

RÉACTION CORTICALE ET BLOCAGE DE LA POLYSPERMIE DANS L'ŒUF DE LAPINE

J.-E. FLÉCHON, D. HUNEAU, Aline SOLARI et C. THIBAUT

*Station centrale de Physiologie animale,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas*

RÉSUMÉ

Des observations en microscopie électronique et des analyses biométriques ont été effectuées sur les granules corticaux (GC) de différentes catégories d'œufs de lapines.

Les résultats obtenus montrent que les GC demeurent présents dans le cortex des œufs ovulés pendant leur période de fécondabilité (8 à 10 heures après l'ovulation). Il en est de même dans les œufs activés artificiellement par un refroidissement de 24 heures à 10°C puis réchauffement; ces œufs restent fécondables.

Dans les œufs fécondés et les œufs activés puis fécondés, les GC ont pratiquement disparu. C'est la pénétration du spermatozoïde fécondant qui provoque l'émission des GC et en retour, cette réaction corticale inhibe la fusion avec l'œuf de spermatozoïdes surnuméraires. Le rôle des GC dans la fécondation semble être restreint à cette fonction.

Le nombre des GC a tendance à diminuer dans les ovocytes âgés, activés ou non, ce qui explique le risque accru de polyspermie en cas de fécondation tardive après l'ovulation.

INTRODUCTION

La prévention de la polyspermie chez les Mammifères s'effectue d'abord dans les voies génitales par une limitation du nombre de spermatozoïdes qui atteignent le lieu de fécondation (THIBAUT, 1972). Au niveau de l'œuf, deux systèmes contribuent à cette limitation : la zone pellucide et la membrane plasmique. Les granules corticaux (GC) jouent un rôle actif dans cette régulation (PIKO, 1969).

L'argument le plus solide pour appuyer cette proposition est de mettre en évidence la possibilité de fécondation tant que les granules restent présents et l'impossibilité quand ils ont été émis.

Nous nous sommes adressés à l'œuf de Lapine, lequel, après activation parthénogénétique, reste fécondable (CHAMEL, 1962), et constitue un excellent modèle pour l'étude du problème posé. Tel est l'objet du présent mémoire.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Des ovocytes fraîchement ovulés de lapines sont activés par un séjour de 24 heures à 10°C dans du sérum homologue et une remise en culture à 37°C (CHAMEL, 1962 d'après CHANG, 1954).

Ces œufs sont partagés entre trois lots expérimentaux :

1. Culture seule *in vitro* à 37°C : « œufs activés *in vitro* ».
2. Transplantation par laparotomie dans un pavillon d'une femelle mise au mâle vasectomisé 10 heures auparavant et dont les follicules mûrs sont cautérisés, puis récupération des œufs transplantés par perfusion des oviductes 4 à 6 heures après : « œufs activés *in vivo* ».
3. Même traitement mais avec une femelle accouplée avec un mâle normal : « œufs activés et fécondés *in vivo* ».

Sont également étudiés, des œufs vierges ou fécondés recueillis 1 à 10 heures après l'ovulation. Tous les œufs subissent une double fixation (glutaraldéhyde puis tétr oxyde d'osmium), une déshydratation dans du méthanol additionné d'acétate d'uranyle, puis une inclusion dans l'Epon. Les coupes sont contrastées par le citrate de plomb après traitement par l'acétate d'uranyle dans certains cas.

Les observations des coupes sont complétées par un comptage des GC sur des sections paraéquatoriales des œufs. Les œufs activés *in vivo* n'ont pas été utilisés pour l'analyse statistique.

A partir du nombre moyen de GC par unité de longueur, nous avons calculé pour chaque catégorie les moyennes, variances, coefficient de variation et les intervalles de confiance non paramétriques au seuil 1 p. 100. La comparaison, deux à deux, des différentes catégories a été effectuée avec le test U de Mann-Whitney.

Définition des catégories d'œufs

Sont considérés comme activés tous les œufs conservés 24 h à 10°C et ramenés à 37°C *in vitro* ou *in vivo*. Ce traitement est efficace à 100 p. 100 et provoque une segmentation avec présence le plus souvent de deux pronuclei, l'un formé par les chromosomes de l'ovule et l'autre par ceux du deuxième globule polaire non émis (CHAMEL, 1962).

Sont classés activés puis fécondés, tous les œufs dans le cytoplasme desquels a été observée la pénétration d'un spermatozoïde (au moins 70 p. 100 des œufs activés *in vivo* chez des femelles accouplées à un mâle normal, CHAMEL, 1962). Sont exclus les œufs où des spermatozoïdes n'ont pu être observés que dans la zone pellucide ou l'espace périovulaire.

RÉSULTATS

Observations

Les œufs activés *in vitro* ou *in vivo* possèdent des GC dont la distribution et l'aspect paraissent semblables à ceux d'œufs ovulés non fécondés (fig. 1 et 2). Les GC forment sous la membrane plasmique une assise monogranulaire discontinue, interrompue à l'endroit où le premier globule polaire s'est détaché.

Dans les œufs activés artificiellement, en particulier, les GC sont parfois distribués localement de manière irrégulière dans le cortex (comparer les fig. 3 et 4).

Les œufs activés puis fécondés *in vivo* présentent un cortex analogue à celui d'œufs fécondés, c'est-à-dire pratiquement dépourvu de GC (fig. 5 et 6).

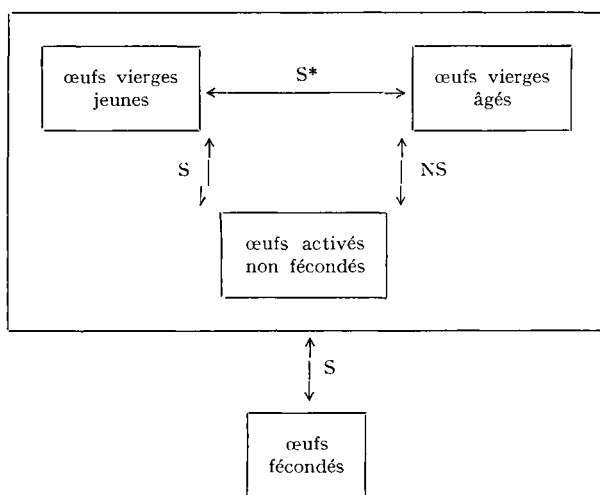
On observe différents aspects de la pénétration du spermatozoïde fécondant dans des œufs activés : dans certains cas, le noyau évolue normalement et commence à gonfler alors que dans d'autres cas où le spermatozoïde semble pourtant à un stade de pénétration avancé, aucune modification du noyau ne se produit.

Analyse biométrique

L'estimation des droites de régression entre le nombre de GC et la longueur de cortex (graph. 1), la signification des coefficients de corrélation (tabl. 1) et la comparaison du nombre moyen de GC par unité de longueur de cortex (graph. 1) permettent de bien séparer les œufs fécondés des œufs non fécondés.

TABLEAU I

Représentation des tests de comparaison des différentes catégories d'œufs



NS : différence non significative au seuil 5 p. 100

S : différence significative au seuil 5 p. 100

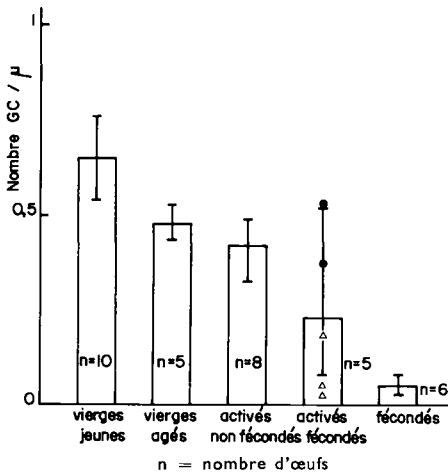
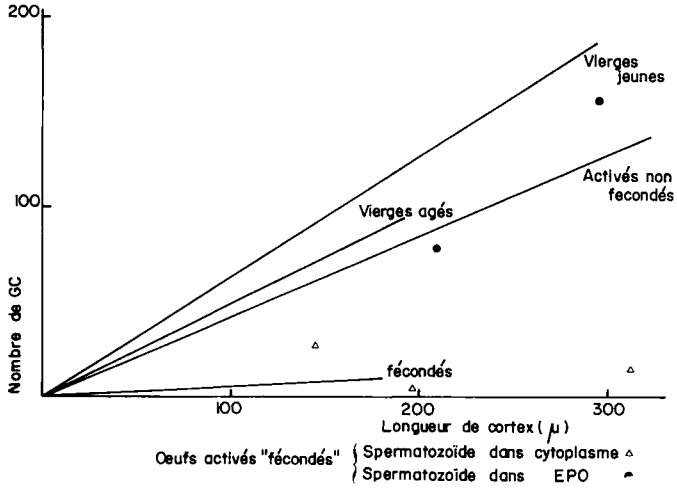
S* : tendance à la signification.

Pour les œufs non fécondés les corrélations diffèrent significativement de zéro : le nombre de GC serait proportionnel à la longueur de cortex observée. Cependant, nous ne pouvons tester la linéarité de la relation en raison du faible nombre de données, mais les valeurs élevées des coefficients constituent un argument en faveur de la validité de cette hypothèse.

Les œufs activés non fécondés s'apparentent aux œufs vierges âgés (≥ 18 h post-coitum) et montrent une différence significative avec les œufs vierges jeunes (≤ 14 h 30 post-coitum). La différence entre œufs vierges jeunes et âgés est à peine

significative ; elle serait très significative ($P < 1$ p. 100) si le lot des vierges jeunes ne comportait pas un œuf (exceptionnel) présentant un faible nombre de GC par unité de longueur de cortex.

Les œufs activés présumés fécondés constituent une population hétérogène. Les œufs activés dont le cytoplasme est pénétré par un spermatozoïde (œufs activés puis fécondés), sont identiques aux œufs fécondés. Celui de ces œufs qui a conservé le plus de GC se trouve encore au stade initial de la fusion des gamètes.



GRAPH. I. — Nombre de granules corticaux pour les différentes catégories d'œufs.
 haut : droite de régression
 bas : valeur par unité de longueur

Pour les œufs dans lesquels on n'a trouvé un spermatoïde que dans l'espace périovulaire (EPO), le nombre de GC par unité de longueur de cortex s'apparente à celui des œufs activés non fécondés (graph. I).

DISCUSSION

Critiques des méthodes biométriques utilisées

L'œuf et les GC peuvent être assimilés respectivement à une grande sphère à la face interne de laquelle sont situées, en position tangentielle, de très nombreuses petites sphères égales. Dans ces conditions, une estimation relative de la densité des GC par unité de surface peut-être donnée par le nombre de GC rapporté au périmètre d'une section équatoriale.

Nous n'avons jamais observé de gradient de distribution des GC dans le cortex sur des coupes équatoriales d'œufs ; dans le cas contraire, le calcul du nombre moyen par unité de longueur ne serait pas correct. En fait, l'augmentation linéaire du nombre de GC en fonction de la longueur de cortex des œufs vierges est en faveur de leur répartition relativement homogène.

Une erreur absolue sur ce nombre est introduite par les variations éventuelles de l'épaisseur des coupes, qui est inférieure à celle des GC (de l'ordre respectivement de 0,1 et 0,25 μ). Cependant, l'épaisseur des coupes est semblable pour les différentes catégories d'œufs, pour lesquelles l'erreur éventuelle est ainsi identique et il n'y a donc pas lieu d'en tenir compte.

Devenir et rôle des granules corticaux

Les nombres moyens de GC par unité de longueur confirment l'impression donnée par les observations, à savoir que les œufs vierges et activés d'une part et les œufs fécondés et activés puis fécondés d'autre part, constituent deux populations distinctes.

Les œufs ovulés non fécondés conservent des GC au moins pendant la période de fécondabilité (jusqu'à 18-20 h post-coitum, âge maximum des œufs vierges utilisés ici) mais leur fréquence diminue dans le cortex. Chez la Ratte, si la décharge ovulante est retardée de 48 heures, le nombre de GC des ovocytes finalement ovulés, diminue de 50 p. 100 (PELUSO et BUTCHER, 1974). A la fin de la période de fécondabilité, il est possible que les GC soient émis spontanément (Hamster : YANAGIMACHI et CHANG, 1961 ; Souris : MERCHANT et CHANG, 1971) ou bien qu'ils forment des agrégats (LONGO, 1974 a) ou migrent vers le centre de l'œuf (Souris : SZÖLLÖSI, 1971). Leur absence du cortex pourrait expliquer des anomalies de fécondation tardive (AUSTIN, 1970).

Les œufs activés *in vitro* ou *in vivo* par refroidissement gardent aussi des GC jusqu'à 6 h après réchauffement (FLÉCHON, 1970), de même que les œufs de Hamster activés naturellement ou artificiellement (AUSTIN, 1956 LONGO, 1974 b). Mais, comme dans les œufs vierges âgés, le nombre de GC a tendance à diminuer. Au contraire, l'activation par choc électrique (TARKOVSKI *et al.*, 1970) provoquerait une émission de GC (GWATKIN *et al.*, 1973).

Dans les œufs fécondés, l'émission des GC est massive mais si elle n'est pas toujours totale, la perte de la plupart des GC par le zygote a été maintes fois confirmée (PIKO, 1969) et a été utilisée comme test de fécondation *in vitro* (FRASER *et al.*, 1972).

Il semble évident que les œufs activés puis fécondés, selon la définition donnée

plus haut, c'est-à-dire dont le cytoplasme a bien été pénétré par un spermatozoïde, émettent leurs GC d'une manière analogue aux œufs fécondés. Un barrage contre la polyspermie se produit effectivement dans les œufs activés puis fécondés puisque 7 p. 100 d'entre eux seulement sont polyspermiqes, taux normal pour des œufs âgés (CHALMEL, 1962). De même, chez le Rat, les œufs activés (émission du deuxième globule polaire) restent fécondables et la pénétration d'un spermatozoïde fécondant bloque normalement la polyspermie dans ces œufs (AUSTIN et BRADEN, 1954).

Mécanisme d'action du matériel cortical dans le blocage de la polyspermie

Les granules corticaux de l'œuf de Lapine sont constitués de glycoprotéines ne présentant pas de groupes acides libres, en quantité décelable (FLÉCHON, 1970). Cette composition ne se modifie pas dans les œufs non fécondés (vierges âgés ou activés).

Dans le cas de blocage essentiellement au niveau de la membrane plasmique (lapine), les glycoprotéines des GC peuvent réagir avec cette dernière et modifier la surface cellulaire (COOPER et BEDFORD, 1971).

Lorsque les spermatozoïdes surnuméraires sont arrêtés partiellement ou totalement dans la zone pellucide, la « réaction » de cette dernière serait due à l'action de la substance des GC sur la pellucide (AUSTIN et BRADEN, 1956 ; BARROS et YANAGIMACHI, 1971).

Chez la Lapine où se produit aussi un arrêt partiel des spermatozoïdes dans la zone pellucide, cette dernière est plus résistante à une digestion par la trypsine après fécondation et l'hypothèse d'une libération d'inhibiteur de trypsine par les GC a été avancée (CONRAD *et al.*, 1971).

Chez la Souris où le nombre de spermatozoïdes surnuméraires dans l'espace périovulaire est faible (BRADEN *et al.*, 1954), la rapidité de la dissolution de la zone pellucide par la pronase est décroissante de l'œuf non fécondé à l'œuf activé par choc électrique (émission partielle des GC) puis à l'œuf fécondé (MINTZ et GEARHART, 1973).

Enfin, chez le Hamster, le blocage de la pénétrance de la zone pellucide aux spermatozoïdes par la substance des GC émise par des œufs fécondés ou activés par un choc électrique est supprimé par un inhibiteur de trypsine (GWATKIN *et al.*, 1973). Les GC possèderaient une activité tryptique qui agirait sur les récepteurs des spermatozoïdes dans la zone pellucide (HARTMANN et GWATKIN, 1971). Une situation analogue existerait dans le cas d'œufs d'oursins (VACQUIER *et al.*, 1972).

La polyspermie spontanée (1,7 p. 100 chez la Lapine) peut être due à un défaut d'émission des GC (leur persistance a été décrite dans plusieurs œufs polyspermiqes par GULYAS, 1974) ou à une rapidité insuffisante de la mise en fonction des systèmes de blocage (cas de présentation simultanée de deux spermatozoïdes), mais aussi à une absence de GC. Nous avons observé un œuf vierge jeune presque dépourvu de GC. Nous avons aussi rencontré des œufs vierges qui contiennent encore des amas de GC comme au stade de la synthèse de ces derniers (SZÖLLÖSI, 1967).

Distinction entre activation et blocage de la polyspermie

Les faits rapportés, qui complètent ceux présentés par CHALMEL (1962), montrent bien la dissociation entre un mécanisme local, la rupture des GC qui assure la monospermie, et le mécanisme général de l'activation qui conduit à la segmen-

tation. Celui-ci peut être stimulé sans que nécessairement le premier le soit. On peut aussi obtenir un début de développement sans émission des GC chez des Echinodermes (OSANAI, 1960) et des Poissons (IWAMATSU, 1965). Inversement, il a été montré que l'induction de la réaction corticale par le spermatozoïde (suivie de son élimination) n'induit pas nécessairement la segmentation (Nereis : LILLIE, 1911 ; GOODRICH, 1920. Oursins : HIRAMOTO, 1962).

Signalons enfin que l'absence fréquente de gonflement du noyau spermatique dans les œufs activés puis fécondés, confirme la disparition du facteur cytoplasmique ovocytaire nécessaire à cette transformation, quand l'ovocyte vieillit (THIBAUT, 1973, tabl. 2).

Reçu pour publication en octobre 1974.

P. S. : Après rédaction du présent article, nous avons pris connaissance d'une Communication qui confirme la rétention des GC dans les œufs de Lapines activés par un choc thermique (GULYAS, 1974, *Am. J. Anat.*, **140**, 577).

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre reconnaissance à M. R. SCANDOLO pour le tirage des clichés et à M^{lle} M. E. MATET pour la dactylographie de ce mémoire.

SUMMARY

CORTICAL REACTION AND INHIBITION OF POLYSPERMY IN THE RABBIT EGG

Electron microscopy and biometric analysis are done on cortical granules (CG) of different types of rabbit eggs.

Results show that the CG remain present in the cortex of eggs ovulated during their fertile period (8 to 10 hours after ovulation). This is also true of eggs artificially activated by cooling 24 hours at 10°C, and reheating ; these eggs remain fertilizable.

In fertilized eggs and those activated and then fertilized, the CG have almost disappeared. The penetration of fertilizing spermatozoa induces the loss of CG and this cortical reaction inhibits fusion of supernumerary spermatozoa with the egg. The role of CG in fertilization seems limited to this function.

The number of CG tends to decrease in old oocytes, whether activated or not. This explains the risk of polyspermy in late fertilization after ovulation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUSTIN C. R., 1956. Activation of eggs by hypothermia in rat and hamsters. *J. Exp. Biol.*, **33**, 338-347.
 AUSTIN C. R., 1970. Ageing and reproduction : post-ovulatory deterioration of the egg. *J. Reprod. Fert., suppl.* **12**, 39-54.
 AUSTIN C. R., BRADEN, A. W. H., 1954. Induction and inhibition of the second polar division in the rat egg and subsequent fertilization. *Austr. J. Biol. Sci.*, **7**, 195-210.

- AUSTIN C. R., BRADEN, A. W. H., 1956. Early reaction of the rodent egg to spermatozoon penetration. *J. exp. Biol.*, **33**, 358-365.
- BARROS C., YANAGIMACHI R., 1971. Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature, Lond.*, **233**, 268.
- CHALMEL M. C., 1962. Possibilité de fécondation des œufs de Lapine activés parthénogénétiquement. *Ann. Biol. anim., Bioch. Biophys.*, **2**, 279-297.
- CHANG M. C., 1954. Development of parthenogenetic rabbit blastocysts induced by low temperature storage of unfertilized ova. *J. exp. Zool.*, **125**, 127-150.
- CONRAD K., BUCKLEY J., STAMBAUGH R., 1971. Studies on the nature of the block to polyspermy in rabbit ova. *J. Reprod. Fert.*, **27**, 133-135.
- COOPER G. W., BEDFORD J. M., 1971. Charge density change in the vitelline surface following fertilization of the rabbit egg. *J. Reprod. Fert.*, **25**, 431-436.
- FLÉCHON J.-E., 1970. Nature glycoprotéique des GC de l'œuf de Lapine; mise en évidence par l'utilisation comparée de techniques cytochimiques ultrastructurales. *J. Microscopie*, **9**, 221-242.
- FRASER L. R., DANDEKAR P. V., GORDON M. K., 1972. Loss of cortical granules in rabbit eggs exposed to spermatozoa *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **29**, 295-297.
- GOODRICH H. B., 1920. Rapidity of activation in the fertilization of Nereis. *Biol. Bull.*, **38**, 196-201.
- GULYAS B. J., 1974. Electron microscopic observations on advanced stages of spontaneous polyspermy in rabbit zygotes. *Anat. Rec.*, **179**, 285-296.
- GWATKIN R. B. L., WILLIAMS D. T., HARTMANN J. F., KNIAZUK M., 1973. The zona reaction of hamster and mouse eggs: production *in vitro* by a trypsin-like protease from cortical granules. *J. Reprod. Fert.*, **32**, 259-266.
- HARTMANN J. F., GWATKIN R. B. L., 1971. Alteration of sites on the mammalian sperm surface following capacitation. *Nature, Lond.*, **234**, 479-481.
- HIRAMOTO Y., 1962. An analysis of the mechanism of fertilization by means of microinjection of spermatozoa in sea urchin eggs. *Exp. Cell. Res.*, **28**, 323-334.
- IWAMATSU T., 1965. Effect of acetone on the cortical changes at fertilization of the egg of the *Medaka oryzius latipes*. *Embryologia*, **9**, 1-12.
- LILLIE F. R., 1911. Studies of fertilization in Nereis I. The cortical changes in the egg. II. Partial fertilization. *J. Morphol.*, **22**, 361-393.
- LONGO J. F., 1974 a. Ultrastructural changes in rabbit eggs aged *in vivo*. *Biol. Reprod.*, **11**, 22-39.
- LONGO J. F., 1944 b. An ultrastructural analysis of spontaneous activation of hamster eggs aged *in vivo*. *Anat. Rec.*, **179**, 27-56.
- MERCHANT H., CHANG M. C., 1971. An electron microscopic study of mouse eggs matured *in vivo* and *in vitro*. *Anat. Rec.*, **171**, 21-38.
- MINTZ B., GEARHART J. D., 1973. Subnormal zona pellucida change in parthenogenetic mouse embryos. *Develop. Biol.*, **31**, 178-184.
- OSANAI K., 1960. Development of the sea urchin egg with the inhibited breakdown of the cortical granules. *Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV*, **26**, 77-87.
- PELUSO J. J., BUTCHER R. L., 1974. The effect of follicular aging on the ultrastructure of the rat oocyte. *Fert. Steril.*, **25**, 494-502.
- PIKO L., 1969. Gamete structure and sperm entry in Mammals. In: *Fertilization*, **2**, 235-403, METZ C. B. and MONROY A., Acad. Press N.Y.
- SZÖLLÖSI D., 1967. Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *Anat. Rec.*, **159**, 431-446.
- SZÖLLÖSI D., 1971. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *Am. J. Anat.*, **180**, 209-226.
- TARKOVSKI A. K., WITKOWSKA A., NOWICKA J., 1970. *Experimental parthenogenesis in the mouse*. *Nature, Lond.*, **226**, 162-165.
- THIBAUT C., 1972. Physiology and physiopathology of the fallopian tube. *Int. J. Fertil.*, **17**, 1-13.
- THIBAUT C., 1973. Experimental approaches to normal and abnormal mammalian oocyte maturation and ageing, in: *Les accidents chromosomiques de la reproduction*, I. N. S. E. R. M., BOUÉ et THIBAUT ed., 233-240.
- VACQUER V. D., TEGNER M. J., EPEL D., 1972. Protease activity establishes the block against polyspermy in sea eggs. *Nature, Lond.*, **240**, 352-353.
- YANAGIMACHI R., CHANG M. C., 1961. Fertilizable life of golden hamster ova and their morphological changes at the time of losing fertilizability. *J. exp. Zool.*, **148**, 185-203.

PLANCHES

PLANCHE I

FIG. 1

Oeuf « activé *in vivo* », 6 h après réchauffement. De nombreux GC sont distribués de manière relativement homogène dans le cortex; quelques-uns sont situés à l'intérieur du cytoplasme ($\times 7\ 000$).

FIG. 2

Oeuf « activé *in vitro* », 30 mn après réchauffement. Répartition similaire des GC. Le contenu des vésicules de reticulum endoplasmique est modifié par le séjour *in vitro* mais reprend un aspect habituel *in vivo* (fig. 1) ($\times 7\ 000$).

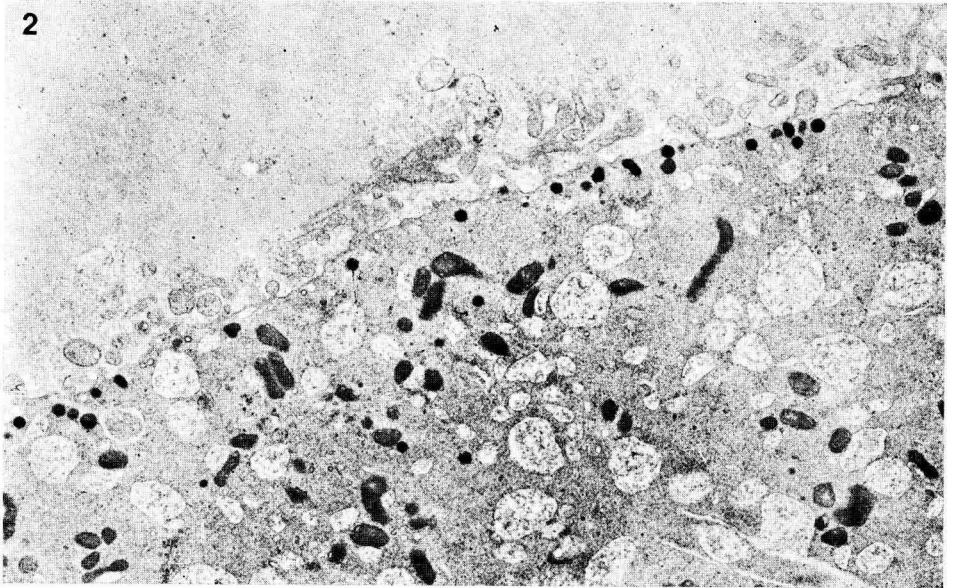
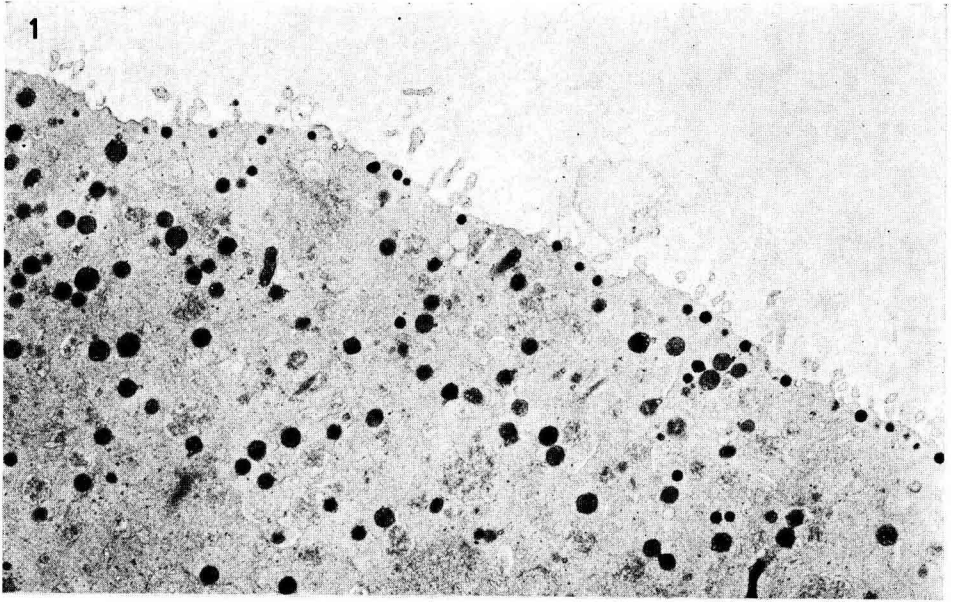


PLANCHE II

FIG. 3

Oeuf « activé *in vitro* », 1 h après réchauffement. Un exemple d'hétérogénéité locale de la distribution des GC dans le cortex. ($\times 11.500$).

FIG. 4

Oeuf « activé *in vivo* », 6 h après réchauffement. Distribution très régulière des GC dans le cortex. ($\times 11.500$).

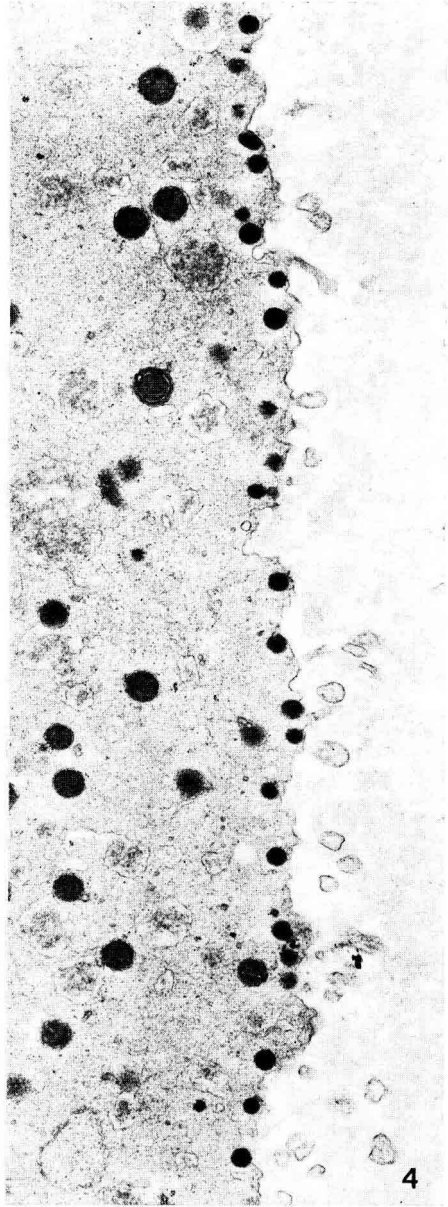
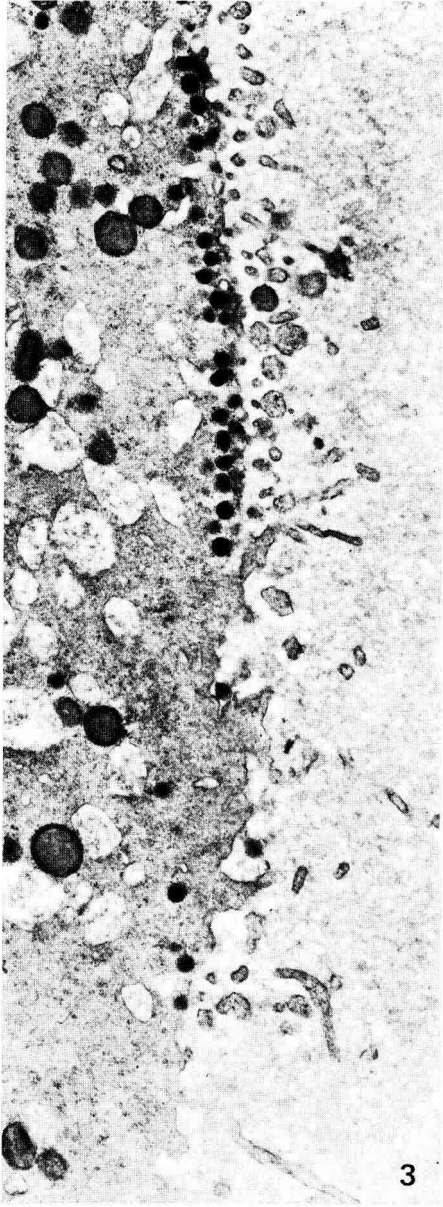


PLANCHE III

FIG. 5

Œuf « activé et fécondé *in vivo* », 4 h 30 après transplantation. La pièce principale du spermatozoïde fécondant est localisée sous la membrane plasmique. Le cortex ne contient pas de GC. ($\times 5.200$).

FIG. 6

Œuf « activé et fécondé *in vivo* », 4 h 30 après transplantation. L'émission des GC s'est produite. Le cytoplasme périphérique de l'œuf contient une pièce intermédiaire. ($\times 17.500$).

