimmins S, Russell GL, Lim HC, Hall BK, MacLaren LA 2003 The effects of estrogen, its antagonist ICI 162,780, and interferon- γ on the expression of estrogen receptors and integrin α V β 3 on cycle day 16 in bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 1:38

54. Bérubé R, Malenfant J, Gauvin D, Blais M, Gagnon E, Dumas R, Racine MC, Bourque J, Bélanger A Quantitation of androgenic and estrogenic steroids in rat and monkey serum using gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry. Proc 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Long Beach, CA, June 2000, p 605 (Abstract)
55. Lapointe J, Kimmins S, MacLaren LA, Bilodeau JF 2005 Estrogen selectively up-regulates the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in the oviducts. Endocrinology 146:2583–2592
56. Lapointe J, Bilodeau JF 2003 Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. Biol Reprod 68:1157–1164
57. Kang J, Chapdelaine P, Parent J, Madore E, Laberge PY, Fortier MA 2005 Expression of human prostaglandin transporter in the human endometrium across the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 90:2308–2313
58. Emond V, MacLaren LA, Kimmins S, Arosh JA, Fortier MA, Lambert RD 2004 Expression of cyclooxygenase-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the endometrial epithelium of the cow is up-regulated during early pregnancy and in response to intrauterine infusions of interferon- τ . Biol Reprod 70:54–64
59. Jablonka-Shariff A, Olson LM 2000 Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes *in vitro*. Mol Reprod Dev 55:412–421
60. Burnett TG, Tash JS, Hunt JS 2002 Investigation of the role of nitric oxide synthase 2 in pregnancy using mutant mice. Reproduction 124:49–57
61. Bui WC 2002 Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. Reproduction 123:355–362
62. Robb GB, Carson AR, Tai SC, Fish JE, Singh S, Yamada T, Scherer SW, Nakabayashi K, Marsden PA 2004 Post-transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by an overlapping antisense mRNA transcript. J Biol Chem 279:37982–37996
63. Chesler DA, McCutcheon JA, Reiss CS 2004 Posttranscriptional regulation of neuronal nitric oxide synthase expression by IFN- γ . J Interferon Cytokine Res 24:141–149
64. Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH 1997 Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. Proc Natl Acad Sci USA 94:3396–3401
65. Leese HJ, Tay JL, Reischl J, Downing SJ 2001 Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. Reproduction 121:339–346
66. Bellve AR, McDonald MF 1970 Directional flow of fallopian tube secretion in the ewe at onset of the breeding season. J Reprod Fertil 22:147–149
67. Black DL, Davis J 1962 A blocking mechanism in the cow oviduct. J Reprod Fertil 4:21–26
68. Perez Martinez S, Farina M, Ogando D, Ribeiro ML, Gimeno M, Franchi AM 2000 Nitric oxide inhibits prostanoïd synthesis in the rat oviduct. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 62:239–242
69. Brundin J 1965 Distribution and function of adrenergic nerves in the rabbit fallopian tube. Acta Physiol Scand Suppl 259:1–57
70. Suarez SS 2002 Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. Reprod Domest Anim 37:140–143
71. Weinberg JB, Doty E, Bonaventura J, Haney AF 1995 Nitric oxide inhibition of human sperm motility. Fertil Steril 64:408–413
72. Herrero MB, Cebal E, Boquet M, Viggiano JM, Vitullo A, Gimeno MA 1994 Effect of nitric oxide on mouse sperm hyperactivation. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam 44:65–69
73. O'Flaherty C, Rodriguez P, Srivastava S 2004 L-Arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. Biochim Biophys Acta 1674:215–221
74. Yaniz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mullins KJ 2000 Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. Anat Rec 260:268–278
75. Blandau RJ 1978 Comparative aspects of tubal anatomy and physiology as they relate to reconstructive procedures. J Reprod Med 21:7–15
76. Li D, Shirakami G, Zhan X, Johns RA 2000 Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 23:175–181
77. Kim JW, Min YG, Rhee CS, Lee CH, Koh YY, Rhyoo C, Kwon TY, Park SW 2001 Regulation of mucociliary motility by nitric oxide and expression of nitric oxide synthase in the human sinus epithelial cells. Laryngoscope 111:246–250
78. Ogando D, Farina M, Ribeiro ML, Perez Martinez S, Cella M, Rettori V, Franchi A 2003 Steroid hormones augment nitric oxide synthase activity and expression in rat uterus. Reprod Fertil Dev 15:269–274
79. Al-Khlaiwi T, Al-Drees A, Gurnoy E, Qureshi I, Biber T, Kalimi M 2005 Estrogen protects cardiac myogenic (H9c2) rat cells against lethal heat shock-induced cell injury: modulation of estrogen receptor α , glucocorticoid receptors, heat shock protein 70, and iNOS. J Cardiovasc Pharmacol 45:217–224
80. You HJ, Kim JY, Jeong HG 2003 17 β -estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. Biochem Biophys Res Commun 303:1129–1134
81. Liang M, Ekblad E, Lydrup ML, Nilsson BO 2003 Combined lack of estrogen receptors α and β affects vascular iNOS protein expression. Cell Tissue Res 313:63–70
82. Nuedling S, Karas RH, Mendelsohn ME, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Meyer R, Vetter H, Grohe C 2001 Activation of estrogen receptor β is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. FEBS Lett 502:103–108
83. Ulbrich SE, Kettler A, Einspanier R 2003 Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct *in vivo* and *in vitro*. J Steroid Biochem Mol Biol 84:279–289
84. Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N 2003 Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. Biol Chem 384:567–574
85. Orihuela PA, Parada-Bustamante A, Cortes PP, Gatica C, Croxatto HB 2003 Estrogen receptor, cyclic adenosine monophosphate, and protein kinase A are involved in the nongenomic pathway by which estradiol accelerates oviductal oocyte transport in cyclic rats. Biol Reprod 68:1225–1231
86. Humphrey KW, Martin L 1968 The effects of oestrogens and anti-oestrogens on ovum transport in the laboratory mouse. Aust J Biol Sci 21:1239–1248
87. Bareither ML, Verhage HG 1981 Control of the secretory cell cycle in rat oviduct by estradiol and progesterone. Am J Anat 162:107–118

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.