

Gamètes et fécondation chez les oiseaux

E. BLESBOIS

INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

Courriel : Elisabeth.Blesbois@tours.inra.fr

Chez les oiseaux, la biologie des gamètes présente de nombreuses spécificités qui allient l'oviparité à un système de fécondation interne très élaboré. Les données les plus récentes sur les gamètes, la fécondation polyspermiq ue et quelques-unes de leurs applications pour la production d'œufs et pour la maîtrise de la reproduction en élevage, sont présentées ici.

Les oiseaux forment une classe de vertébrés supérieurs dont les membres antérieurs ont évolué en ailes pour permettre l'exercice du vol. L'aptitude au vol s'accompagne de caractéristiques physiologiques favorables à ce mode de déplacement, comme les plumes et les sacs aériens. D'autres adaptations physiologiques facilitent l'adaptation à des conditions environnementales très variables. Parmi celles-ci, l'oviparité des oiseaux a évolué vers la production d'œufs téloleécithes (avec un volume considérable de vitellus) entourés d'une coquille solide et qui procurent à l'embryon un environnement nourricier très sécurisé. Dans la plupart des espèces aviaires, la présence d'un seul tractus chez la femelle adulte rationalise l'espace abdominal. La fécondation est interne comme chez les mammifères. Le stockage prolongé des spermatozoïdes dans des zones spécialisées de l'oviducte, comme les glandes utéro-vaginales, optimise la gestion des gamètes mâles en vue de la fécondation, participe à la sélection des meilleurs spermatozoïdes et à une compétition complexe entre géniteurs.

Le stockage des spermatozoïdes dans les glandes utéro-vaginales (cf. revue de Blesbois et Brillard 2007), permet aussi une «liberté adaptative» aux femelles, qui peuvent ainsi rester fertiles plusieurs semaines en absence de mâle. Cette adaptabilité est par exemple mobilisée lorsqu'une nouvelle fécondation est nécessaire en fin de cycle annuel de reproduction en cas de perte d'embryons ou de poussins assez tard en saison. Car la plupart des oiseaux présentent un cycle annuel de reproduction qui, en pays tempérés, est surtout réglé par les variations de la durée du jour. En Europe, les oiseaux se reproduisent en général en jours à photopériode croissante

(hiver-printemps) de telle sorte que les petits de l'année soient suffisamment vigoureux dès l'automne, pour entreprendre une éventuelle migration.

L'efficacité de la reproduction de certains oiseaux comme la poule, a été utilisée depuis des millénaires pour diversifier l'alimentation humaine par la production d'œufs et de viande (Sauveur 1988, Blesbois 2005). Cela a été d'autant plus intéressant que l'enlèvement des œufs d'une couvée stimule une nouvelle ponte et permet ainsi la production d'un grand nombre d'œufs, si les conditions d'alimentation restent favorables... jusqu'à une certaine limite bien sûr. Cette limite a été cependant largement repoussée par la maîtrise des cycles de reproduction.

Le développement de l'industrie avicole au 20^{ème} siècle et l'introduction de la sélection généalogique ont permis la production de volailles, dont les performances de ponte sont maintenant très standardisées. Les cycles de reproduction ont été optimisés en utilisant des photopériodes optimales et des aliments adaptés aux besoins énergétiques élevés, nécessaires pour une production intensive d'œufs. En environnement contrôlé, poules pondeuses, cailles et canes pékin peuvent produire un œuf par jour (voire plus) tout au long de l'année. Des biotechnologies ont également pris leur essor : incubation, Insémination Artificielle (IA) et conservation de la semence s'appuient sur les originalités du système de reproduction et de fécondation aviaire (Blesbois 2005, Batellier *et al* 2005, Govoroun et Batellier 2005, Blesbois et Brillard 2005, Héraut *et al* 2005).

L'objectif de cette revue est de faire le point sur les principales particularités

de la biologie des gamètes aviaires qui concourent à un système de fécondation spécifique et original. Nous développerons également les applications qui en découlent pour la gestion de la fertilité des reproducteurs et pour les biotechnologies de la conservation des ressources génétiques.

1 / Le gamète femelle «mature»

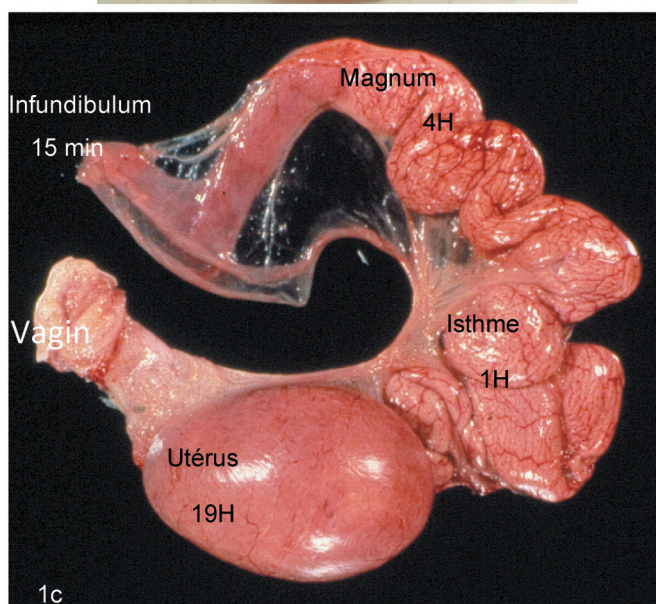
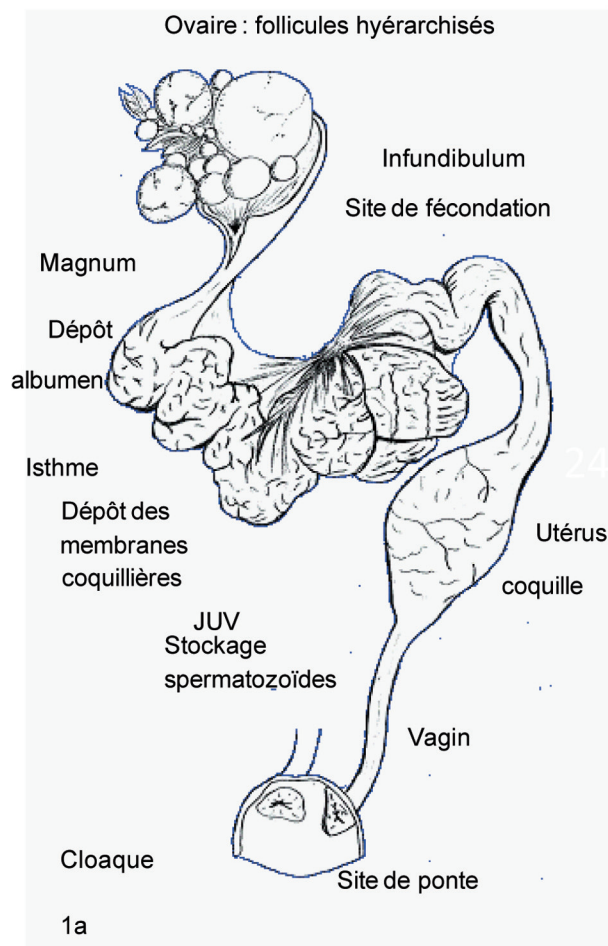
Le gamète femelle, l'ovocyte, est produit dans l'ovaire gauche bien souvent unique de la femelle adulte. Dans cet article, nous décrirons l'ovule mature présent dans les gros follicules (F6) de la grappe ovarienne de la femelle adulte et dont la libération dans l'infundibulum (ponte ovulaire) permet d'engager le processus de fécondation (figures 1 et 2). L'ovogénèse et la folliculogénèse sont par ailleurs bien décrits dans plusieurs ouvrages récents (Johnson et Woods 2007, Nys 2010). L'ovocyte mature d'oiseau est volumineux (en moyenne 3-4 cm de diamètre, mais avec de très grandes variations en fonction des espèces) et principalement composé de vitellus (figures 2a et 2b). A la surface du vitellus, le disque germinal (3-5 mm de diamètre) forme le pôle animal. Le disque germinal contient du vitellus blanc, la plupart des organites cytoplasmiques et le matériel génétique. Comme chez la plupart des vertébrés, l'ovocyte mature est ovulé alors que, dans son noyau (au pôle animal), les chromosomes sont en métaphase de deuxième division méiotique. Une particularité cependant : à l'inverse de ce qui est observé chez les mammifères, la femelle porte le sexe hétérogamétique (ZW), les mâles étant ZZ. Les ovocytes matures, haploïdes possèdent donc un seul des chromosomes sexuels, soit Z soit W. Si la fécondation suit l'ovulation,

Figure 1. Système reproducteur de la poule adulte.

1a. Schéma de l'ovaire et de l'oviducte de poule. D'après Romanoff et Romanoff, 1949, adapté par Brèque *et al* (2003)

1b. L'ovaire (gauche) et sa grappe ovarienne (Elis 2007). Remarquez la taille croissante des follicules qui montre une hiérarchie folliculaire précise, garante d'un bon ton taux de ponte. Le follicule le plus gros est celui qui ovulera dans les prochaines 24 h, le suivant vers environ 48 h etc...

1c. Un oviducte de poule pondeuse (Elis 2007). Sur cette photo, la forme de l'utérus (également nommé glande coquillière, en anglais «shell gland», figure 5) indique qu'il contient un œuf dont la coquille est en cours de calcification.



l'ovocyte terminera sa deuxième division méiotique et expulsera son deuxième globule polaire. Précisons qu'un certain taux de parthénogénèse existe chez les oiseaux en absence de spermatozoïde (par exemple par fusion du deuxième globule polaire avec le noyau de l'ovocyte haploïde). Cette propriété a même pu être sélectionnée chez la dinde et chez la caille (Parker *et al* 2010).

Les autres compartiments de l'ovocyte sont le vitellus, surmonté d'une couche périphérique riche en ARN dit «extra-embryonnaire» et l'ensemble est entouré par la membrane plasmique de l'ovocyte, puis par la Membrane Périvitelline Interne (MPVI).

Le vitellus, encore appelé «jaune», est une émulsion contenant une partie aqueuse (environ 48% d'eau), des lipoprotéines riches en triglycérides, et diverses protéines et stéroïdes. Sa principale fonction est d'assurer les

apports énergétiques permettant la croissance ultérieure de l'embryon. Les lipides sont les premiers constituants biochimiques de l'œuf puisque le rapport lipides/protéines est de 2/1. Ils sont intégralement associés à des complexes lipoprotéiques et constitués majoritairement de triglycérides (62%), de phospholipides (33%) et de moins de 5% de cholestérol (Guerin-Dubiard *et al* 2010). Les caroténoïdes, qui donnent la couleur au jaune, représentent moins de 1% des lipides. La majorité des protéines du jaune est associée à des lipides pour former des lipoprotéines de basse densité (66%), ou de haute densité (16%) de la matière sèche. En plus du jaune, l'ovocyte accumule des ARN messagers et des hormones qui peuvent avoir un impact sur la fécondation et sur le développement précoce de l'embryon. Chez la caille, deux pools d'ARN messager ont été décrits, un dans le disque germinatif et l'autre, plus abondant en

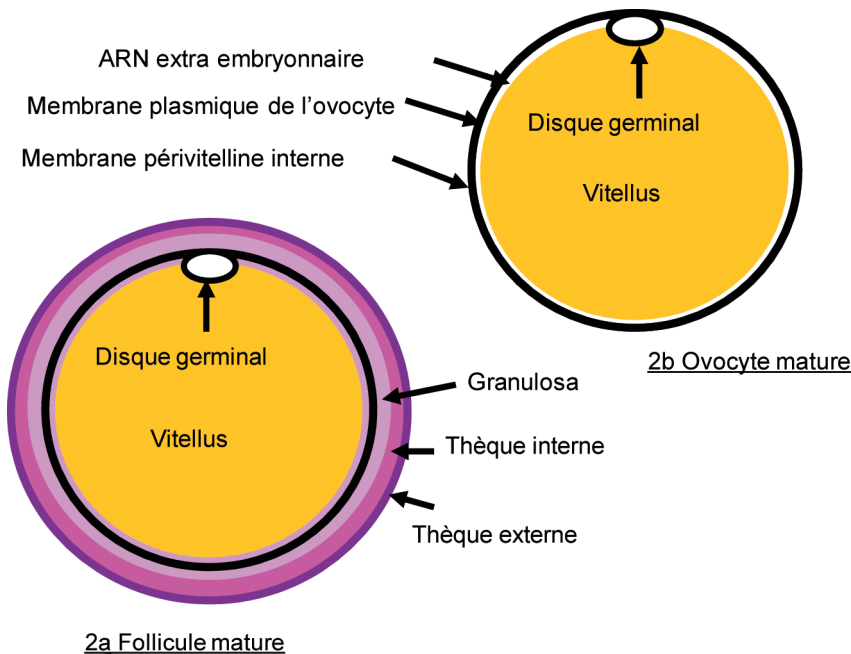
périphérie du vitellus. Le pool «extra-embryonnaire» périphérique diminue de 80% après la fécondation (Malewska et Olszanska 1999). Chez la poule, le stock d'ARN messagers ovocytaires est à son maximum dans l'ovocyte pré-ovulatoire. Ces ARN sont très probablement stockés afin d'être utilisés ultérieurement pour les besoins de synthèses protéiques, lors de la fécondation et du développement précoce de l'embryon. En effet, le génome embryonnaire ne prend le relais du génome de l'ovocyte qu'environ 24 h après la fécondation quand l'embryon contient déjà 30 à 50 000 cellules (Elis *et al* 2008). C'est donc l'ovocyte seul, avec ses stocks d'ARN, qui supporte le démarrage de l'embryon.

Stéroïdes et hormones thyroïdiennes sont également bien présents dans l'ovocyte mature. Leur rôle est important dans le développement et la

Figure 2. L'ovocyte de poule (adapté de Elis 2007).

2a. Schéma d'un follicule mature prêt à ovuler. En périphérie, de l'extérieur vers l'intérieur, remarquez successivement les thèques externes puis interne et la couche de cellules de granulosa. L'ovocyte est entouré par ces trois couches.

2b. Schéma d'un ovocyte mature. Remarquez le disque germinal à la surface de l'ovocyte et la couche d'ARN extra embryonnaire en périphérie du vitellus. La membrane plasmique située juste sous la membrane périvitelline interne est peu visible.



croissance des organes de l'embryon comme le cerveau et les gonades. Ils conditionnent aussi les comportements ultérieurs, par exemple le comportement sexuel (Johnson et Woods 2007).

La membrane plasmique de l'ovocyte qui entoure le vitellus et le pôle animal a fait l'objet de très peu d'études et sa continuité même est parfois questionnée. Elle est entourée par la MPVI qui constitue la couche la plus externe de l'ovocyte mature. Chez tous les vertébrés, ovipares comme vivipares, l'ovocyte est entouré d'une membrane extracellulaire qui représente le site initial de contact entre les spermatozoïdes et l'ovocyte lors de la fécondation. La MPVI assure cette fonction chez les oiseaux et est donc considérée comme l'homologue du chorion des poissons ou de la Zone Pellucide (ZP) des mammifères. Comme chez ses «homologues» poissons ou mammifères, la MPVI est une membrane extracellulaire composée principalement de protéines ZP (ainsi nommées car identifiées initialement dans la zone pellucide mammalienne), qui est une famille de glycoprotéines très conservées, aux rôles multiples et qui contiennent toutes un «ZP-domaine» d'environ 260 acides aminés (cf. revue de Wassarman et Litscher 2010). A l'inverse de la zone pellucide mam-

malienne, la MPVI aviaire est une fine couche fibreuse qui se rompt facilement y compris sous le poids de l'ovocyte. Après la fécondation, une autre membrane périvitelline, la Membrane Périvitelline Externe (MPVE), plus épaisse, est ajoutée (cf. § 3).

La MPVI n'exerce pas le rôle de barrière que la ZP mammalienne joue pour empêcher les spermatozoïdes surnuméraires ou ceux d'autres espèces de pénétrer dans l'œuf. Au contraire, la polyspermie est physiologique chez les oiseaux et la fécondation interspécifique assez courante. Cette dernière est utilisée pour développer des hybrides d'espèces assez lointaines les unes des autres. Par exemple, les hybrides entre deux espèces de canards assez éloignées (croisement canes Pékin et canards de Barbarie), sont devenus la base de l'élevage de canards mulards pour la production de viande et de foie gras.

La synthèse des protéines ZP de la MPVI résulte de divers mécanismes. Ainsi, chez les oiseaux (contrairement aux mammifères), la ZP1 est sécrétée par le foie (Bausek *et al* 2000) puis transportée via la circulation sanguine dans le follicule puis l'ovocyte. La ZP3 est en revanche synthétisée par les cel-

lules de granulosa (Waclawek *et al* 1998) alors que la ZPD est fabriquée par l'ovocyte à la fin de sa maturation (Elis *et al* 2008). Le nombre et la nomenclature des protéines ZP de la MPVI est encore confus. Si Mann (2008) dénombre 8 protéines ZP, Goudet *et al* (2008) en signalent 6. Leur rôle est lui aussi encore assez mal connu, d'autant que la spécificité d'action de ces protéines semble peu marquée (Horrocks *et al* 2000) et que le stade de maturation de la MPVI (avant ou après ovulation/fécondation) est peu discriminant pour activer le spermatozoïde (Lemoine *et al* 2008). Cependant, l'implication de ZP1, ZP3/ZPC et ZPD dans les premières interactions entre spermatozoïdes et ovocytes est maintenant bien admise (Bausek *et al* 2004, Han *et al* 2010).

2 / Le gamète mâle et son devenir dans le tractus femelle

Les spermatozoïdes d'oiseaux sont produits par les deux testicules (gauche et droit) logés à l'intérieur de la cavité abdominale. La spermatogénèse se produit donc à la température du reste du corps de ces animaux homéothermes (41-43°C chez le coq). D'une façon générale, spermatogénèse et transport des gamètes dans les voies déférentes mâles sont des phénomènes rapides (cf. revue de Aire 2007), qui contrastent avec la longue durée de conservation des mêmes spermatozoïdes dans les voies génitales femelles. A titre d'exemple, chez le coq, la durée de la spermatogénèse est d'environ 14 jours, le transit dans les voies déférentes mâles d'environ 24 h, mais la conservation des spermatozoïdes féconds dans les Glandes Utéro-Vaginales (GUV) de la femelle peut aller jusqu'à 3 semaines (cf. revue de De Reviers 1988). Au cours de la saison sexuelle, la production spermatique est orientée vers la production d'un maximum de gamètes à un moindre «coût biologique». De fait, la concentration en spermatozoïdes du sperme éjaculé peut être très élevée (10 milliards/mL chez le dindon) mais le volume de sperme réduit (volume moyen d'éjaculat, 200 µL chez le dindon). Les fonctions des voies déférentes mâles sont bien souvent réduites au minimum (pas de glande annexe comme chez les mammifères) et, dans beaucoup d'espèces, le phallus a complètement disparu (ex : galliformes). D'ailleurs, à la sortie du testicule, les spermatozoïdes possèdent déjà l'essentiel de leur capacité de motilité (Ashizawa et Sano 1990) et un pouvoir fécondant non négligeable (Howarth 1983). Ces capacités se renforcent quand même le long de l'épididyme.

Mais le challenge majeur des spermatozoïdes aviaires intervient après l'éjaculation. La sélection des spermatozoïdes dans les voies femelles est en effet drastique (ex : chez le coq, 1 spermatozoïde éjaculé sur 10 000 accède au site de fécondation (Brillard 1993)). Cette adaptation biologique a d'ailleurs donné lieu à la théorie connue sous le nom de stratégie de compétition spermatique, partie «gamétique» de la compétition entre mâles reproducteurs (Birkhead et Brillard 2007).

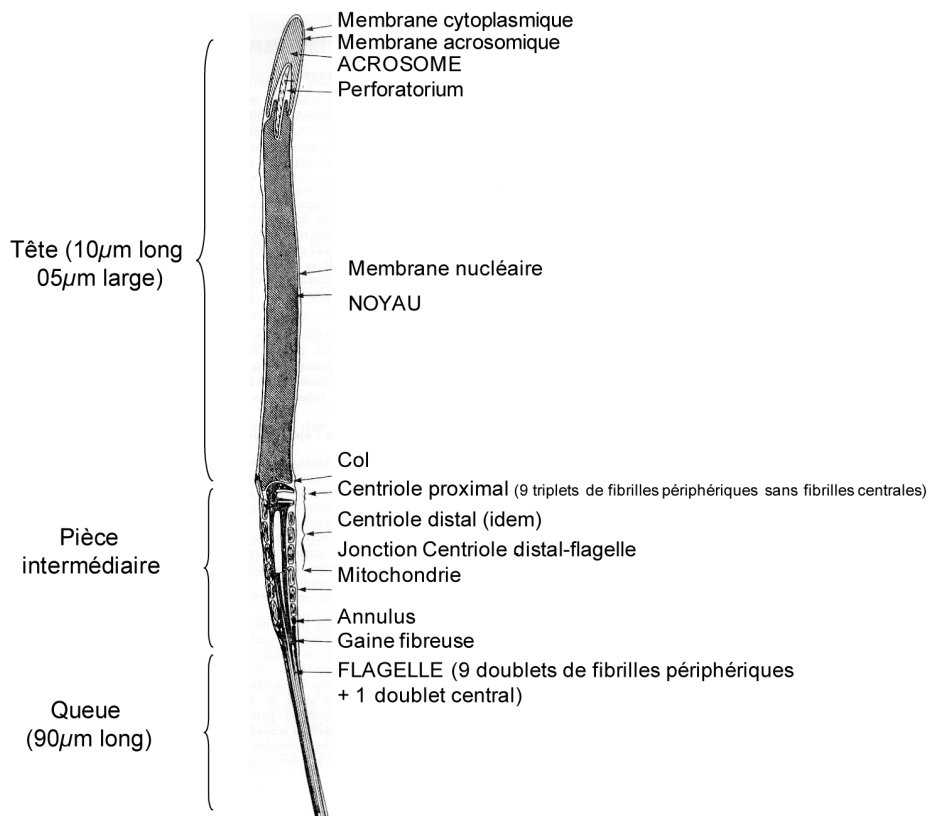
En raison de l'importance du transit des gamètes mâles dans les voies femelles, nous allons maintenant décrire plus précisément la semence telle qu'elle est à l'éjaculation et son devenir dans l'oviducte jusqu'au site de fécondation.

2.1 / Le sperme éjaculé

Comme dans toutes les espèces animales, celui-ci est composé de spermatozoïdes et de plasma séminal. Les spermatozoïdes aviaires présentent des caractéristiques communes aux espèces amniotes et sont adaptés à leur système complexe de fécondation interne (Jamieson 2007). Ce sont des gamètes filiformes qui comportent une tête, une pièce intermédiaire et un flagelle (figures 3 et 4). La tête contient l'acrosome et le noyau. L'acrosome est conique et assez petit (2,5 μm de long, 0,5 de large chez le coq). Il contient la vésicule acrosomique, structure dérivée de l'appareil de Golgi qui fonctionne comme un réservoir de calcium et contient plusieurs enzymes protéolytiques utiles au moment de la fécondation. Parmi elles, l'acrosine, majoritairement sous forme de pro-acrosine dans le sperme éjaculé, serait indispensable à l'hydrolyse de la MPVI au moment de la fécondation (Brown et Hartree 1976, Bakst et Howarth 1977). D'autres enzymes hydrolytiques sont également présentes comme la hyaluronidase et la N-acetyl-beta-glucosaminidase. Sous la vésicule acrosomique se trouve une structure rigide en pointe à base d'actine, le perforatorium, connu chez les insectes pour participer à la pénétration des annexes de l'ovocyte, mais dont le rôle chez les oiseaux n'est pas connu. En dessous de l'acrosome, le noyau (0,5x6 μm chez le coq), également filiforme et entouré d'une double membrane nucléaire, est très condensé. Cette condensation extrême constitue une garantie pour la protection du noyau avant qu'il ne soit intégré à l'ovocyte. Chez certaines espèces, en particuliers de passeriformes, une gaine hélicoïdale entoure la tête donnant un aspect «vrillé» au spermatozoïde.

La pièce intermédiaire (5-6 μm de long chez le coq) est située juste en dessous du noyau. Elle est composée d'un

Figure 3. Schéma de l'ultrastructure d'un spermatozoïde de coq (d'après De Reviers M., 1988).



centriole proximal, d'un centriole distal très allongé entouré d'une gaine mitochondriale, l'ensemble permettant à ces gamètes sans réserve énergétique d'assurer le métabolisme d'entretien et surtout la motilité du flagelle, indispensable pour accéder d'abord aux glandes utéro-vaginales, puis pour remonter au site de fécondation et réaliser cette dernière. Le nombre de mitochondries varie beaucoup en fonction des espèces (une trentaine chez le coq, près de 150 chez la caille japonaise) et elles peuvent se prolonger assez loin dans le flagelle. Le flagelle constitue la partie la plus

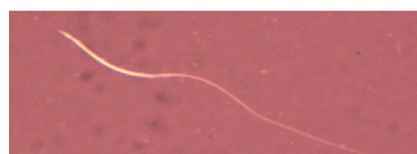
longue du spermatozoïde (70 à 90 μm de long chez le coq) (Korn et al 2000). Il prend naissance au niveau du centriole distal de la pièce intermédiaire à laquelle sont rattachés les deux filaments centraux du complexe axonémal. L'axonème comprend un doublet central et neuf doublets de microtubules périphériques. Il est constitué principalement de tubuline sous forme de dimères de dynéine. Chez la plupart des oiseaux (sauf les passeriformes), l'axonème est entouré d'une gaine fibreuse sur une grande partie du flagelle. Seule la partie distale n'en possède pas.

Figure 4. Photos de spermatozoïdes de coq au microscope optique.

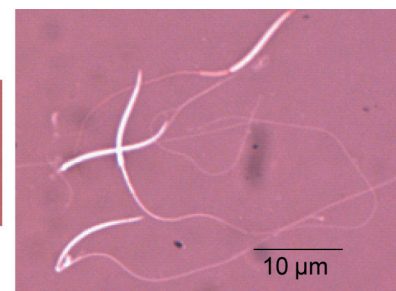
4a et 4b. Spermatozoïdes de coq colorés à l'éosine-nigrosine. Les spermatozoïdes «blancs» sont vivants, ceux qui sont partiellement ou totalement roses sont considérés comme morts (photo de I. Grasseau, INRA).

4a. Spermatozoïde vivant et normal

4b. Spermatozoïdes anormaux, cassés ou morts.



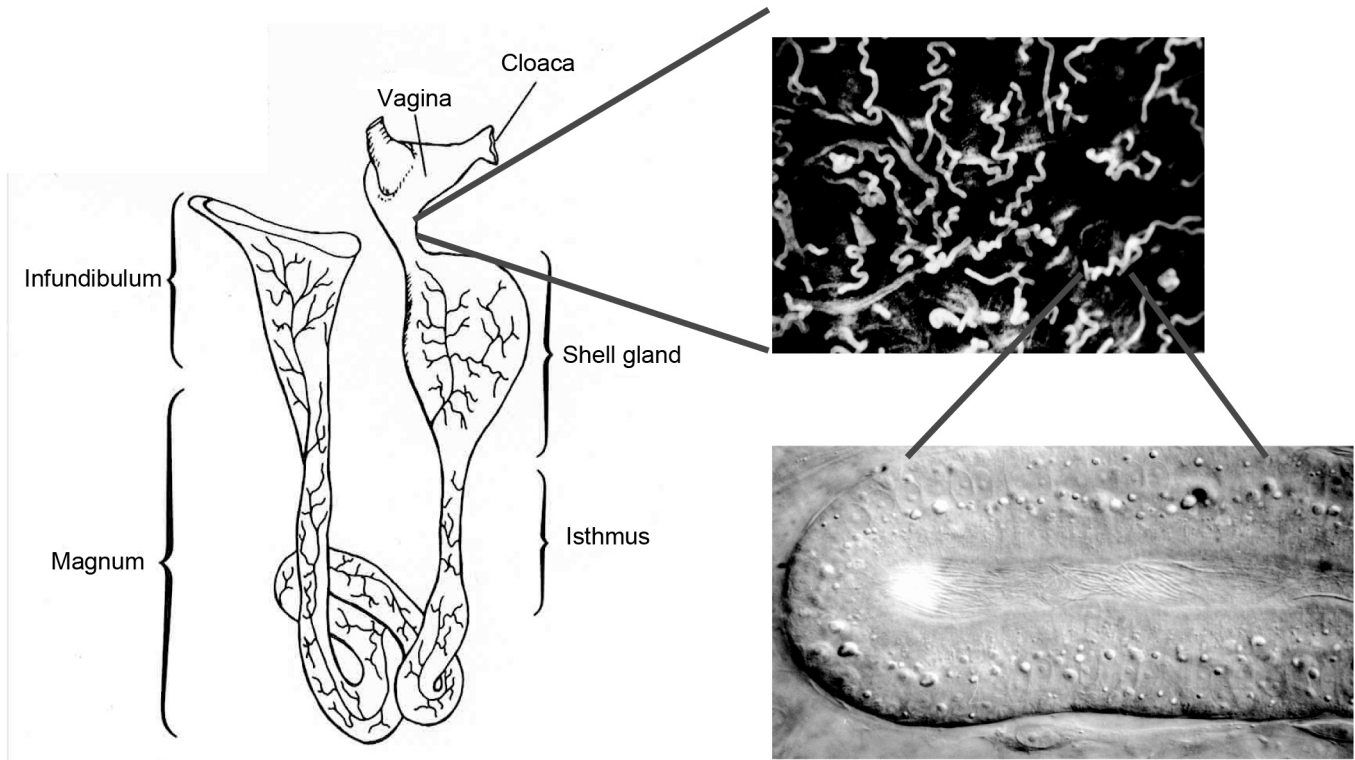
4a



4b

Figure 5. Glandes utéro-vaginales chez la poule (photo M. Bakst, USDA, Stepinska et Bakst 2007).

A gauche, un schéma d'oviducte. En haut à droite, les glandes utéro-vaginales séparées après dispersion enzymatique. En bas à droite, une glande utéro-vaginale remplie de spermatozoïdes. Des spermatozoïdes fluorescents (Hoescht 33258) sont observés dans la lumière de la glande. Les têtes des spermatozoïdes sont orientées vers le fond des glandes. Le diamètre extérieur de la glande est d'environ 40 µm.



A l'éjaculation, les spermatozoïdes sont dilués dans le plasma séminal. En absence de glande annexe dans le tractus génital mâle, il semble que les cellules qui tapissent les voies déférentes participent à son élaboration (De Reviens 1988). C'est un milieu biologique à pH neutre ou légèrement basique selon les espèces et de pression osmotique comprise entre 300 et 400 mOsm, soutenue par une forte concentration en acides aminés comme le glutamate. Le plasma séminal est riche en lipides, avec des concentrations élevées en cholestérol et phospholipides issus de nombreuses vésicules lipidiques et de lipoprotéines (HDL, VLDL) (Blesbois et Hermier 1990, Douard *et al* 2000). Dix fois moins concentré en protéines que le plasma sanguin, sa protéine la plus abondante est une «serum like» albumine (Blesbois et Caffin 1992). Le plasma séminal stimule la motilité des gamètes et est donc utile lors de l'éjaculation. Il contient des fractions de haut poids moléculaire favorables au maintien du pouvoir fécondant et d'autres de faible poids moléculaire, au contraire défavorables. Il n'est cependant pas un bon milieu de conservation *in vitro* pour les spermato-

zoïdes et est éliminé avant leur stockage dans les glandes utéro-vaginales (Blesbois et De Reviens 1992, Etches 1996).

2.2 / Le devenir des spermatozoïdes dans les voies femelles

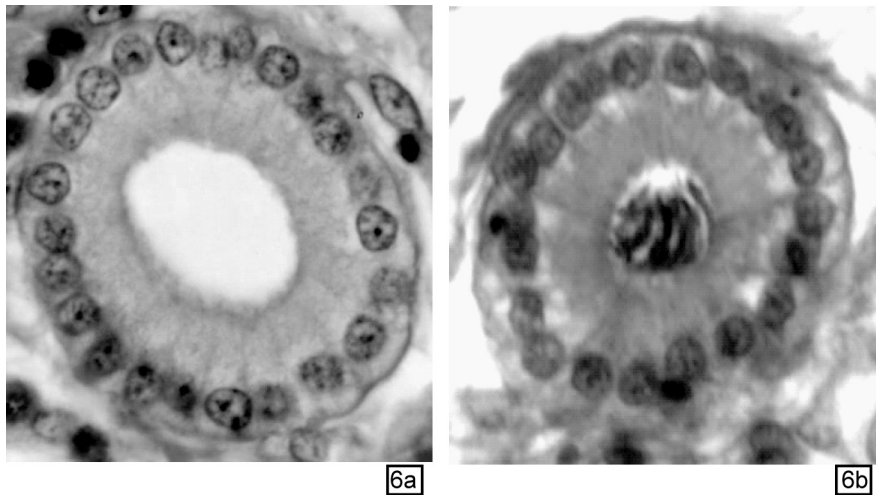
Après l'accouplement ou l'IA, les spermatozoïdes sont déposés dans le vagin. Dès lors, ils subissent un processus drastique de sélection vaginale. Seulement 1% d'entre eux sont retrouvés par la suite dans les glandes utéro-vaginales (revue de Bakst 1994). La sélection des spermatozoïdes serait partiellement basée sur leurs capacités de motilité et permettrait d'éliminer les gamètes de mauvaise qualité qui seraient piégés dans le mucus vaginal, avant d'accéder aux glandes utéro-vaginales. Mais la motilité des spermatozoïdes est loin d'être le seul facteur en cause. Le rôle de mécanismes immunitaires, mettant en jeu l'exclusion de certains spermatozoïdes porteurs d'immunoglobulines particulières, a aussi été suggéré (Steele et Wishart 1992). L'activité de l'épithélium cilié qui borde la muqueuse vaginale semble également importante. Les femelles pourraient

l'utiliser pour faire une sélection post accouplement des spermatozoïdes à conserver et donc des «pères» de leurs descendants (Pizarri *et al* 2002, Birkhead *et al* 2007). Ainsi, les spermatozoïdes issus d'accouplements réalisés avec des mâles «de second plan» pourraient être rapidement expulsés. Au contraire, les gamètes provenant de mâles appréciés par les femelles, pourraient être favorisés par l'activité ciliaire, afin d'accéder rapidement aux glandes de stockage.

Les femelles oiseaux possèdent en commun avec les reptiles et les hyménoptères des structures spécifiques de l'oviducte pour le stockage des spermatozoïdes. Les glandes utéro-vaginales sont des structures cylindriques, généralement non branchées qui sont nichées dans les replis de la muqueuse de la jonction entre le vagin et l'utérus (figures 5 et 6, revue de Stepinska et Bakst 2007). Leur nombre dépend des espèces (environ 200 chez certains passeriformes, 3000 chez la poule, jusqu'à 20 000 chez la dinde). Les spermatozoïdes peuvent y rester féconds pour des durées également caractéristiques de l'espèce, et qui vont de 10 jours chez la caille

Figure 6. Coupes transversales de glandes utéro-vaginales chez la poule (photo J.P. Brillard, INRA).

- 6a. Glandes utéro-vaginales sans spermatozoïdes
6b. Glandes utéro-vaginales remplies de spermatozoïdes



jusqu'à 3 mois chez la dinde. Cette durée de stockage est héritable et a servi de base à la sélection de femelles plus fertiles chez la poule ou la cane. Un exemple de durée de période fertile (nombre de jours où les œufs sont pondus fertiles, après un accouplement ou une insémination) est donné chez la poule pondeuse sur la figure 7 (revue de De Reviers 1988). D'autres glandes de stockage ont été décrites au niveau de l'infundibulum, mais celles-ci ont été beaucoup moins bien étudiées et pourraient ne pas exister dans toutes les espèces.

Dans les glandes utéro-vaginales, le milieu intra-glandulaire et les interactions entre les cellules des glandes et les spermatozoïdes sont certainement impliqués dans la survie et la conservation du pouvoir fécondant. Les spermatozoïdes sont maintenus dans un état «quiescent» ou leur activité métabolique est réduite par différents facteurs, qui incluent de fortes concentrations en calcium et en zinc et un pH relativement acide (Holm *et al* 2000).

Après une durée de stockage variable dans les glandes utéro-vaginales, les

spermatozoïdes sont libérés dans la lumière de l'utérus par des mécanismes inconnus mais qui pourraient être passifs selon certains auteurs ou au contraire impliquer la motilité des gamètes (Froman 2003, Stepinska et Bakst 2007). Les mécanismes de remontée des spermatozoïdes jusqu'au site de fécondation dans l'infundibulum n'ont pas non plus été décrits, mais pourraient également être passifs selon certains auteurs (Brillard 1990). La capacitation des spermatozoïdes (série de modifications biochimiques et biophysiques qui commencent dans l'oviducte par un efflux de cholestérol des membranes plasmiques et qui aboutissent à une déstabilisation membranaire qui permet la réaction acrosomique) semble ne pas exister chez les oiseaux. En effet, des spermatozoïdes éjaculés sont capables d'initier sans délai cette réaction à condition d'être en présence de calcium et de membrane périvitelline, ou de calcium et d'ionophore calcique. Ce dernier permet de «forcer» l'entrée du calcium extracellulaire dans le cytoplasme des spermatozoïdes (Lemoine *et al* 2008).

3 / L'oviducte de poule, un double rôle

Chez les oiseaux, l'oviducte représente les voies génitales de la femelle. Cette appellation diffère de celle qui est utilisée chez les mammifères chez qui, ce que l'on nomme «oviducte», est juste la partie haute du tractus génital.

Quoiqu'il en soit, l'oviducte de l'oiseau femelle a une double fonction. Premièrement, cet oviducte est chargé de «récupérer» lors de l'ovulation l'ovocyte mature, puis de l'entourer successivement d'une MPVE, du blanc d'œuf, des membranes coquillères et de la coquille. L'ensemble est indispensable au développement de l'embryon. Sa deuxième fonction consiste à assurer la remontée des spermatozoïdes vers le site de fécondation, à abriter cette fécondation puis à soutenir les premières divisions zygotiques jusqu'à la ponte finale de l'œuf (oviposition) quand l'embryon a alors 30 à 50 000 cellules.

Pour répondre à cette double fonction, l'oviducte a adopté une compartimentation très précise (figure 1) que nous allons décrire en partant de sa partie haute, l'infundibulum et en terminant par le vagin.

3.1 / L'infundibulum

L'infundibulum est le site de fécondation. A l'ovulation, l'infundibulum déclenche des contractions qui le

Figure 7. Evolution du nombre d'œufs pondus fertiles après une insémination unique chez la poule pondeuse Leghorn (d'après De Reviers 1988).

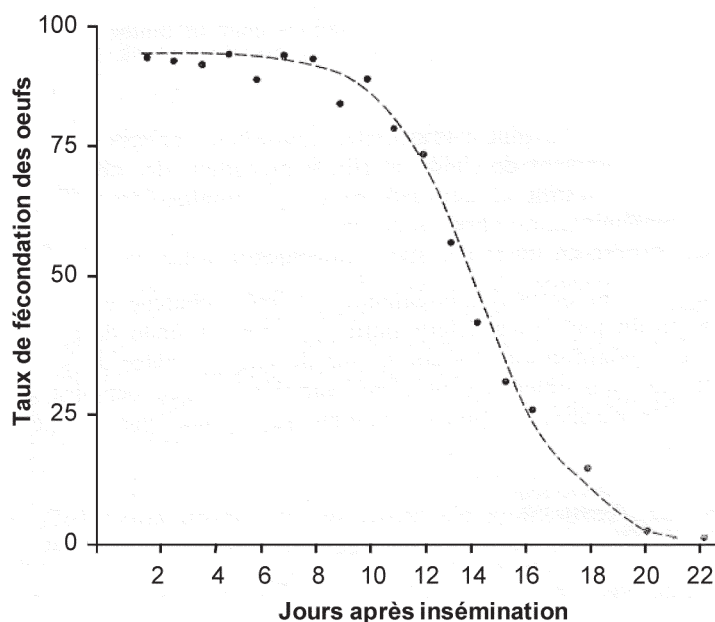
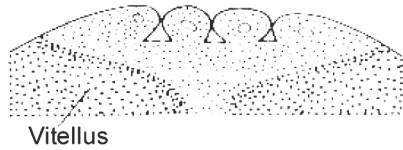
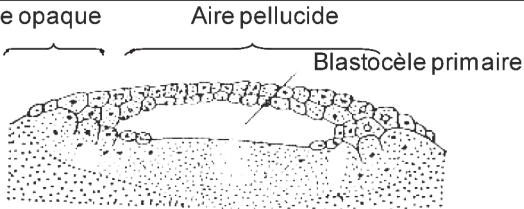
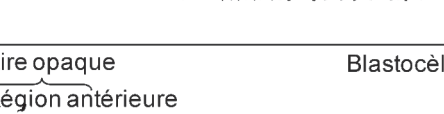
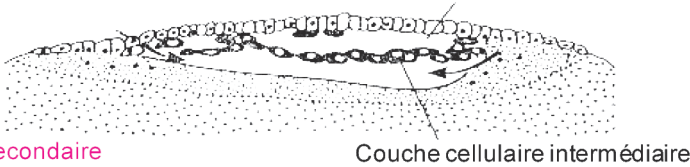


Figure 8. Schéma des premières segmentations embryonnaires dans l'oviducte de poule (d'après Sauveur 1988).

Temps après ovulation	Site anatomique	
15 mn	Infundibulum	Fécondation
4-5h	Isthme	 <p>Morula Vitellus</p>
Coupe au stade 8		
5-18h	Utérus	 <p>Aire opaque Aire pellucide Blastocèle primaire</p>
18-23h	Utérus	 <p>Aire opaque Région antérieure</p>
23-25h	Utérus	 <p>Aire opaque Blastocèle secondaire Blastula secondaire Couche cellulaire intermédiaire</p>

conduiront à «happer» l'ovocyte mûr encore sur la grappe ovarienne. Ce rôle actif de l'infundibulum facilite le maintien de la cohésion de l'ovocyte qui, à ce stade, est entouré d'une seule membrane périvitelline, la MPVI, et est très fragile. Outre les «replis» ou glandes de stockage «court» des spermatozoïdes, l'infundibulum contiendrait également des «corps calciques» qui pourraient être utiles à la fécondation (Rabbani *et al* 2006, 2007). Mais l'infundibulum est aussi une zone sécrétoire. Il est responsable du dépôt d'une ou deux «extracouches» de membrane périvitelline. La nomenclature n'est pas encore très claire à ce sujet. Ainsi Mann (2008) suggère l'existence de 2 MPVE alors que Stepinska et Bakst (2007) évoquent plutôt d'abord le dépôt de matériel extracellulaire non constitué en membrane organisée, puis seulement le dépôt d'une seule MPVE. Les principaux composants de la MPVE sont, en premier, du lysozyme (60% de la matière sèche), un complexe à base d'ovomucine équivalente à celle du blanc d'œuf, et deux protéines basiques, la «Vitellin Membrane Outer I» (VMO I) de 17.5 Kda et la «Vitellin Membrane Outer II» (VMO II) de 6 Kda. La VMO II a récemment été

identifiée comme étant la beta défensine aviaire 11, un peptide antimicrobien également présent dans le blanc et dans la coquille. La MPVE a aussi été décrite comme ayant une fonction de barrière à la polyspermie une fois la fécondation réussie. Cependant, plusieurs expériences *in vitro* ont bien montré que les spermatozoïdes traversaient aisément la MPVE (Lemoine *et al* 2008).

3.2 / Le magnum

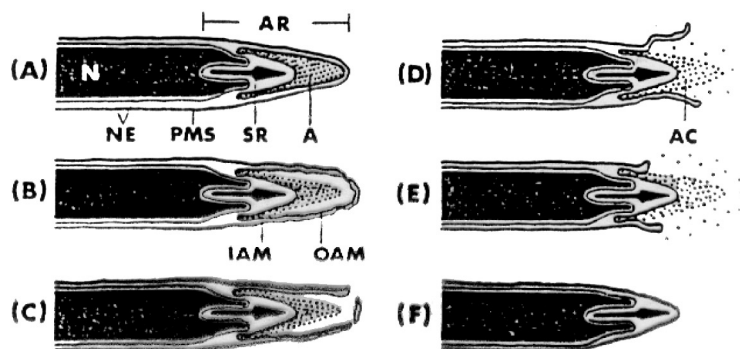
Après dépôt de la MPVE, l'ovocyte, fécondé ou non, passe environ 4 h dans le magnum, principal lieu de sécrétion des protéines du blanc d'œuf (Sauveur 1988, Guérin-Dubiard *et al* 2010). Les protéines représentent 90% de la matière sèche du blanc. Parmi elles, l'ovalbumine représente plus de 50% des protéines mais on dénombre aujourd'hui plus de 12 familles différentes de protéines sécrétées par le magnum. L'eau reste cependant le principal composant du blanc (88%). L'hydratation du blanc se passe principalement dans les deux parties suivantes de l'oviducte, l'isthme où l'œuf séjourne environ 1h30 et surtout l'utérus où il passe près de 20 h. Si l'ovocyte a été fécondé, la fusion des pro-

nuclei mâle et femelle se produit 3 h après la fécondation, lorsque l'œuf est encore dans le magnum.

3.3 / L'oviducte distal et le zygote

La première division du nouveau zygote se produit au moment où l'œuf arrive dans l'isthme plus de 4 h après la fécondation. Les divisions du zygote vont alors s'enchaîner à un rythme très élevé (figure 8). Jusqu'au stade 32 cellules, elles sont perpendiculaires, puis ensuite parallèles à la surface du disque germinale. Une cavité subgerminale apparaît alors (blastocèle) et entraîne à la surface de ce qui est devenu un blastoderme situé dans l'utérus, l'apparition de deux zones concentriques, l'aire opaque en périphérie et l'aire pellucide en zone centrale. A partir de ce stade (6-8 h avant la ponte), l'orientation et l'axe de symétrie du futur embryon sont définitivement fixés, suite à l'enroulement des chalazes pendant la formation de la coquille. La ponte (ou oviposition) se produit 20 h après la première division du zygote, à un moment où le génome du nouvel embryon peut être activé si les conditions sont favorables (couvaison ou incubation).

Figure 9. Schéma du déroulement de la réaction acrosomique chez le coq (d'après Okamura et Nishiyama 1978a).



A : région antérieure de la tête de spermatozoïde intacte (AR : acrosome ; NE : enveloppe nucléaire ; SR : baguette sub-acrosomique ; PMS : membrane plasmique du spermatozoïde ; NE : enveloppe nucléaire).

B : étape initiale de la réaction acrosomique.

C : ouverture de l'acrosome dans sa région apicale par fusion avec la membrane plasmique et de la membrane acrosomique externe (OAM).

D et E : derniers stades de la réaction acrosomique, les membranes ont fusionné et disparaissent.

F : tête d'un spermatozoïde après la réaction acrosomique la membrane acrosomique interne (IAM) a fusionné avec la membrane plasmique pour former une membrane continue.

L'isthme est le principal lieu de sécrétion des membranes coquillères et de la partie inférieure de la matrice de la coquille. Le reste de la coquille et l'essentiel de l'hydratation du blanc sont réalisés dans l'utérus encore appelé «glande coquillière». Dans cette zone de l'oviducte, les concentrations en calcium peuvent être très élevées (jusqu'à 15 mMolaire) et les quantités de glucose peuvent atteindre 9 g/L. Ces deux composants peuvent être très importants pour la remontée des spermatozoïdes dans les voies femelles, l'un comme acteur indispensable à l'initiation du mouvement et comme second messager de signalisation, et l'autre comme «fuel» pour le métabolisme des spermatozoïdes (Dupuy et Blesbois 1996, Lemoine *et al* 2008). Après le dépôt de la coquille de l'œuf dans l'utérus, l'œuf est expulsé *via* un péristaltisme utérin et vaginal très efficace. Pour cette raison, l'accouplement ou l'IA sont très déconseillées dans les deux heures qui précèdent ou qui suivent l'expulsion de l'œuf car les spermatozoïdes ne réussissent alors pas à remonter à contre-courant pour accéder aux glandes utéro-vaginales. L'expulsion de l'œuf est nommée «oviposition» ou «ponte». A ce stade, l'embryon, au pôle germinal du jaune, est un blastoderme stade X (Eyal-Giladi et Kochac 1976). Le génome embryonnaire est alors prêt à prendre le relais du génome ovocytaire si les conditions (température, humidité, retournement) sont favorables à la poursuite du développement, donc en cas d'incubation ou de couvaion. Dans le cas

contraire, les œufs qui contiennent un embryon stoppent leur développement jusqu'au retour de conditions favorables.

4 / Mécanismes de la fécondation

4.1 / Membrane périvitelline interne et réaction acrosomique

Chez les oiseaux, la fécondation a lieu dans l'infundibulum, juste après la «ponte» ovocytaire et est initiée par la fixation des spermatozoïdes sur la MPVI. Cette fixation impliquerait les fractions N-Glycanes des protéines ZP de la MPVI (Horrocks *et al* 2000). Plus précisément, les fractions N-oligosaccharidiques avec des résidus terminaux N-acetyl-glucosamines des protéines ZP, pourraient contribuer à stimuler le déclenchement de la réaction acrosomique. Récemment, la proximité d'une fraction O-glycane (très conservée dans la phylogénie, importante pour la fixation des spermatozoïdes) et d'une région C-terminale, positivement sélectionnée et très variable de la ZP3 aviaire, a été montrée (Han *et al* 2010). Cet assemblage suggère un rôle concerté des deux régions de la ZP3 dans la régulation des spécificités de reconnaissance des gamètes (Wassarman 2010). Mais, chez les oiseaux, la spécificité de la MPVI pour déclencher la réaction acrosomique est faible puisque la MPVE ou les deux membranes périvitellines utilisées conjointement (MPVI + MPVE),

sont aussi efficaces (Lemoine *et al* 2008).

Chez le coq, *in vivo*, la fixation des spermatozoïdes sur la MPVI, entraîne l'activation de la voie de signalisation des PI3 Kinases (Lemoine *et al* 2009). En présence de calcium extracellulaire, les voies des kinases de type PKA et MAPK1 sont par la suite activées, permettant le déclenchement de la réaction acrosomique (Lemoine *et al* 2009).

La réaction acrosomique est une réaction d'exocytose qui existe chez les spermatozoïdes de toutes les espèces à fécondation interne et chez certaines espèces à fécondation externe comme l'oursin. Chez les oiseaux, elle permet de libérer le stock enzymatique facilitant la traversée de la MPVI, la mobilisation de calcium qui pourrait (entre autre) contribuer à l'activation de l'ovocyte et, sans doute, l'accessibilité des sites de fusion entre la membrane plasmique des spermatozoïdes et de l'ovocyte. Au cours de la réaction acrosomique, la membrane plasmique et la membrane externe de l'acrosome se rompent et fusionnent, ce qui conduit à leur vésiculation et finalement à leur disparition de la région acrosomique (figure 9, Okamura et Nishiyama 1978a). Le stock d'enzymes de l'acrosome est alors libéré. A la fin de la réaction acrosomique, la membrane interne de l'acrosome délimite l'extrémité antérieure du spermatozoïde.

Comme dans d'autres classes animales, le calcium joue un rôle central dans la réaction acrosomique aviaire. L'influx de calcium extracellulaire est le seul élément vraiment indispensable au déclenchement de la réaction *in vitro* (Lemoine *et al* 2008). Il serait suivi par plusieurs vagues d'augmentation du calcium intracellulaire. La première participerait à la stimulation de phospholipase C (PLC) permettant la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et l'ouverture d'autres canaux calciques intracellulaires qui eux même contribuent à la libération d'un stock important de calcium intra-acrosomique et à l'activation d'autres canaux, puis d'une nouvelle entrée massive de calcium extracellulaire (Roldan et Shi 2007). De très nombreux autres acteurs membranaires et intracellulaires seraient également mis en jeu dans la réaction acrosomique, mais la plupart n'ont pas encore été étudiés chez les oiseaux.

Lors de la fécondation aviaire, les spermatozoïdes se fixent préférentiellement sur la région de la MPVI qui recouvre le disque germinal. Vingt fois plus de spermatozoïdes se fixent sur cette zone et jusqu'à plusieurs centaines

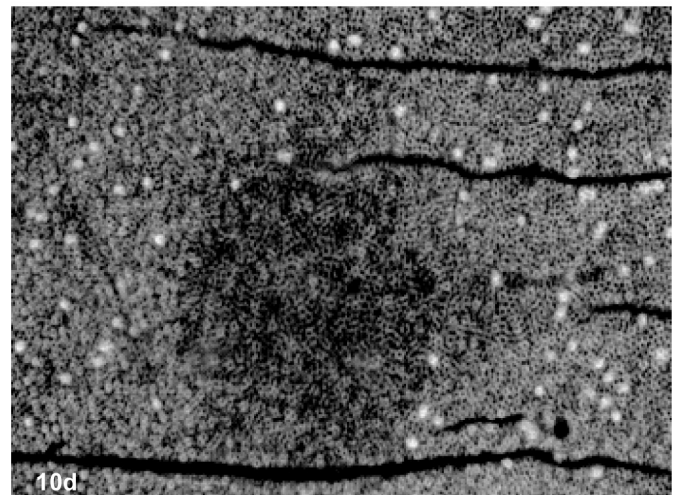
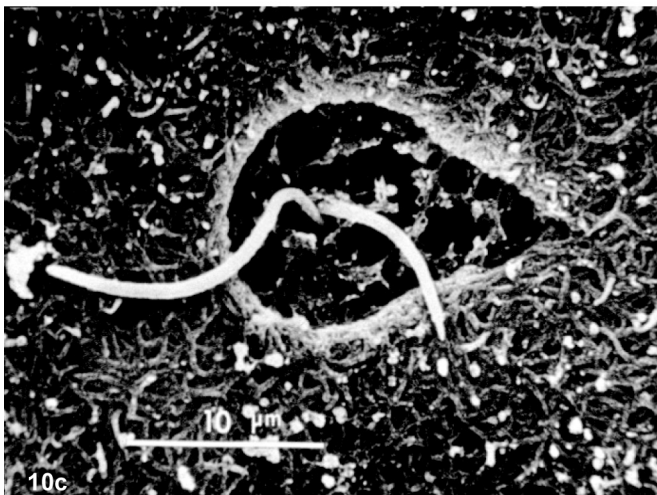
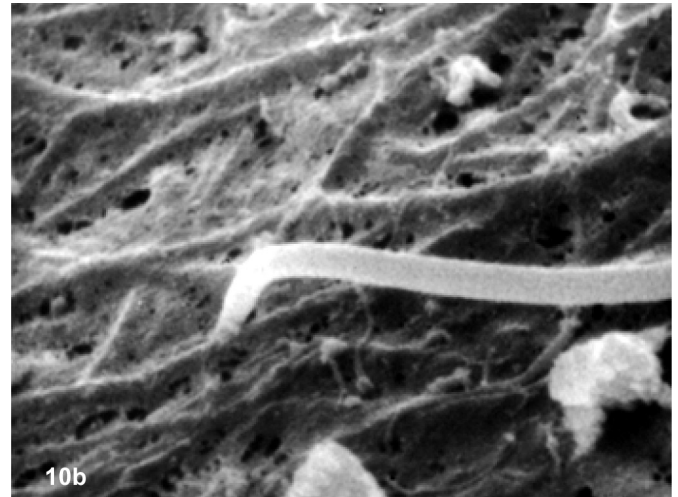
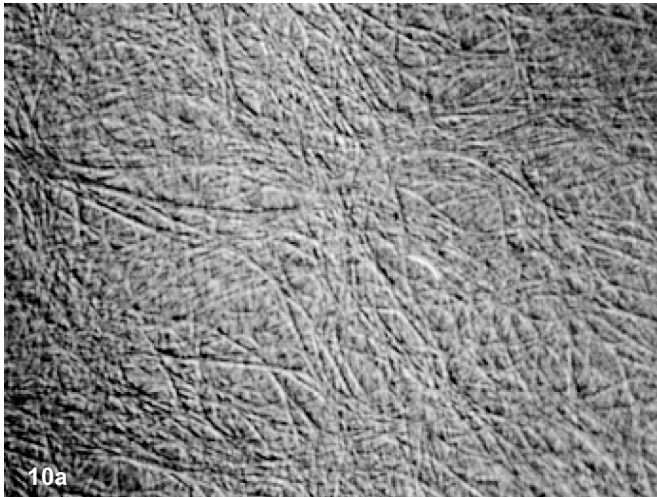
Figure 10. Membrane Périvitelline Interne (MPVI) et spermatozoïdes (photos Bakst M.R. USDA, Stepinska et Bakst 2007).

10a. Un spermatozoïde (marqué au Hoescht 33258) pris dans les mailles de la MPVI (tâche claire allongée légèrement à droite de la photo).

10b. Un spermatozoïde en train de pénétrer la MPVI.

10c. Un trou effectué par les spermatozoïdes dans la MPVI. Remarquez que deux spermatozoïdes sont engagés dans le même trou.

10d. Membrane périvitelline observée dans la région du pôle germinal de l'ovocyte après pénétration par les spermatozoïdes. Les petits ronds clairs indiquent les zones de la MPVI digérées par les spermatozoïdes. La zone centrale plus sombre indique la place du noyau de l'ovocyte. Remarquez que les zones denses en impacts des spermatozoïdes sont en périphérie du noyau de l'ovocyte.



de trous d'hydrolyse peuvent y être dénombrés (cf. revue de Stepinska et Bakst 2007). Les mécanismes de cette fixation préférentielle au pôle animal ne sont pas encore connus. Parmi les hypothèses, un nombre de sites de fixation des spermatozoïdes plus élevé ou une hydrolyse plus facile de cette région ont été suggérés. Enfin, la structure du disque germinal lui-même pourrait avoir un rôle puisque les projections des microvillosités de l'ovocyte sont plus nombreuses dans cette région. Notons que, lorsque les spermatozoïdes pénètrent la MPVI au niveau du disque germinal, le centre du disque n'est quasiment pas touché (figure 10, Stepinska et Bakst 2007). Cette restriction pourrait contribuer à protéger le pronucléus femelle, afin d'éviter qu'un nombre excessif de pronucléi mâles à proximité

du noyau ovocytaire, ne fragilise trop ce dernier.

4.2 / Fusion cellulaire, pronucléi et syngamie

Après la pénétration de la MPVI au niveau du disque germinal, l'apex de la tête du spermatozoïde a effectué la réaction acrosomique et se positionne contre l'ovocyte (figure 11, Okamura et Nishiyama 1978b). La surface de la membrane interne de l'acrosome et la membrane plasmique de l'ovocyte fusionnent, puis le contenu du spermatozoïde est intégré au cytoplasme ovocytaire. Cette opération est réalisée en plusieurs points puisque généralement plusieurs spermatozoïdes pénètrent dans l'ovocyte. Par la suite, les noyaux des spermatozoïdes se décondensent

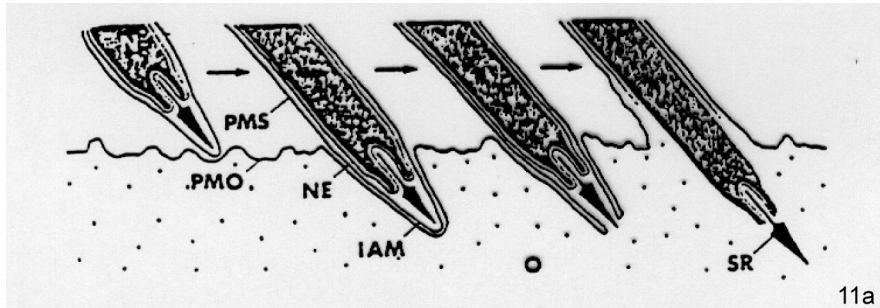
pour former les pronucléi mâles. L'enveloppe nucléaire est désintégrée, le noyau gonfle et change de forme pour devenir sphérique. Dans le même temps la chromatine est décondensée puis, à un stade plus avancé, la membrane nucléaire se reforme. En conséquence de la polyspermie, de nombreux pronucléi mâles sont formés dans le disque germinal. Chez la poule, entre 10 à 60 pronucléi ont pu être dénombrés.

Juste avant la syngamie (association d'un pronucléus mâle avec le pronucléus femelle), les pronucléi mâles surnuméraires ne peuvent pas être distingués du pronucléus qui fusionnera avec son partenaire ovocytaire. Les moteurs du choix du pronucléus mâle qui accèdera à la syngamie, donnent lieu à de

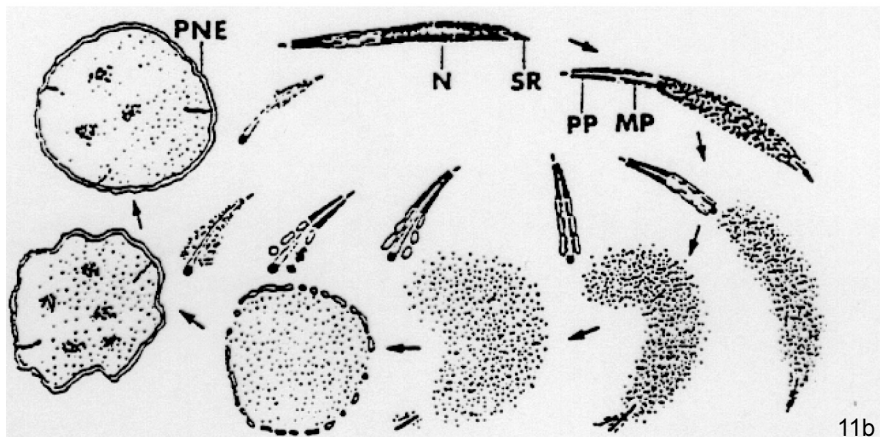
Figure 11. Schémas de la fusion ovocyte-spermatozoïde et formation des pronuclei mâles (d'après Okamura et Nishiyama 1978 a, b).

11a. Fusion entre la membrane plasmique des spermatozoïdes et la membrane plasmique ovocytaire.

11b. Transformation du spermatozoïde en pronucleus mâle dans le cytoplasme ovocytaire.



IAM : membrane acrosomale
 PMO : membrane plasmique de l'œuf
 NE : enveloppe nucléaire
 PMS : membrane plasmique du spermatozoïde
 O : ovocyte
 SR : baguette sub-acrosomale



PNE : enveloppe pronucleique
 N : noyau
 SR : baguette sub-acrosomale
 MP : pièce intermédiaire
 PP : pièce principale

nombreuses hypothèses. L'une d'entre elles, met en cause le point d'entrée le plus central possible (à l'exception de l'extrême centre) du spermatozoïde dans le disque germinal. Sur le modèle d'observations faites chez le triton, Stepinska et Olszanska (2003) ont suggéré que le spermatozoïde qui a eu la chance d'accéder à la meilleure zone d'«entrée» dans l'ovocyte, pourrait être favorisé dans sa course vers la syngamie par un gradient favorable d'activation du MPF (maturation/ M PHase-promoting factor). Le MPF pourrait faciliter la maturation du pronucleus mâle qui subirait alors une moindre attaque par les DNases de l'ovocyte.

Côté noyau ovocytaire, la formation du pronucleus femelle commence par l'achèvement de la seconde division méiotique au moment où les pronuclei mâles sont eux même formés (Perry 1987). Les moteurs de l'activation de l'ovocyte, lors de la fécondation ne sont pas encore bien connus chez les oiseaux. Cependant, de façon générale chez les vertébrés, l'activation est induite par l'entrée du spermatozoïde, qui provoque une augmentation de calcium intracellulaire dans l'ovocyte. Cette augmentation du calcium est à l'origine de la formation du pronucleus femelle. L'augmentation du calcium intra-ovocytaire est dérivée pour partie du reticu-

lum endoplasmique ovocytaire à travers l'action de l'IP₃ (cf. revue de Runft *et al* 2002). Les spermatozoïdes eux-mêmes, contiendraient un facteur activateur soluble qui est diffusé dans l'ovocyte au moment de la fusion et stimule directement l'IP₃. La phospholipase C zeta (PLC ζ) est le principal candidat pour être ce facteur des spermatozoïdes qui active l'ovocyte chez les mammifères. Chez les oiseaux, l'injection d'extraits de spermatozoïdes ou de PLC ζ cRNA de poulet dans des ovocytes de souris, a permis la libération de calcium et l'activation de l'ovocyte (Dong *et al* 2000, Coward *et al* 2005). Chez la caille, l'injection conjointe d'un spermatozoïde et de PLC ζ cRNA dans l'ovocyte, a montré son efficacité pour faciliter la formation du pronucleus femelle, la segmentation cytoplasmique et finalement le nombre de blastoderms formés (Mizushima *et al* 2008, 2009). Une quantité suffisante de PLC ζ cRNA peut d'ailleurs remplacer le spermatozoïde. Il semble donc bien, que, au moins chez la caille, la PLC ζ libérée par les spermatozoïdes soit aussi un candidat probable pour activer l'ovocyte. L'effet dose positif de PLC ζ cRNA, pourrait être relié à l'intérêt physiologique de la polyspermie dans les espèces aviaires. L'ovocyte pourrait être d'autant mieux activé que la dose de PLC ζ , elle-même proportionnelle au nombre de spermatozoïdes participant à la fécondation, est élevée.

Les pronuclei mâles surnuméraires ne participent pas à la syngamie et se dispersent à la périphérie du disque germinal, où ils peuvent engager les premières mitoses. Mais tous finissent par dégénérer lors des stades précoces de clivage, par des mécanismes qui sont encore inconnus. Les DNases du disque germinal ovocytaire sont très actives au moment de la formation des pronuclei et pourraient jouer un rôle important dans la dégénérescence des éléments surnuméraires (cf. revue de Stepinska et Bakst 2007). Elles ont été également mises en cause dans l'échec des transgénèses tentées via l'injection d'ADN dans des œufs récemment fécondés. Tout se passe comme si, chez les oiseaux, l'absence de barrière à la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte était compensée par une forte activité des DNases dans le disque germinal, cette activité étant destinée à dégrader en temps utile les pronuclei surnuméraires.

Mais finalement, quel est le rôle de cette polyspermie physiologique, et est-elle vraiment obligatoire ?

Depuis que Hrabia *et al* (2003) ont montré que l'injection d'un seul spermatozoïde dans l'ovocyte de caille permettait la fécondation, nous savons que

la polyspermie n'est pas absolument indispensable, au moins *in vitro*, pour démarrer la formation du zygote. Mais, comme nous l'avons vu, elle améliorerait l'efficacité de la fécondation puis du développement des embryons (Mizushima *et al* 2008, 2009).

L'hypothèse adaptative la plus répandue reste cependant liée à la taille énorme de l'ovocyte aviaire. Ainsi, le nombre de spermatozoïdes qui accèdent au site de fécondation serait proportionnel à la taille de l'œuf dans de nombreuses espèces, l'idée sous-jacente étant que plus l'œuf est gros, plus il a besoin d'un grand nombre de spermatozoïdes pour être fécondé (Birkhead *et al* 1994).

De façon générale, le rôle de la polyspermie physiologique des oiseaux (et des autres sauropsidés) commence à être identifié, mais fait encore l'objet de nombreuses hypothèses.

5 / Les applications à l'élevage et aux biotechnologies de la reproduction

La connaissance de la biologie des gamètes et de la fécondation est très importante pour optimiser la reproduction en élevage. Elle permet par exemple, de comprendre pourquoi les accouplements ou IA réalisés à proximité de la ponte, ne sont quasiment pas fertiles. Elle permet aussi de mesurer l'importance d'apports élevés de calcium dans l'alimentation des femelles pour soutenir la production d'œuf. On comprend alors combien les besoins alimentaires des mâles reproducteurs diffèrent de ceux des femelles et les dérive qui peuvent se produire (ex : fragilité des mâles et mauvaises productions de semence, voire infertilité en cas d'apport calcique trop élevé dans l'aliment des coqs).

Il est également fondamental de connaître la biologie des gamètes pour mieux appréhender les apports des biotechnologies de la reproduction. La première des biotechnologies de la reproduction aviaire, qui a impulsé un impact très fort au développement de l'aviculture dans les siècles passés, est l'incubation artificielle. Appliquée aux espèces domestiquées, cette méthode a facilité l'augmentation du nombre d'œufs pondus et de poussins produits par mère (Sauveur 1988, Blesbois 2005, Batellier *et al* 2005).

Dans la seconde moitié du vingtième siècle, l'industrialisation de l'aviculture a conduit à optimiser les conditions environnementales des animaux (ex : photopériode et alimentation) et à

rechercher d'autres facteurs de stimulation de la production d'œufs et de poussins. Parmi ceux-ci, l'IA, combinée à la conservation «liquide» de la semence, a trouvé sa place : en sélection dans toutes les espèces aviaires domestiques ; en multiplication dans les espèces dinde, pintade, et dans les croisements de canards, à l'exemple du croisement entre la cane pékin et le canard de barbarie, pour la production de canard mulard en France (Blesbois et Brillard 2005, Héraut *et al* 2005). La congélation des gamètes est également une question en développement et son utilisation est surtout orientée vers la gestion des ressources génétiques (Massip *et al* 2004, Blesbois 2007, Blesbois *et al* 2010, Blesbois 2011). Les méthodes de transgénèse sont encore peu efficaces chez les oiseaux. La voie de transfert de matériel génétique *via* l'utilisation de vecteurs viraux rencontre cependant un certain succès (Mc Grew *et al* 2004).

Notre objectif n'est pas ici de faire une liste exhaustive des applications du système de fécondation aviaire. Nous allons prendre appui sur certaines particularités de la biologie des gamètes pour en montrer les atouts et les limites d'application, en prenant l'exemple de la conservation des spermatozoïdes et des ovocytes.

La conservation des ovocytes *in vitro* n'est pas développée chez les oiseaux. En effet, les caractéristiques de l'œuf télolécithe (en particulier son contenu en vitellus, et la structure en syncytium des premières étapes du développement), le rendent impropre à la congélation et aux transferts d'embryon. De ce fait, dans les méthodes de transgénèse, des systèmes de culture «*ex ovo*» qui nécessitent le transfert d'un ovocyte fécondé contenant le transgène (apporté *via* par exemple un lentivirus) dans une «coquille hôte», ont été développés (Perry 1988, Mc Grew *et al* 2004, Sherman 2011). Par ailleurs, pour conserver dans l'azote liquide des cellules de reproduction diploïdes, la communauté scientifique s'est tournée (en l'absence de congélation d'embryon) vers l'utilisation de cellules diploïdes embryonnaires. Celles-ci sont des cellules de blastoderme pluripotentes prises au stade de la ponte, ou des cellules germinales primordiales prélevées dans la circulation sanguine de l'embryon à 2,5 jours d'incubation chez la poule ou plus tard dans la gonade embryonnaire.

La conservation des spermatozoïdes est par contre d'un usage beaucoup plus large. Elle est pratiquée à l'état liquide pour la pratique de l'IA, tandis que la congélation est la seule méthode non invasive de conservation des ressources génétiques, complémentaire de la conservation d'animaux sur pied.

Dans les deux cas, les exigences de maintien de la qualité des gamètes mâles sont d'autant plus élevées que ceux-ci, après un passage *in vitro*, doivent rester féconds plusieurs jours à plusieurs semaines dans les glandes utéro-vaginales, pour assurer la fécondation d'œufs, produits quasi quotidiennement par les femelles. Ces contraintes impliquent des conditions précises de composition des milieux, un contrôle du plasma séminal, et l'absence de composants comme le calcium qui pourrait stimuler trop vite la réaction acrosomique (cf. revue de Blesbois et Brillard 2007). D'autant plus que la capacité des spermatozoïdes de coq à déclencher la réaction acrosomique, est fortement altérée par la conservation liquide de la semence (Lemoine *et al* 2011).

La congélation du sperme fait face à des problèmes spécifiques. Ainsi, l'adjonction de jaune d'œuf dans le milieu de conservation (pratique courante dans les autres classes animales), n'est souvent pas possible car délétère. De plus, un des agents cryoprotecteurs les plus efficaces, le glycérol, doit être éliminé avant l'insémination car sa présence empêche les spermatozoïdes de remonter jusqu'aux glandes utéro-vaginales. Enfin, la manipulation d'agents cryoprotecteurs est très délicate puisque leur premier contact avec les spermatozoïdes provoque une perte immédiate de la capacité à enclencher la réaction acrosomique (Mocé *et al* 2010).

Conclusion

Les oiseaux ont développé des systèmes de reproduction adaptés au mode de vie d'animaux parfois très mobiles et qui, avec les migrations, peuvent parcourir de grandes distances dans des environnements variés (ex : les sternes arctiques parcourent la planète depuis leurs aires de reproduction péri-arctiques jusqu'à l'Afrique Australe ou l'Antarctique). Dans les espèces domestiques, la souplesse et l'efficacité du système de reproduction ont été utilisées pour optimiser la production d'œufs et de poussins, destinée à l'alimentation humaine. Aujourd'hui, l'ovaire et l'oviducte de la poule, de la cane commune et de la caille sont devenus des organes remarquables par leur «efficacité» de production, premièrement d'ovocytes riches en vitellus et finalement d'œufs coquillés pour la production d'œufs de consommation ou d'animaux de chair. Par comparaison avec le niveau très élevé d'élaboration de la production d'œufs, celle des spermatozoïdes peut paraître «hâtive» et semble favoriser la production d'un grand nombre de gamètes mâles de

maturation sommaire, qui sont rapidement expulsés vers les femelles. Issus d'un tri très sévère des spermatozoïdes conservés finalement dans des glandes spécialisées de l'oviducte, plusieurs spermatozoïdes finissent par féconder un même ovocyte. Mais le rôle adaptatif de cette polyspermie reste encore une énigme.

D'une façon générale, la biologie des gamètes et la fécondation aviaires se trouvent au carrefour de deux grands types de systèmes de reproduction : 1) l'oviparité qui vise à assurer le plus d'autonomie possible aux descendants et 2) un système de fécondation interne très élaboré, qui vise à sélectionner la descendance des meilleurs reproduc-

teurs. Ce système constitue à la fois un modèle d'étude original, une adaptation physiologique performante et un outil sans pareil de sécurité alimentaire pour le futur (production à moindre coût de protéines à destination de l'alimentation et de la santé humaine).

Références

- Aire T.A., 2007. Spermatogenesis and testicular cycles. In : Jamieson B.G.M. (Ed). Reproduction biology and phylogeny of birds. Queensland Univ. Queensland, Australia, 279-349.
- Ashizawa K., Sano R., 1990. Effects of temperature on the immobilization and the initiation of motility of spermatozoa in the reproductive tract of the domestic fowl. *Comp. Biochem. Physiol.*, 96, 297-301.
- Bakst M.P., 1994. Fate of fluorescent stained sperm following insemination. *Biol. Reprod.*, 50, 987-992.
- Bakst M.R., Howarth B., 1977. Hydrolysis of the hen's perivitelline layer by cock spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 17, 370-379.
- Batellier F., Brillard J.P., Govoroun M., 2005. Anatomie et physiologie de l'appareil génital femelle des oiseaux. In : Couailler J. (Ed). Educagri éditions, Dijon, France, 14, 342-355.
- Bausek N., Waclawek M., Schneider W.J., Wohlrab F., 2000. The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.*, 276, 28866-28872.
- Bausek N., Ruckebauer H.H., Pfeifer S., Schneider W.J., Wohlrab F., 2004. Interaction of sperm with purified native chicken ZP1 and ZPC proteins. *Biol. Reprod.*, 71, 684-690.
- Birkhead T.R., Brillard J.P., 2007. Reproductive isolation in birds: postcopulatory prezygotic barriers. *Trends Ecol. Evol.*, 22, 266-272.
- Birkhead T.R., Sheldon B.C., Fletcher F., 1994. A comparative study of sperm-egg interactions in birds. *J. Reprod. Fertil.*, 101, 353-361.
- Blesbois E., 2005. Introduction à la reproduction des oiseaux domestiques. In : Reproduction des animaux domestiques. Couailler J. (Ed). Educagri éditions, Dijon, France, 334-340.
- Blesbois E., 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World Poultry Sci. J.*, 63, 213-222.
- Blesbois E., 2011. Freezing Avian Semen. *Avian Biol. Res.*, 4, 52-59.
- Blesbois E., Brillard J.P., 2005. L'Anatomie et la physiologie de l'appareil reproducteur mâle des oiseaux. In : Reproduction des animaux domestiques. Couailler J. (Ed). Educagri éditions (Ed), Dijon, France, 358-367.
- Blesbois E., Brillard J.P., 2007. Specific features of *in vivo* and *in vitro* sperm storage in birds. *Animal*, 1, 1472-1481.
- Blesbois E., Caffin J.P., 1992. "Serum like" albumin of fowl seminal plasma and effects of albumin on fowl spermatozoa stored at 4 degrees C. *Brit. Poultry Sci.*, 33, 663-670.
- Blesbois E., de Reviers M., 1992. Effect of different fractions of seminal plasma on the fertilizing ability of fowl spermatozoa stored *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 95, 263-268.
- Blesbois E., Hermier D., 1990. Effects of high-density lipoproteins on storage at 4 degrees C of fowl spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 90, 473-482.
- Blesbois E., Seigneurin F., Tixier-Boichard M., Pain B., 2010. Strategy of avian germplasm cryobanking in France. Duclos M., Nys Y. (Eds). Proc. 13th Eur. Poultry Conference French Branch of World's Poultry Science Association, Tours, France. *World's Poultry Sci. J.*, 66, Suppl. NS, 246. CD rom, 5p.
- Brèque C., Peter Surai P., Brillard J.P., 2003. Roles of Antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 314-323.
- Brillard J.P., 1990. Déplacements des spermatozoïdes dans l'oviducte chez la poule et la dinde. *Reprod. Nutr. Dev.*, 30, 175-182.
- Brillard J.P., 1993. Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poultry Sci.*, 72, 923-928.
- Brown C.R., Hartree E.F., 1976. Comparaison de neutral proteinase activities in cock and ram spermatozoa and observation of pro-acrosin in cock spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 46, 155-164.
- Coward K., Ponting C.P., Chang H.Y., Hibbitt O., Savolainen P., Jones K.T., Parrington J., 2005. Phospholipase C ζ , the trigger of egg activation in mammals, is present in non-mammalian species. *Reproduction*, 130, 157-163.
- De Reviers M., 1988. Appareil génital mâle et production des spermatozoïdes. In : Reproduction des volailles et production d'œufs. INRA Editions, Paris, France, 141-206.
- Dong J.B., Tang T.S., Sun F.Z., 2000. Xenopus and chicken sperm contain a cytosolic soluble protein factor which can trigger calcium oscillations in mouse eggs. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 268, 947-951.
- Douard V., Hermier D., Blesbois E., 2000. Changes in turkey semen lipids during liquid *in vitro* storage. *Biol. Reprod.*, 63, 1450-1456.
- Dupuy V., Blesbois E., 1996. The effects of age on the composition of uterine fluid of broiler breeder hens and on maintenance of quality of fowl spermatozoa when stored in uterine fluid or in a synthetic medium. *Theriogenology*, 45, 1221-1234.
- Elis S., 2007. Approche transcriptomique de la compétence ovocytaire chez la poule. Thèse Université François Rabelais, Tours, France.
- Elis S., Batellier F., Couty I., Balzergues S., Martin-Magniette M.L., Blesbois E., Govoroun M., 2008. Identification of genes potentially involved in fertility in the hen. *BMC Genomics*, 110, 1-20.
- Etches R.J., 1996. The male. In : Reproduction in Poultry. Wallingford, London, UK, p 208-233.
- Eyal-Giladi H., Kochav S., 1976. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look of the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev. Biol.*, 49, 321-337.
- Froman D., 2003. Deduction of a model for sperm storage in the oviduct of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. Reprod.*, 69, 248-253.
- Goudet G., Mugnier S., Callebaut, I., Monget P., 2008. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biol. Reprod.*, 78, 796-806.
- Govoroun M., Batellier F., 2005. De la fécondation à l'éclosion de l'œuf chez les oiseaux. In : Couailler J., Educagri éditions (Ed). Dijon, France, 370-380.
- Guerin-Dubiard C., Anton M., Gautron J., Nys Y., Nau F., 2010. Composition de l'œuf. In : Science et technologie de l'œuf. Vol. 2. De l'œuf aux ovoproduits. Nau F., Guérin-Dubiard C., Baron F., Thapon J.L. (Coord.) Tec et Doc., Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Paris, France, chap 1, 1-176.
- Han L., Monné M., Okumura H., Schwend T., Cherry A.L., Flot D., Matsuda T., Jovine L., 2010. Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the X-ray structure of full-length ZP3. *Cell*, 143, 404-415.
- Hérait F., Brillard J.P., Rogier-Saderne M.C., Savary F., 2005. La conduite et la gestion de la reproduction de quelques espèces aviaires. In : Couailler J., Educagri éditions (Ed). Dijon, France, 384-402.
- Holm L., Ekwall H., Wishart G.J., Ridderstrale Y., 2000. Localization of calcium and zinc in the sperm storage tubules of chicken, quail and turkey using X-ray microanalysis. *J. Reprod. Fertil.*, 118, 331-336.
- Horrocks A.J., Stewart S., Jackson L., Wishart G.J., 2000. Induction of acrosomal exocytosis in chicken spermatozoa by inner perivitelline-derived N-linked glycans. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 278, 84-89.
- Howarth J.R., 1983. Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis, epididymis

and vas deferens following intramaginal insemination. *Biol. Reprod.*, 28, 586-590.

Hrabia A., Takagi S., Ono T., Shimada K., 2003. Fertilization and development of quail oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.*, 142, 301-312.

Jamieson J.M., 2007. Avian spermatozoa: structure and phylogeny. In: Jamieson B.G.M. (Ed), *Reproduction biology and phylogeny of birds*. Queensland Univ. Queensland, Australia, 345-380.

Johnson AL., Woods D.C., 2007. Ovarian dynamics and follicle development. In: Jamieson B.G.M. (Ed), *Reproduction biology and phylogeny of birds*. Queensland Univ. Queensland, Australia, 243-278.

Korn N., Thurston R.J., Pooser B.P., Scott T.R., 2000. Ultrastructure of spermatozoa from Japanese quail. *Poultry Sci.*, 79, 407-414.

Lemoine M., Grasseau I., Brillard J.P., Blesbois E., 2008. A reappraisal of factors involved in the *in vitro* induction of acrosome reaction in chickens. *Reproduction*, 136, 391-399.

Lemoine M., Dupont J., Guillory V., Tesseraud S., Blesbois E., 2009. Signaling pathways involved in the chicken acrosome reaction. *Biol. Reprod.*, 81, 657-665.

Lemoine M., Mignon-Grasteau S., Grasseau I., Magistrini M., Blesbois E., 2011. Capacity of chicken spermatozoa to undergo the acrosome reaction after *in vitro* storage. *Theriogenology*, 75, 122-130.

Malewska A., Olszanska B., 1999. Accumulation and localisation of maternal RNA in oocytes of Japanese quail. *Zygote*, 7, 51-59.

Mann K., 2008. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics*, 8, 2322-2332.

Massip A., Leibo S.P., Blesbois E., 2004. Cryobiology and the breeding of domestic animals. In: *Life in the frozen state*. Benson E., Fuller B., Lane N. (Eds.). Taylor and Francis Group, London, UK, Chap 12, 371-392.

Mc Grew M.J., Sherman A., Ellard K.M., Lillo S.G., Gilhooley H.J., Kingsman A.J., Mitrophanous K.A., Sang H., 2004. Efficient

production of germ line transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep.*, 7, 728-733.

Mizushima S., Takagi S., Ono T., Atsumi Y., Tsukada A., Saito N., Shimada K., 2008. Developmental enhancement of intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-generated quail embryos by phospholipase C ζ cRNA. *Jap. Poultry Sci.*, 45, 152-158.

Mizushima S., Takagi S., Ono T., Atsumi Y., Tsukada A., Saito N., Saito N., Shimada K., 2009. Phospholipase C ζ mPRNA expression and its potency during spermatogenesis for activation of quail oocyte as a sperm factor. *Mol. Reprod. Dev.*, 76, 1200-1207.

Mocé E., Grasseau I., Blesbois E., 2010. Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Anim. Reprod. Sci.*, 122, 359-366.

Nys Y., 2010. Structure et formation de l'œuf. In : *Science et technologie de l'œuf*. Vol. 1 Production et qualité. Nau F., Guérin-Dubiard C., Baron F., Thapon J.L. (Coord.) Tec et Doc., Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires., Paris, France, 160-249.

Okamura F., Nishiyama H., 1978a. The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*. *Cell Tissue Res.*, 188, 497-508.

Okamura F., Nishiyama H., 1978b. Penetration of spermatozoa into the ovum and transformation of the spermatozoon nucleus into the male pronucleus in the domestic fowl. *Cell Tissue Res.*, 190, 89-98.

Parker H.M., Kiess A.S., Wills J.B., Young K.M., Rowe D., Mc Daniel C.D., 2010. Genetic selection increases parthenogenesis in quail. *Poultry Sci.*, 89, 1468-1472.

Perry M.M., 1987. Nuclear events from fertilization to the early cleavage stages in the domestic fowl. *J. Anat.*, 150, 99-109.

Perry M.M., 1988. A complete culture system for the chick embryo. *Nature*, 331, 70-72.

Pizarri T., Froman D.P., Birckhead T.R., 2002. Pré and post-insémination episodes of sexual selection in the fowl. *Heredity*, 88, 112-116.

Rabbani M.G., Sasanami T., Mori M., Yoshizaki N., 2006. Sperm-egg interaction is mediated by a sperm-associated body in quail. *Dev. growth diff.*, 48, 33-40.

Rabbani, M.G., Sasanami T., Mori, M., Yoshizaki, N. 2007. Characterization of the sperm-associated body and its role in the fertilization of the chicken. *Dev. growth differ.*, 49, 39-48.

Roldan E.R.S., Shi Q.X., 2007. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front. Biosci.*, 1, 89-104.

Romanoff A.L., Romanoff A.J., 1949. *The Avian Egg*. John Wiley and Sons (Eds). N.Y., USA, 918p.

Runft L.L., Jaffe L.A., Mahlmann L.M., 2002. Egg activation at fertilization: Where it all begins. *Dev. Biol.*, 245, 237-254.

Sauveur B., 1988. *Reproduction des volailles et production d'œufs*. INRA Editions, Paris, France, 449p.

Sherman A., 2011. Development of birds in surrogate shell. *Avian Biol. Res.*, (under press).

Steele M.G., Wishart G.J., 1992b. Evidence for a species-specific barrier to sperm transport within the vagina of chicken hens. *Theriogenology*, 38, 1107-1114.

Stepinska A., Olszanska B., 2003. DNase I and II present in avian oocyte: a possible involvement in sperm degradation at polyspermic fertilization. *Zygote*, 11, 35-42.

Stepinska U., Bakst M.R., 2007. Fertilization. In: Jamieson B.G.M. (Ed). *Reproductive biology and phylogeny of birds*. Queensland, Australia, 553-587.

Waclawek M., Foisner R., Nimpf J., Schneider W.J., 1998. The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 59, 1230-1239.

Wassarman P.M., Litscher E.S., 2010. Egg's ZP3 structure speaks volumes. *Cell*, 143, 337-338.

Résumé

La biologie des gamètes et de la fécondation aviaire constitue un modèle à part d'adaptation physiologique. Elle tient compte de deux facteurs fondamentaux : 1) un système ovipare qui permet d'assurer le plus d'autonomie possible aux descendants et 2) un système de fécondation interne très élaboré qui vise à sélectionner la descendance des meilleurs reproducteurs. Dans cette synthèse, nous présentons brièvement la structure et la fonction des gamètes mâles et femelles ; l'originalité du système de conservation et de sélection des spermatozoïdes dans un oviducte aux multiples fonctions ; les données les plus récentes sur la fécondation et sa polyspermie physiologique et finalement quelques une des applications biotechniques. D'une façon générale, l'optimisation du système de reproduction aviaire a largement contribué au succès de l'élevage des volailles. Dans l'avenir il doit être pris en compte dans les enjeux de durabilité des systèmes de production animale du XXI^{ème} siècle.

Abstract

Gametes and fertilization in birds

Avian reproduction shows specific features linked to oviparity and to a complex system of internal fertilization, which contributes to the reproductive strategy of flying animals. In this paper, we review the main characteristics of bird gamete biology and fertilization such as the system of sperm storage/selection in the female oviduct and the polyspermic fertilization. Their consequences on the development of reproductive biotechnologies and their role in the efficiency of poultry production are also presented.

BLESBOIS E., 2011. Gamètes et fécondation chez les oiseaux. *INRA Prod. Anim.*, 24, 259-272.

