

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES PHOTOS</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>7</b>
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>9</b>
<b>A- Anatomie et physiologie de l'oviducte des mammifères</b>	<b>9</b>
1. Rappels anatomiques et histologiques	9
2. Structure et variations fonctionnelles de l'oviducte au cours du cycle œstral	10
3. Le fluide oviductal	11
<b>B- Le modèle canin : particularité de la fonction oviductale chez la chienne</b>	<b>12</b>
1. Généralités sur le modèle canin	12
2. Rôles de l'oviducte dans la fonction de reproduction chez les mammifères	13
2.1. Maturation des gamètes, stockage et capacitation du sperme	13
2.2. Lieu de transport actif des gamètes	15
2.3. Lieu de transport et de développement des embryons	16
2.4. Rôles de l'oviducte chez la chienne	16
2.5. Protéines du fluide oviductal	17
<b>C- Rôles de la progestérone au cours du cycle œstral</b>	<b>21</b>
1. Généralités	21
2. Rôles de la progestérone pour la fonction de reproduction chez la chienne	22
2.1. Lutéinisation pré-ovulatoire et maturation ovocytaire	22
2.2. Implantation et survie de l'embryon	23
2.3. Rôles de la progestérone pour la physiologie de l'oviducte	23
3. Les récepteurs à la progestérone	24
3.1. Les récepteurs nucléaires : médiateurs de l'action génomique de la progestérone	25
3.2.1. membrane Progesterone Receptors (mPRs)	26
3.2.2. Progesterone Receptors Membrane Components (PGRMC)	26

<b>D- L'aglépristone</b>	<b>27</b>
1. Généralités et propriétés pharmacologiques chez la chienne	27
2. Effet de l'aglépristone sur la période péri-ovulatoire chez la chienne	28
<b>DEUXIEME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE</b>	<b>31</b>
<b>A.Objectifs</b>	<b>31</b>
<b>B.Matériel et méthodes</b>	<b>31</b>
1. Schéma expérimental	31
1.1. Animaux	31
1.2. Injection d'aglépristone	32
1.3. Choix des protéines étudiées	32
1.4. Stratégie expérimentale	33
2. Détermination des périodes du cycle œstral	34
3. Prélèvement du matériel biologique	35
4. Western-blot	36
5. Immunohistochimie	40
<b>C.Résultats</b>	<b>43</b>
1. Détection des protéines d'intérêt par western-blot	43
1.1. Expression de la protéine CD109	43
1.2. Expression de la protéine Céruloplasmine	44
1.3. Expression de la protéine Clusterine	45
1.4. Expression de la protéine Lactoferrine	46
2. Détection des protéines oviductales d'intérêt par immunohistochimie	46
2.2. Expression de la protéine CD109	46
2.3. Expression de la protéine Céruloplasmine	48
2.4. Expression de la protéine Clusterine	50
<b>D.Discussion</b>	<b>53</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>59</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Anticorps

BSA : « *Bovine serum albumin* », albumine sérique bovine

CD : Clusterine of differentiation

CP : Céruloplasmine

COC : Complexe ovocyte-cumulus

FIV : Fécondation *in vitro*

FSH : Hormone folliculo-stimulante

JUT : Jonction utéro-tubaire

LH : Hormone lutéinisante

LF : Lactoferrine

MI : Métaphase I de méiose

MII : Métaphase II de méiose

MIV : Maturation *in vitro*

PBS : “*Phosphate-buffered saline*”, tampon phosphate salin

VG : Vésicule germinative

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1 : Liste des protéines identifiées majoritairement dans le fluide oviductal canin 3.5 jours après l'ovulation (Reynaud *et al.*, 2013).**

**Tableau 2 : Protéines impliquées dans la fonction de reproduction et leurs différences d'expression suite au traitement à l'aglépristone (Harichaux *et al.*, 2013).**

**Tableau 3: Nombre de chienne Beagle utilisé dans cette étude, stade ovarien et concentration en progestérone plasmatique à J+4.**

**Tableau 4 : Protéines candidates étudiées, potentiellement régulées par la progestérone dans l'oviducte canin, d'après Harichaux *et al.*, 2013.**

**Tableau 5 : Composition du gel d'acrylamide lors de l'électrophorèse.**

**Tableau 6 : Composition d'un litre de tampon de migration utilisé lors du transfert sur membrane de nitrocellulose.**

**Tableau 7: Liste des protéines et des anticorps primaires associés (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne), conditions et concentrations testées en Western-blot.**

**Tableau 8 : Liste des IgG (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) utilisées pour vérifier la spécificité du marquage, suivant l'anticorps primaire utilisé.**

## LISTE DES PHOTOS

**Photo 1 : Dosage protéique par la méthode de Bradford, plaque 96 puits avec la gamme BSA (Bovine Serum Albumin) et les échantillons à doser.**

**Photo 2 : Gel SDS-PAGE 1D avant découpe des bandes pour la spectrométrie. (a) Aglépristone (b) Témoin.**

# LISTE DES FIGURES

**Figure 1 : Anatomie de l'oviducte et de ses trois segments.**

**Figure 2 : Cellules épithéliales d'un oviducte canin, observées par microscopie électronique à balayage.**

**Figure 3: Evolution de la concentration en progestérone pendant la période péri-ovulatoire chez la chienne.**

**Figure 4 : Analyse ontologique des gènes issus des protéines identifiées dans le fluide oviductal canin.**

**Figure 5 : Formule chimique de la progestérone.**

**Figure 6 : Différents types de récepteurs à la progestérone mis en évidence dans l'oviducte.**

**Figure 7 : Comparaison des structures chimiques de la progestérone et de l'aglépristone.**

**Figure 8 : Stratégie expérimentale simplifiée utilisée dans cette étude.**

**Figure 9 : Détermination de la période du cycle par frottis vaginal chez la chienne.**

**Figure 10 : Anatomie de l'oviducte canin.**

**Figure 11 : Principe de la séparation du gel d'électrophorèse SDS-PAGE.**

**Figure 12 : Détection de la protéine CD109 par western-blot dans les fluides oviductaux de 4 chiennes témoins et 4 chiennes traitées à l'aglépristone au stade J+4.**

**Figure 13 : Détection de la protéine céruloplasmine par western-blot dans les fluides oviductaux de 4 chiennes témoins et 4 chiennes traitées à l'aglépristone au stade J+4.**

**Figure 14 : Détection de la clusterine (anticorps 6420) par western-blot sur les fluides oviductaux de 4 chiennes témoins et 4 chiennes traitées à l'aglépristone au stade J+4.**

**Figure 15 : Expression de la protéine CD 109 dans l'oviducte (ampoule et isthme) au cours du stade J+4 chez la chienne.**

**Figure 16 : Expression de la protéine céruloplasmine dans l'oviducte (ampoule et isthme) au stade J+4 chez la chienne.**

**Figure 17 : Expression de la protéine clusterine dans l'oviducte (ampoule et isthme) au stade J+4 chez la chienne.**



# INTRODUCTION

La physiologie de la reproduction chez la chienne présente certaines particularités par rapport aux autres mammifères, notamment au niveau de la chronologie de la maturation ovocytaire. En effet, les ovocytes sont ovulés à un stade immature (vésicule germinale) et n'atteignent le stade métaphase II dans l'oviducte que deux à trois jours après l'ovulation (Tsutsui *et al.*, 1989 ; Reynaud *et al.*, 2005). De plus, l'environnement endocrinien est très particulier. En effet, une lutéinisation préovulatoire et des concentrations sanguines très élevées de progestérone sont observées pendant la phase pré-ovulatoire (Concannon *et al.*, 1989). Pendant longtemps il a été proposé que l'oviducte joue un simple rôle mécanique de transit de gamètes et des embryons préimplantatoires. Cependant, il est considéré aujourd'hui comme un microenvironnement complexe également nécessaire à la maturation ovocytaire et au développement embryonnaire précoce.

Les rôles de la progestérone dans la maturation ovocytaire et la fécondation ont été mis en évidence par une expérience pharmacologique en utilisant un antagoniste des récepteurs nucléaires de la progestérone : l'aglépristone (Reynaud *et al.*, 2013). Cette injection induit un important retard de reprise de méiose ovocytaire et un blocage du transit des spermatozoïdes.

La première partie de cette thèse sera consacrée à la présentation des particularités fonctionnelles oviductales chez la chienne, ainsi que les rôles de la progestérone déjà décrits dans la littérature au cours du cycle œstral. Une description de l'aglépristone sera également précisée. La deuxième partie présentera une étude expérimentale au cours de laquelle nous avons tenté de mettre en évidence le rôle de la progestérone sur les modifications de la composition du fluide oviductal et plus particulièrement sur l'expression et la localisation de 4 protéines oviductales d'intérêts : le CD 109, la céruloplasmine, la clusterine et la lactoferrine. La conclusion exposera le bilan des connaissances apportées par cette étude et les perspectives offertes.



# PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## A- Anatomie et physiologie de l'oviducte des mammifères

### 1. Rappels anatomiques et histologiques

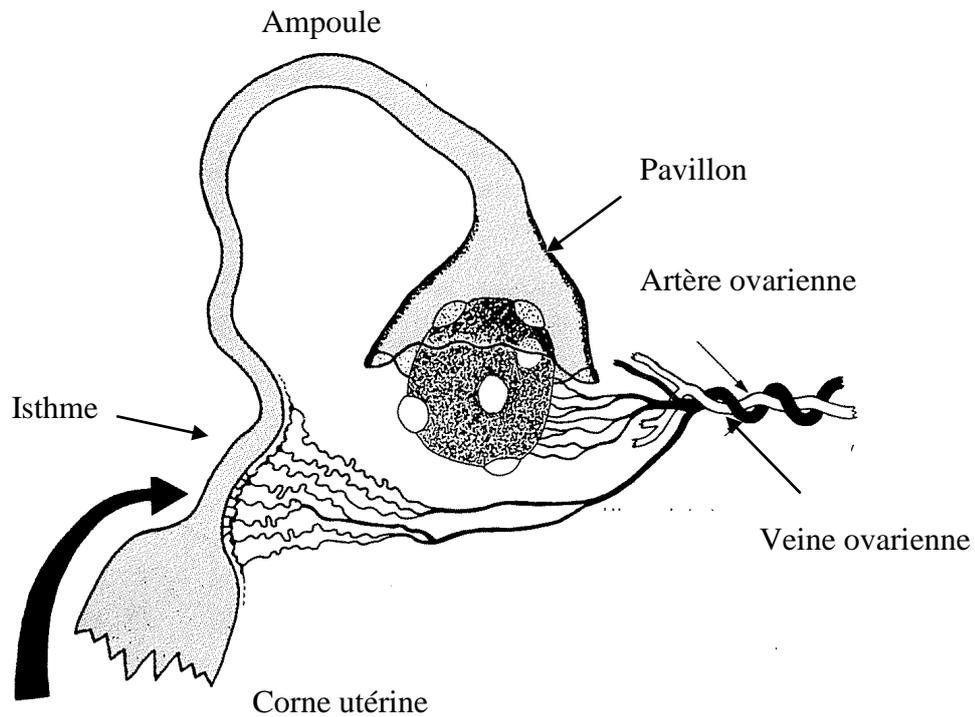
Dérivés de la portion antérieure des canaux de Müller, les oviductes sont plus communément appelés « trompes utérines » ou « trompes de Fallope ». Ils constituent le premier segment des voies génitales femelles reliant l'ovaire à l'utérus (Figure 1) et sont divisés en trois parties :

*Le pavillon, ou infundibulum* est la partie proximale de l'oviducte qui capte les ovocytes au moment de l'ovulation.

*L'ampoule* est le lieu de la fécondation mais également de la maturation ovocytaire et du transport de l'ovocyte, permis par l'activité de cellules ciliées (Croxatto, 2002).

*L'isthme* est la portion rétrécie de l'oviducte et constitue le réservoir spermatique. Il se termine au niveau de la jonction utéro-tubaire. Il a été démontré chez la vache et la truie que les spermatozoïdes sont arrêtés et stockés dans la partie caudale de l'isthme avant l'ovulation (Hunter et Wilmut, 1984).

**Figure 1 : Anatomie de l'oviducte et de ses trois segments : le pavillon, l'ampoule et l'isthme.**



La structure histologique de l'oviducte est identique chez tous les mammifères (Steinhauer *et al.*, 2004). Il est constitué d'une muqueuse, l'endosalpinx, d'une couche de fibres musculaires lisses, le myosalpinx et d'une séreuse. L'endosalpinx, très plissé, est entièrement recouvert d'un épithélium comportant en proportions à peu près égales de cellules ciliées et de cellules sécrétrices non ciliées. C'est grâce à l'activité contractile du myosalpinx que les spermatozoïdes et l'embryon transitent au sein de l'isthme.

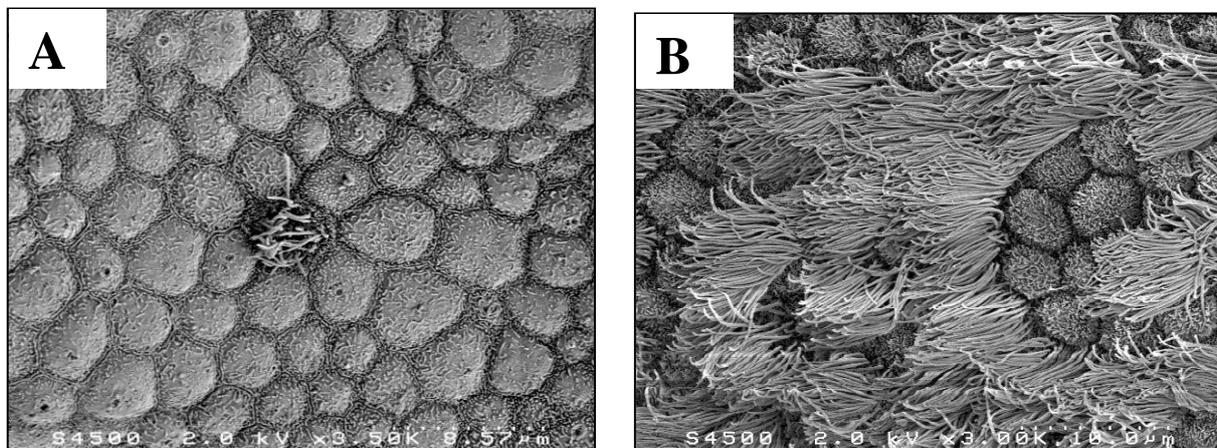
La fonction de l'oviducte est complexe. Pendant longtemps, on lui a attribué un simple rôle mécanique de transit de gamètes et des embryons préimplantatoires. Cependant, la réalisation des premières fécondations *in vitro* dans les années 1960 et le nombre d'embryons obtenus a mis en évidence un autre rôle de ce dernier : pendant la durée du transit tubaire, l'oviducte est le siège d'échanges encore mal compris entre les cellules tubaires et les gamètes ou l'embryon (Kölle *et al.*, 2009).

## **2. Structure et variations fonctionnelles de l'oviducte au cours du cycle œstral**

L'épithélium oviductal est constitué de deux types de cellules : les cellules ciliées et les cellules glandulaires non ciliées (sécrétrices).

La proportion de ces deux types de cellules dans l'oviducte est similaire chez de nombreuses espèces domestiques, mais varie selon la région de l'oviducte (Hunter, 2011) et les phases du cycle (Fontaine *et al.*, 2009) (Figure 2). Les cellules sécrétrices sont responsables de la sécrétion du fluide oviductal.

**Figure 2 : Cellules épithéliales d'un oviducte canin, observées par microscopie électronique à balayage. A. Oviducte en anœstrus. B. Oviducte à J+6.5 après ovulation. On distingue les cellules ciliées et les cellules sécrétrices (cellules présentant des microvillosités à leur surface).**



### 3. Le fluide oviductal

Le microenvironnement tubaire résulte à la fois des synthèses de l'épithélium et d'une excrétion des facteurs issus du sérum et du liquide folliculaire après ovulation. Le fluide oviductal se compose de substrats énergétiques (essentiellement du glucose, pyruvate et lactate), d'ions, d'acides aminés et d'un grand nombre de protéines. Les concentrations en lactate et en pyruvate sont nettement supérieures à celles du sérum et du liquide utérin chez la plupart des mammifères : cet environnement est favorable au métabolisme glucidique des spermatozoïdes et de l'embryon jusqu'au stade blastocyste (Bavister, 2000 ; Hugentobler *et al.*, 2008). La concentration de potassium est deux à cinq fois plus élevée dans le fluide oviductal que dans le sérum (Menezo *et al.*, 1997 ; Hugentobler *et al.* 2007 a ; Leese *et al.*, 2008).

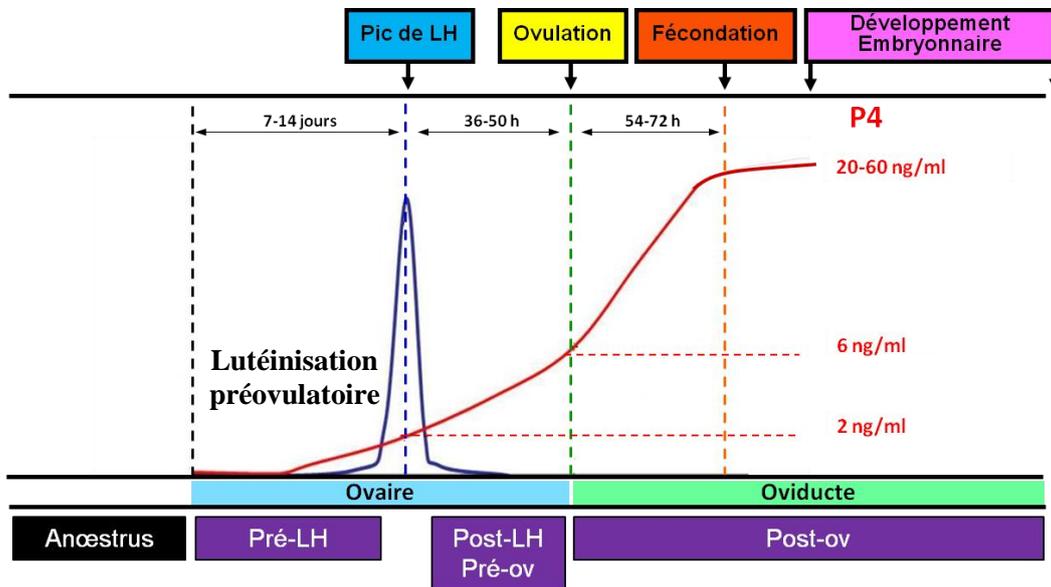
Certains ions comme le chlorure jouent un rôle important dans la formation du fluide oviductal en créant un gradient osmotique, à l'origine de l'entrée d'eau dans la lumière de l'oviducte (Leese *et al.*, 2008). La concentration en acides aminés présents dans le fluide oviductal est plus importante que celle du sérum (Aguilar et Ryley, 2005 ; Hugentobler *et al.*, 2007 b). La glycine et l'alanine sont les acides aminés majoritaires (Aguilar et Ryley, 2005 ; Hugentobler *et al.*, 2007 b) ; ils interviennent dans la régulation du pH intra-oviductal et dans la protection de l'embryon vis-à-vis du stress osmotique (Leese *et al.*, 2008). La concentration en protéines est moins importante dans le fluide oviductal que dans le plasma (Aviles *et al.*, 2010). Les recherches sur les rôles de l'oviducte sont relativement récentes et peu de données sont disponibles sur la composition protéique du fluide oviductal. Néanmoins, des glycoprotéines spécifiques de l'oviducte (OVGP ou oviductine) ont été décrites chez plusieurs espèces, notamment chez la vache (Boice *et al.*, 1990) et la truie (Buhi *et al.*, 1993). Ces glycoprotéines, présentes en grande quantité pendant la période péri-ovulatoire, participent à l'adhésion des spermatozoïdes dans le réservoir spermatique de l'isthme, favorisent la capacitation et facilitent la pénétration spermatique lors de la fécondation (Martus *et al.*, 1998).

## **B- Le modèle canin : particularité de la fonction oviductale chez la chienne**

### **1. Généralités sur le modèle canin**

Le chien (*Canis familiaris*) est une espèce monœstrale, polyovulante et non saisonnée. Le cycle de reproduction se divise en quatre phases de durées différentes : le proœstrus (en moyenne 7-10 jours), l'œstrus (en moyenne 7-10 jours), le metœstrus suivi du dioœstrus (2 mois) et l'anœstrus (4-6 mois) (Johnston *et al.*, 2001). Le proœstrus correspond au stade de la croissance folliculaire et précède le pic de LH ; l'œstrus correspond à la phase péri-ovulatoire, entre deux jours avant l'ovulation et cinq à sept jours après l'ovulation et débute avec le pic de LH. Les principaux événements intervenants pendant la période péri-ovulatoire sont indiqués sur la Figure 3.

**Figure 3: Evolution de la concentration en progestérone pendant la période péri-ovulatoire chez la chienne (d'après Chastant-Maillard *et al.*, 2011).**



P4 : progestérone  
 Pré-LH : stade pré-LH  
 Pré-ov : stade pré-ovulatoire  
 Post-ov : stade post-ovulatoire

Chez la chienne, les ovocytes sont libérés au stade immature de prophase I (stade vésicule germinative) et deux à trois jours de maturation sont nécessaires pour atteindre le stade métaphase II (Tsutsui *et al.*, 1989 ; Reynaud *et al.*, 2005). Après la fécondation, les embryons se développent dans l'oviducte jusqu'au stade morula-blastocyste, puis migrent dans l'utérus.

## 2. Rôles de l'oviducte dans la fonction de reproduction chez les mammifères

### 2.1. Maturation des gamètes, stockage et capacitation du sperme

Chez la plupart des mammifères, la question d'un rôle de l'oviducte pour la maturation ovocytaire ne s'est jamais posée car cette maturation est intra-ovarienne et l'ovocyte ovulé est directement fécondable. Par contre, les rôles de l'oviducte pour les spermatozoïdes ont été largement étudiés. Ainsi, l'oviducte est considéré comme étant un site de sélection puis de capacitation des spermatozoïdes (Austin, 1951 ; Chang, 1951 ; Ehrenwald *et al.*, 1990). Avant d'arriver dans l'oviducte, les spermatozoïdes passent par la jonction utéro-tubaire où s'effectue une première sélection (Hunter, 2011).

Chez certaines espèces, notamment la lapine, la présence de mucus au niveau de la jonction utéro-tubaire a été décrite. Chez la vache, il existe une barrière mécanique constituée par les replis muqueux de la jonction utéro-tubaire, permettant ainsi de fermer totalement ou partiellement la lumière de la corne utérine (Suarez et Susan, 2008). La sélection des spermatozoïdes orchestrée par les oviductes est un phénomène drastique, puisque sur les milliers de spermatozoïdes présents dans l'isthme, seuls quelques dizaines atteindront l'ampoule (Hunter, 2005 ; Croxatto, 2002 ; Hunter, 2011). Une première sélection s'effectue lors du passage de la jonction utéro-tubaire, gouvernée à la fois par la mobilité des spermatozoïdes et par des interactions moléculaires entre la membrane des spermatozoïdes et la jonction utéro-tubaire (Hunter, 2011). Chez la souris, le passage de la jonction utéro-tubaire met en jeu des protéines de la famille ADAM (ADesintegrin And Metallopeptidase Domain), molécules également impliquées dans la reconnaissance et la fusion des gamètes lors de la fécondation (Hunter, 2011). Une seconde sélection s'effectue dans le réservoir de l'isthme, dont la capacité de liaison aux spermatozoïdes est régulée par des facteurs de qualité spermatique identifiés chez plusieurs mammifères, comme la présence d'un acrosome intact, l'absence de capacitation, l'intégrité de la chromatine ou l'absence d'anomalies morphologiques (Suarez, 2008 ; Hourcade *et al.*, 2010 ; Hunter, 2011). La portion caudale de l'isthme semble être le lieu de stockage des spermatozoïdes. En effet, chez la vache, la truie, la jument et la lapine, les cellules oviductales créent un environnement où les gamètes mâles se lient à l'épithélium et sont immobilisés : cette portion est appelée le réservoir spermatique (Suarez et Pacey, 2006 ; Suarez, 2008 ; Kölle *et al.*, 2009). L'attachement des spermatozoïdes à la monocouche des cellules épithéliales tubaire a été ainsi étudié (Gutierrez *et al.*, 1993 ; Dobrinski *et al.*, 1996 ; Sidhu *et al.*, 1998), et il apparaît que des glycoprotéines sont impliquées dans l'interaction entre les cellules épithéliales tubaires et les spermatozoïdes. Cette liaison réversible a été bien étudiée chez les bovins ; elle met en jeu d'une part des protéines du plasma séminal (protéines de la famille des BSP, ou Bovine Seminal Plasma) liées à la membrane plasmique péri-acrosomale du spermatozoïde et d'autre part des groupements saccharidiques de protéines appartenant à la famille des annexines (ANXA1, -2, -4, -5) présentes à la surface des cellules épithéliales de l'oviducte (Suarez, 2008).

Outre les rôles de l'oviducte dans le stockage et la survie des spermatozoïdes, il existe également un rôle oviductal dans la capacitation des spermatozoïdes. Le mécanisme complexe de la capacitation englobe en particulier l'acquisition par le spermatozoïde de la capacité à reconnaître et à se fixer sur la zone pellucide de l'ovocyte.

Plus globalement, l'oviducte est à l'origine d'une sécrétion de facteurs favorisant l'ensemble des mécanismes de la capacitation, on peut citer : les changements de composition membranaire permettant la fixation à la zone pellucide de l'ovocyte, l'augmentation de la perméabilité à l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  qui facilite ainsi les mouvements des protéines membranaires et le changement de mobilité du spermatozoïde qui devient hyperactif. Ce sont les stéroïdes ovariens (essentiellement la progestérone) qui permettent ou non la capacitation et modulent son temps de réalisation (Suarez, 2008). Récemment chez l'homme, le mécanisme d'action a été mis en évidence : il repose sur la présence d'un récepteur canal au niveau du flagelle des spermatozoïdes : le canal CATSPER. En présence de progestérone, ce canal est activé et permet le passage d'ion calcium au sein de la membrane des spermatozoïdes induisant leur capacitation (Strünker *et al.*, 2011 ; Lishko *et al.*, 2011).

Les spermatozoïdes quittent ensuite progressivement le réservoir spermatique, notamment par l'intermédiaire d'un courant calcique qui permet le détachement entre le cil et le spermatozoïde et ainsi la reprise de la mobilité de ce dernier vers le site de fécondation. Chez la vache, la libération des spermatozoïdes depuis le réservoir spermatique débute dès l'entrée du complexe ovocyte-cumulus dans l'oviducte après l'ovulation (Kölle *et al.*, 2009). Ce relargage progressif joue un rôle dans le blocage de la polyspermie (Hunter, 2011 ; Suarez, 2008). Chez le porc, en augmentant le nombre de spermatozoïdes au niveau du site de fécondation *in vivo*, la polyspermie est augmentée (Hunter et Leglise, 1971).

## **2.2. Lieu de transport actif des gamètes**

Outre son rôle dans le stockage et la capacitation des spermatozoïdes, l'oviducte intervient activement dans la rencontre des gamètes : les contractions du myosalpinx et les battements ciliaires de l'épithélium créent en effet un flux de fluide oviductal contribuant au transport ou à la sélection des gamètes. Ce flux est orienté vers la cavité péritonéale au moment de l'ovulation et pendant les trois jours qui suivent (Menezo et Guerin, 1997). Dès son expulsion du follicule ovulatoire, le complexe ovocyte-cumulus est capté par l'infundibulum grâce à des contractions du myosalpinx (Hunter, 2012) et grâce à un processus d'adhésion entre les cils de l'oviducte et les cellules du cumulus, tous deux indispensables à la progression du complexe ovocyte-cumulus vers l'ampoule (Lam *et al.*, 2000 ; Kölle *et al.*, 2009).

Lorsque le complexe ovocyte-cumulus pénètre dans l'ampoule, les spermatozoïdes sont libérés du réservoir spermatique, sont capités et passent à l'état hyperactif, entamant une remontée de l'oviducte vers la jonction entre l'ampoule et l'isthme où se déroule la fécondation (Lam *et al.*, 2000 ; Hunter, 2012). Cette remontée des spermatozoïdes à contre-courant s'effectue grâce à l'action combinée des contractions du myosalpinx, d'un gradient de température entre l'ampoule et l'isthme, et d'un processus de chimiotactisme (Suarez, 2008 ; Hunter, 2010).

### **2.3. Lieu de transport et de développement des embryons**

Après la fécondation, l'embryon migre vers l'utérus grâce aux battements ciliaires de l'épithélium et au flux des sécrétions tubaires, dirigé vers la cavité utérine (Croxatto, 2002). Chez la femme, les cils de l'épithélium tubaire ont une importance capitale dans le transport de l'ovocyte et de l'embryon et leur absence ou déficience induit une infertilité ou des grossesses extra-utérines (Lyons *et al.*, 2006). Le rôle de l'oviducte dans le développement embryonnaire pré-implantatoire varie selon les espèces. Chez les mammifères non primates, le transfert dans l'utérus d'embryons à des stades très précoces n'est pas suivi d'une gestation (Baudrillard, 1992). A l'inverse, chez les primates et la femme, il est possible d'obtenir une gestation en injectant spermatozoïdes et ovocytes dans l'utérus, ou en transférant un embryon dès le stade zygote ou quatre cellules (Hunter, 1998). Cependant, l'impact de l'environnement oviductal sur la qualité du blastocyste, longtemps ignoré à cause des succès de la fécondation *in vitro*, redevient un objet de recherche pour améliorer les taux de gestation obtenus après transfert d'embryons produits *in vitro* (Ulbrich *et al.*, 2010). En effet, des événements majeurs du développement s'initient dans l'embryon au cours de son séjour dans l'oviducte : l'épigenèse, l'activation du génome zygotique, la compaction, la cavitation et l'établissement des deux lignées cellulaires à l'origine du fœtus et du placenta.

Globalement, l'oviducte est le premier environnement immédiat de l'embryon, ce qui en fait la première interface entre la mère et l'embryon, et le premier lieu potentiel de développement d'anomalies métaboliques (Leese *et al.*, 2008).

### **2.4. Rôles de l'oviducte chez la chienne**

Dans l'espèce canine, l'oviducte a des rôles encore plus importants que chez les autres mammifères car il permet la maturation de l'ovocyte.

Il est le lieu de la reprise de la méiose et le stade métaphase II est atteint entre 2 à 3 jours après l'ovulation (Tsutsui *et al.*, 1989 ; Reynaud *et al.*, 2005). Bien que la fécondation soit très rarement possible *in vivo* avant l'expulsion du premier globule polaire, c'est très majoritairement quand l'ovocyte est au stade métaphase II qu'elle a lieu chez la chienne, (Reynaud *et al.*, 2005). L'oviducte abrite également les embryons pendant plusieurs jours et tous ces événements oviductaux durent au total 8 à 9 jours sur 63 jours de gestation, donc une durée proportionnellement très longue par rapport à d'autres mammifères comme la vache ou la souris. Les facteurs impliqués dans la régulation de la reprise de méiose ovocytaire, la fécondation et le développement embryonnaire chez la chienne ne sont pas connus.

## 2.5. Protéines du fluide oviductal

Plus de 160 protéines oviductales ont été mise en évidence chez différentes espèces (Aviles *et al.*, 2010).

En 2011, une première étude sur l'analyse qualitative et quantitative des protéines du fluide oviductal a été réalisée par Reynaud *et al.* (2011), sur un groupe de 3 chiennes à 3,5 jours après l'ovulation. Au total, 426 protéines ont été identifiées. Beaucoup sont communes aux fluides de l'organisme mais, certaines sont spécifiques à l'oviducte comme l'oviduct specific glycoprotein (OVGP, oviductine). Les 10 principales protéines identifiées sont présentes dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Liste des protéines identifiées majoritairement dans le fluide oviductal canin 3.5 jours après l'ovulation (Reynaud *et al.*, 2011).**

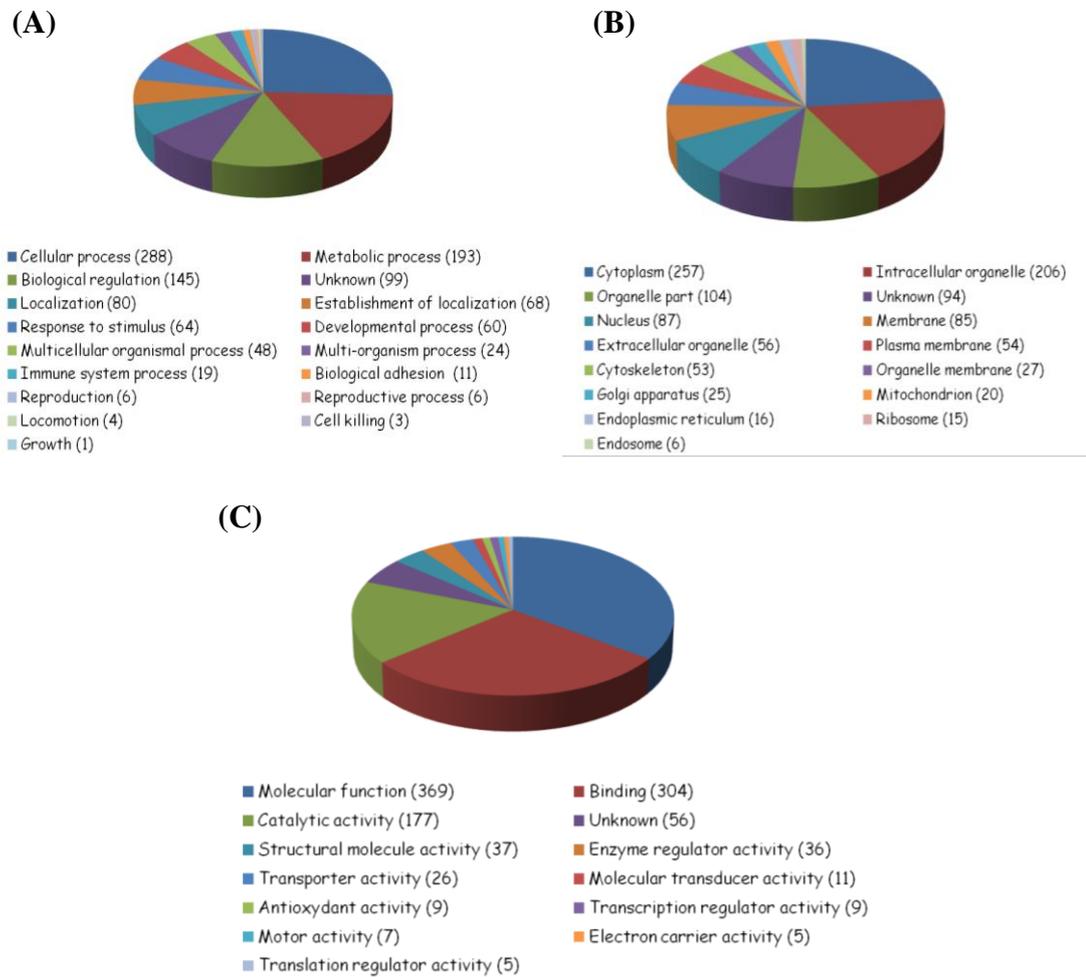
Nom de la protéine	Nombre de peptides uniques
serum albumin precursor	117
phospholipid transfer protein	31
Serotransferrin	97
beta-actin	41
insulin-like growth factor binding protein 2	24
apolipoprotein A-I	49
complement C3	98
immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	8
heat shock protein HSP 90-alpha	33
oviduct-specific glycoprotein	31

Les protéines identifiées sont majoritairement de nature cytoplasmique (60,32 %) ou membranaires (19,95 %) et impliquées dans des processus métaboliques (45,30 %) et de régulation (34,03 %).

Au niveau de la fonction moléculaire, l'activité catalytique (41,54 %) semble être la plus importante (Figure 4). Enfin, le protéome de l'ampoule est très proche de celui de l'isthme.

**Figure 4 : Analyse ontologique des gènes issus des protéines identifiées dans le fluide oviductal canin (Reynaud *et al.*, 2011).**

(A) Processus biologique. (B) Composant cellulaire. (C) Fonction moléculaire.



En 2013, Harichaux et ses collaborateurs ont travaillé sur les variations du protéome du fluide oviductal au moment de la reprise de la méiose et de la fécondation après l'administration d'aglépristone, un antagoniste de la progestérone. Les 15 chiennes utilisées dans le protocole expérimental étaient également toutes au stade J+3,5 (soit 3,5 jours après l'ovulation).

Au total, 1535 protéines ont été identifiées. Suite à l'administration d'aglépristone, l'expression de 157 protéines sur les 1535 a été modifiée. Le Tableau 2 répertorie les protéines différemment exprimées, connues à ce jour pour être impliquées dans la fonction de reproduction.

**Tableau 2 : Protéines impliquées dans la fonction de reproduction et leurs différences d'expression suite au traitement à l'aglépristone (Harichaux *et al.*, 2013).**

	<b>Nom de la protéine</b>	<b>T-Test (P-Value)</b>	<b>Ratio</b>
<b>Protéines surexprimées sous Aglépristone</b>	Lactotransferrine	2,3E-06	Absence chez les témoins
	protein-arginine deiminase type-2	5E-06	33,6
	signal transducer and activator of transcription 3	2,4E-04	9,4
	glucose-6-phosphate isomerase	1,3E-04	4,3
	creatine kinase B-type	8,9E-04	4,1
	isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	7,4E-03	3
	myosin-9	2,4E-03	2,3
	oviduct-specific glycoprotein	1,6E-07	2
	peroxiredoxin-6	4,8E-05	2
<b>Protéine sous exprimée sous Aglépristone</b>	CD109 antigen	1,9E-07	18,2
	pantetheinase precursor	2,2E-06	16,1
	mucin-1 precursor	2,5E-03	15,8
	clusterine precursor	1,3E-08	15,3
	peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	7,9E-04	4,2
	zinc-alpha-2-glycoprotein	1,8 E-02	3,4
	Céruloplasmine	4,5E-06	2,4

Les résultats de l'étude menée par Harichaux *et al.* (2013) sur les modifications d'expression de certaines protéines du fluide oviductal après l'injection d'un antagoniste de la progestérone en période péri-ovulatoire laisse suggérer le rôle prépondérant de cette hormone dans les processus de régulation d'expression protéique.

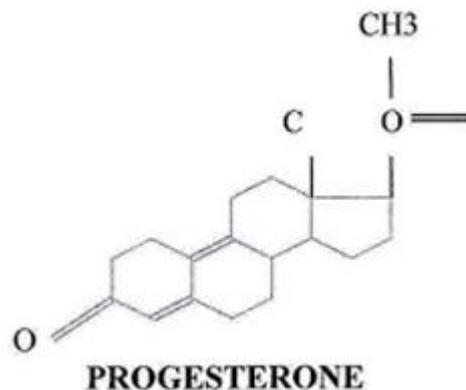
## C- Rôles de la progestérone au cours du cycle œstral

Les deux hormones stéroïdiennes ovariennes ( $17\beta$ -œstradiol et progestérone) ont des rôles importants de régulation de la morphologie et des fonctions de l'oviducte des mammifères, incluant la motilité et les sécrétions oviductales (Croxatto, 2002 ; Aguilar et Reyley, 2005 ; Hunter, 2011).

### 1. Généralités

La progestérone est une hormone stéroïdienne dont la structure de base dérive de celle du cholestérol plasmatique (Figure 5).

**Figure 5 : Formule chimique de la progestérone, d'après Hoechst-Roussel, 1996.**



La progestérone est un intermédiaire important de la biosynthèse stéroïdienne dans l'ensemble des tissus sécréteurs d'hormones stéroïdiennes. Les complexes circulants principaux de la progestérone sont ceux liant la progestérone à l'albumine (80 %), ou à la transcortine (18 %). Environ 2 % se trouve sous forme libre.

La sécrétion des hormones stéroïdiennes par les ovaires se fait sous la dépendance de deux hormones gonadotropes : la LH (hormone lutéinisante) et la FSH (hormone folliculo-stimulante). Ces deux hormones sont libérées dans la circulation générale par l'adénohypophyse, lobe antérieur glandulaire de l'hypophyse, sous l'action de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), libérée par l'hypothalamus. Ces hormones gonadotropes agissent sur les gonades via des récepteurs transmembranaires et provoquent la mobilisation du cholestérol, précurseur des hormones stéroïdiennes, son entrée dans la mitochondrie et induisent une activation des enzymes de la stéroïdogénèse. La GnRH est l'activateur essentiel de la sécrétion de LH qui induit la synthèse de progestérone.

Le follicule ovarien contient deux types de cellules stéroïdogènes : les cellules de la thèque interne et les cellules de la granulosa, capables de sécréter de la progestérone à partir du cholestérol plasmatique. Cependant, une coopération entre ces deux types de cellules est nécessaire pour permettre la sécrétion de l'ensemble des stéroïdes.

Chez les mammifères, le pic de LH précède de 24 à 48 heures l'ovulation et provoque la lutéinisation, c'est-à-dire la transformation structurale et fonctionnelle des cellules de la granulosa et de la thèque. Ceci entraîne une transformation du follicule ovulé en corps jaune, structure de sécrétion massive de progestérone.

## **2. Rôles de la progestérone pour la fonction de reproduction chez la chienne**

La progestérone est donc sécrétée majoritairement par le corps jaune pendant le diœstrus et agit à plusieurs niveaux de l'axe gonadotrope afin de réguler la fonction de reproduction. Elle exerce en particulier un rétrocontrôle négatif sur la synthèse et la sécrétion des hormones gonadotropes FSH et LH. Au niveau périphérique, elle agit sur les cellules ovariennes, oviductales, utérines et mammaires. Elle possède donc un rôle prédominant dans le contrôle neuro-endocrinien du cycle ovarien, de la mise en place et du maintien de la gestation (Chabbert-Buffet *et al.*, 2005).

### **2.1. Lutéinisation pré-ovulatoire et maturation ovocytaire**

Une des grandes particularités de la chienne est la lutéinisation précoce des follicules pré-ovulatoires qui secrètent de la progestérone pendant plusieurs jours avant que l'ovulation ne se produise (Concannon *et al.*, 1989).

Les concentrations plasmatiques de progestérone, qui augmentent lentement en période pré-ovulatoire, suivent ensuite une courbe avec une pente ascendante brutale autour de l'ovulation, puis atteignent un plateau à des concentrations élevées en quelques jours (Figure 3).

Par comparaison, quelques jours après l'ovulation, une vache ou une femme présente une concentration d'environ 5 ng/mL de progestérone contre 20 à 60 ng/mL chez la chienne. Au delà des concentrations périphériques, les concentrations intra-ovariennes sont très élevées et les concentrations dans le liquide folliculaire peuvent atteindre 2000 à 3000 ng/mL au stade pré-ovulatoire (Fahiminiya *et al.*, 2010). L'ovocyte canin achève donc sa maturation cytoplasmique dans un micro environnement dominé par la progestérone. Les rôles éventuels de cette hormone sur l'ovocyte canin sont encore à préciser.

## **2.2. Implantation et survie de l'embryon**

La progestérone exerce un rôle primordial pour l'implantation embryonnaire et la placentation chez la chienne (Concannon *et al.*, 2001).

Le processus d'implantation nécessite une interaction coordonnée entre le blastocyte et l'endomètre sur une courte période. L'implantation en elle-même est gouvernée par des modulateurs à action endocrine, paracrine et autocrine, d'origine maternelle ou fœtale. Une concentration sanguine suffisante de  $17\beta$  œstradiol et de progestérone en période post-ovulatoire est requise et la rapidité de l'élévation de la concentration plasmatique en progestérone est un facteur important qui conditionne le développement sécrétoire de l'endomètre. La progestérone permettrait la production et l'action de cytokines, ainsi que l'activation de gènes nécessaires à l'implantation embryonnaire (Funk et De Mayo, 1999). L'activité de ces hormones stéroïdes dépend à la fois de leur concentration et de l'expression de leurs récepteurs. D'autres hormones (ou facteurs hormonaux) influent sur leur action (Chang, 2008).

## **2.3. Rôles de la progestérone pour la physiologie de l'oviducte**

La croissance et la multiplication cellulaires des tissus reproducteurs sont étroitement corrélées avec les niveaux d'hormones stéroïdes. Ainsi l'histologie tubaire est fortement modifiée selon le stade du cycle sexuel de l'animal. Chez la brebis, sous l'effet de la progestérone, les cellules ciliées de l'épithélium oviductal se différencient et leur proportion diminue (Fontaine *et al.*, 2009).

Chez la vache, la progestérone module la composition du liquide tubaire, notamment en acides aminés (multiplication par deux de la concentration en glycine) (Hugentobler *et al.*, 2010) et diminue la fréquence des battements ciliaires (Wessel *et al.*, 2004). Chez la rate, la progestérone inhibe les contractions du myosalpinx et la vitesse de transport des embryons (Croxatto, 2002). Enfin, une administration de progestérone seule sur des chiennes ovariectomisées ayant été préalablement implantée avec des embryons a permis le maintien de la gestation jusqu'au terme.

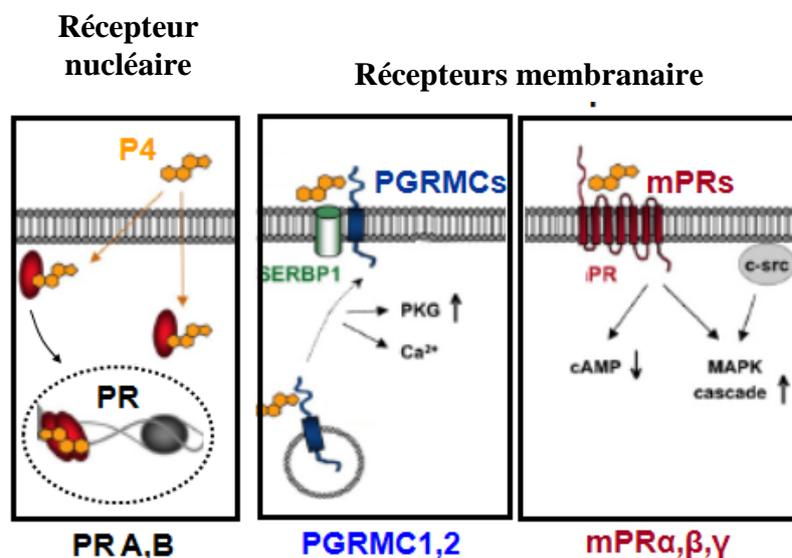
### 3. Les récepteurs à la progestérone

Dans l'oviducte, la progestérone exerce un rôle médiateur dans la maturation méiotique de l'ovocyte par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (Zhu *et al.*, 2003 ; Fernandes *et al.*, 2005 ; Chapman *et al.*, 2006 ; Nutu *et al.*, 2007, 2009 ; Romero *et al.*, 2008).

Il a été identifié deux types d'action de la progestérone : une action génomique lente via des récepteurs nucléaires (PR) (Graham et Clark, 1997) et une action non génomique rapide via des récepteurs membranaires (PGRMC-1 et PGRMC-2) (Gellersen *et al.*, 2009) (Figure 6). D'autres récepteurs, mPr, ont été mis en évidence plus récemment.

La progestérone requiert la présence préalable ou simultanée d'œstrogènes qui stimulent la production des récepteurs à la progestérone. Ainsi, les deux classes d'hormones agissent souvent de façon synergique, bien qu'elles puissent aussi agir de façon antagoniste (Funk et De Mayo, 1999 ; Granner, 2002).

**Figure 6 : Différents types de récepteurs à la progestérone mis en évidence dans l'oviducte** (Fernandes *et al.*, 2008).



### **3.1. Les récepteurs nucléaires : médiateurs de l'action génomique de la progestérone**

Les récepteurs nucléaires (PR) existent sous deux formes : PR-A et PR-B, qui résultent de l'utilisation de promoteurs différents au sein du même gène référence.

Leur structure comprend un domaine d'activité dont 2 à 3 domaines de régulation transcriptionnelle (AF), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine de liaison au ligand (LBD). L'isoforme A est plus court que l'isoforme B car il ne possède pas de troisième domaine d'activité transcriptionnelle (AF3). Ce domaine permet à l'isoforme B de fixer un certain nombre de co-activateurs et d'exercer des fonctions biologiques différentes. Certaines études menées suggèrent que la forme A régule de façon négative la forme B (Gellersen *et al.*, 2009).

Ainsi, la proportion relative entre les deux isoformes dans les cellules cibles déterminerait si un gène spécifique sera transcrit ou non dans ces cellules lors de stimulation hormonale. Le récepteur PR-A est majoritairement présent dans l'ovaire et le tractus génital. Le récepteur PR-B est exprimé dans la glande mammaire (Blanchard, 2006). Récemment, ces récepteurs nucléaires (ARNm et protéines) ont été mis en évidence au sein de l'ampoule, de l'isthme et de la jonction utéro-tubaire dans l'oviducte canin (Tahir *et al.*, 2013). Des études ont montré une diminution de l'expression des récepteurs PR depuis le proœstrus jusqu'au metœstrus dans l'oviducte canin (Lessey *et al.*, 1981 ; Vermeirsch *et al.*, 2002 ; Tahir *et al.*, 2013). Une diminution similaire de l'expression du gène PR dans l'oviducte a aussi été observée chez la vache (Ulbrich *et al.*, 2003 ; Kenngott *et al.*, 2011) et chez la femme (Horne *et al.*, 2009). De plus, l'expression des gènes codant pour ces récepteurs PR est régulée par les hormones stéroïdiennes : en effet, les œstrogènes favorisent la synthèse des récepteurs alors que la progestérone l'inhibe (Graham et Clarke, 1997).

### **3.2. Les récepteurs membranaires : action non génomique de la progestérone**

La découverte des récepteurs membranaires à la progestérone est récente et remonte à une dizaine d'années. Ces récepteurs permettent une action rapide de la progestérone dans les cellules qui expriment ou non les récepteurs nucléaires. Deux types de récepteurs membranaires sont impliqués dans cette action non génomique : les membrane *Progesterone Receptors* (mPRs) et les *Progesterone Receptor Membrane Components 1 et 2* (PGRMC-1 et PGRMC-2). L'action non génomique pourrait aussi être médiée par des récepteurs nucléaires.

### 3.2.1. membrane Progesterone Receptors (mPRs)

Initialement, ces récepteurs ont été découverts dans les ovaires de poissons et ultérieurement identifiés chez plusieurs mammifères, incluant la femme (Zhu *et al.*, 2003). Il s'agit de protéines de 40 kDa appartenant à la famille des *Progesterone and Adiponectin Receptor* (PAQR).

Ces récepteurs existent au moins sous trois isoformes différentes : mPR $\alpha$  (PAQR VII), mPR $\beta$  (PAQR VIII) et mPR $\gamma$  (PAQR V). Le récepteur mPR $\alpha$  est impliqué dans l'induction de la maturation ovocytaire et de l'hypermobilité du spermatozoïde par la progestérone chez le poisson (Thomas, 2008).

### 3.2.2. Progesterone Receptors Membrane Components (PGRMC)

Il existe deux isoformes PGRMC : PGRMC-1 et PGRMC-2, qui appartiennent à la famille des *Membrane Associated Progesterone Receptors* (MAPR). PGRMC-1 est une protéine de petite taille (24 kDa) mise en évidence dans la membrane interne des spermatozoïdes du porc (Gellersen *et al.*, 2009), dans les cellules de la granulosa et les cellules lutéales de souris (Peluso *et al.*, 2006).

L'expression de PGRMC1 a été démontrée dans les cellules du cumulus chez la vache (Luciano *et al.*, 2010 ; Aparicio *et al.*, 2011) et au sein des cellules de la granulosa chez la femme (Elassar *et al.*, 2012), laissant suggérer un rôle potentiel de ces récepteurs dans la maturation de l'ovocyte. L'expression de ces récepteurs a été détectée également dans le complexe ovocyte-cumulus et les cellules oviductales chez la chienne (Tahir *et al.*, 2013). Les informations sur PGRMC-2 sont rares. Il s'agit d'une protéine de petite taille (32 kDa) dont les fonctions biologiques sont à ce jour inconnues. Sa capacité de liaison à la progestérone n'a pas été étudiée. L'expression des gènes codant pour PGRMC-1 et PGRMC-2 est généralement opposée à celle de PR dans l'ampoule et dans l'isthme et l'œstradiol inhibe l'expression des gènes codant pour les récepteurs membranaires alors que la progestérone la favorise (Gellersen *et al.*, 2009). L'expression différente de PR et des PGRMC laisse penser que ces deux types de récepteurs pourraient avoir des fonctions différentes.

Afin de mieux connaître les rôles de la progestérone pendant la période péri-ovulatoire, nous avons utilisé une approche pharmacologique utilisant un antagoniste des récepteurs nucléaires de la progestérone : l'aglépristone.

## D- L'aglépristone

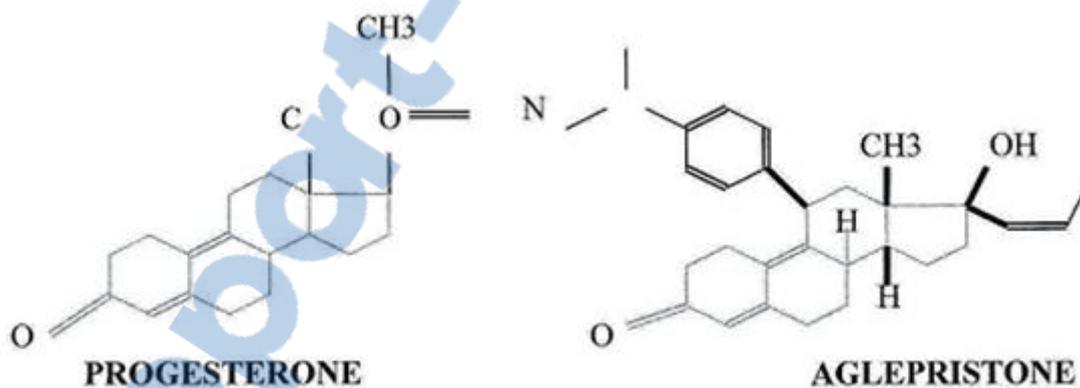
### 1. Généralités et propriétés pharmacologiques chez la chienne

L'aglépristone, également appelée RU 46 534, est un antagoniste par liaison aux récepteurs nucléaires de la progestérone. Stéroïde de synthèse à action anti-progestative, l'aglépristone se lie aux récepteurs nucléaires de la progestérone avec une affinité trois fois supérieure à celle de la progestérone endogène chez la chienne (Commission Nationale de Pharmacovigilance Vétérinaire, 2007). L'aglépristone annule l'action de la progestérone sur les cellules cibles.

C'est actuellement le seul anti-progestatif utilisé en médecine vétérinaire pour l'interruption de la gestation (Chabbert-Buffet *et al.*, 2005).

La structure chimique de l'aglépristone est très similaire à celle de la progestérone, expliquant ainsi son affinité pour ses récepteurs (Figure 7).

**Figure 7 : Comparaison de la structure chimique de la progestérone et de l'aglépristone, d'après Hoechst-Roussel, 1996.**



L'action abortive de cette molécule est bien décrite. En revanche, ses actions sur la croissance folliculaire, la maturation de l'ovocyte et le développement embryonnaire sont actuellement inconnues. Le rôle central de la progestérone pour la préparation et le maintien de la gestation va conditionner les domaines d'indications de l'aglépristone. De nombreuses applications sont ainsi déjà reconnues en médecine vétérinaire et concernant l'espèce canine, l'aglépristone est surtout utilisée dans l'avortement et dans le traitement du pyomètre. Si le traitement est effectué avant la nidation des embryons dans l'endomètre, celle-ci est empêchée et les embryons sont résorbés.

L'aglépristone peut être utilisée sur les chiennes jusqu'à 45 jours après une saillie non désirée. Lors du traitement d'une chienne dont la gestation a été diagnostiquée, un avortement dans un intervalle de 7 jours est observé dans 85 % des cas référence.

## **2. Effet de l'aglépristone sur la période péri-ovulatoire chez la chienne**

Très peu d'études se sont penchées sur l'action de l'aglépristone sur la fonction oviductale. Récemment, Reynaud *et al.*, (2013) ont réalisé une étude sur l'administration d'aglépristone sur des chiennes en période péri-ovulatoire, plus particulièrement sur ses effets sur l'oviducte.

Quarante trois chiennes Beagle (25 témoins et 18 traitées) ont été incluses dans cette étude et le suivi des chaleurs a été réalisé par frottis vaginal et dosage de la progestéronémie. Une première injection d'aglépristone (10 mg/mL) a été réalisée juste avant le pic de LH (la concentration de progestérone étant inférieur à 0.5 ng/mL) et une seconde injection a été réalisée 24 heures plus tard. La croissance folliculaire et l'ovulation ont été suivies par échographie.

Deux jours après l'ovulation, certaines chiennes (3 témoins et 5 traitées) ont été inséminées. Toutes les chiennes ont été ovariectomisées à différents stades après l'ovulation.

Les résultats de cette étude ont révélé que chez la chienne l'administration d'aglépristone en période péri-ovulatoire chez la chienne ne modifie ni la croissance folliculaire ni l'ovulation. Par contre, l'aglépristone a eu des effets très importants sur la maturation ovocytaire et le transit des spermatozoïdes.

En effet, la maturation ovocytaire a été retardée : chez les chiennes traitées à l'aglépristone, les ovocytes collectés étaient tous au stade de vésicule germinative entre 79 heures et 141 heures après l'ovulation, tandis que chez les chiennes non traitées, les ovocytes récoltés entre 83 heures et 126 heures après ovulation étaient déjà au stade de métaphase II de la méiose. De plus, aucun des ovocytes des chiennes traitées à l'aglépristone n'avait atteint le stade de métaphase II même 10 jours après l'ovulation.

Au niveau des gamètes mâles, il a été observé une diminution du transport et de la survie des spermatozoïdes dans le tractus chez les chiennes traitées et inséminées, aucun spermatozoïde n'a été retrouvé dans l'oviducte. En l'absence de fécondation, aucun embryon n'a été observé.

Ces résultats très récents posent la question du mode d'action de l'aglépristone. Il est possible qu'elle ait des effets directs sur les gamètes (spermatozoïdes et ovocyte expriment des récepteurs nucléaires à la progestérone) ou indirects, via les cellules oviductales et le fluide oviductal dans lequel baignent et mûrissent les ovocytes.

Dans le but de caractériser d'éventuelles modifications de la composition du fluide oviductal, nous avons prélevé ce fluide chez des chiennes témoins et traitées à l'aglépristone. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à détecter et à localiser quatre protéines différentiellement exprimées lors du traitement à l'aglépristone dans l'étude menée par Harichaux et ses collaborateurs (2013).



## DEUXIEME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE

Le rôle de l'oviducte est donc particulièrement important pour assurer la fécondation et le développement précoce de l'embryon chez la chienne contrairement à ce qui se passe chez la plupart des mammifères. Ces deux événements se font chez la chienne dans un environnement riche en progestérone. Notre étude expérimentale a eu pour objectif d'explorer les effets potentiels de la progestérone sur la composition protéique du fluide oviductal en période péri-ovulatoire chez la chienne.

### A. Objectifs

Le but de notre travail était d'analyser les effets de la progestérone sur la sécrétion et la localisation cellulaire de protéines d'intérêts exprimées dans l'oviducte et potentiellement régulées par cette hormone en période péri-ovulatoire.

Le choix des quatre protéines d'intérêt étudiées au cours de cette thèse a été basé sur l'analyse protéomique du fluide tubaire réalisée par l'équipe de Harichaux *et al.* en 2013 et selon deux critères : profil d'expression connu dans différentes espèces et la fonction décrite dans la littérature.

Nous avons utilisé un antagoniste de la progestérone, l'aglépristone, pour inhiber les effets potentiels de la progestérone chez les chiennes traitées durant toute la période péri-ovulatoire.

### B. Matériel et méthodes

#### 1. Schéma expérimental

##### 1.1. Animaux

Pour réaliser cette étude, les oviductes de 8 chiennes adultes pubère, de 1 à 5 ans ont été collectés sur le site de l'École nationale vétérinaire d'Alfort (ENVA) entre 2009 et 2013 (Tableau 3). Ces chiennes étaient de race Beagle et provenaient du laboratoire de reproduction de l'École nationale vétérinaire d'Alfort. Les 8 chiennes ont été divisées en deux lots : un lot témoin ( $n = 4$ ) et un lot de chiennes traitées à l'aglépristone ( $n = 4$ ). Elles ont ensuite été ovariectomisées et hystérectomisées pendant leurs chaleurs, 4 jours après l'ovulation.

**Tableau 3: Nombre de chienne Beagle utilisé dans cette étude, stade ovarien et concentration en progestérone plasmatique à J+4.**

Nombre d'animaux	Stade ovarien	Concentration plasmatique en progestérone à l'ovariectomie (ng/mL) m±sd [min-max]
8	J+4 4 jours après l'ovulation	51,2 ± 27,8 [31,2 – 112,7]

### 1.2. Injection d'aglépristone

Les chiennes entrées en chaleur et ayant une progestéronémie inférieure ou égale à 0,5 ng/mL ont été incluses dans le protocole et traitées à l'aglépristone (RU 46 534), un antagoniste de la progestérone, commercialisé sous le nom ALIZINE ®.

Le protocole d'administration a prévu en deux injections de 10 mg/kg à 24 heures d'intervalle, par voie sous cutanée, conformément à la posologie utilisée pour induire un avortement. La première injection est intervenue quatre à cinq jours après l'entrée en chaleur de la chienne et sur le critère d'une progestéronémie inférieure à 0,5ng/mL. Si besoin, une injection 7 jours après la première injection a été réalisée pour maintenir une concentration efficace en aglépristone jusqu'à J+4. Hormis un épaissement au niveau du point d'injection qui a disparu en quelques jours, aucun effet secondaire n'a été observé. La concentration plasmatique en aglépristone atteint une concentration maximale deux jours après l'injection et reste efficace six jours (Commission Nationale de Pharmacovigilance Vétérinaire, 2007).

### 1.3. Choix des protéines étudiées

Nous avons concentré notre travail sur quatre protéines mises en évidence dans l'analyse protéomique réalisée par l'équipe de Harichaux *et al.* (2013). Il s'agit des protéines suivantes : CD 109, céruloplasmine, clusterine et lactoferrine (Tableau 4).

Les critères de sélection ont été les suivants :

- différence significative d'expression suite au traitement à l'aglépristone ( $p < 0,05$ ) dans l'étude de Harichaux *et al.*, (2013) ;
- rôle déjà décrit dans la littérature pour la survie et la protection des cellules (antioxydant, immunitaire, anti-apoptotique).

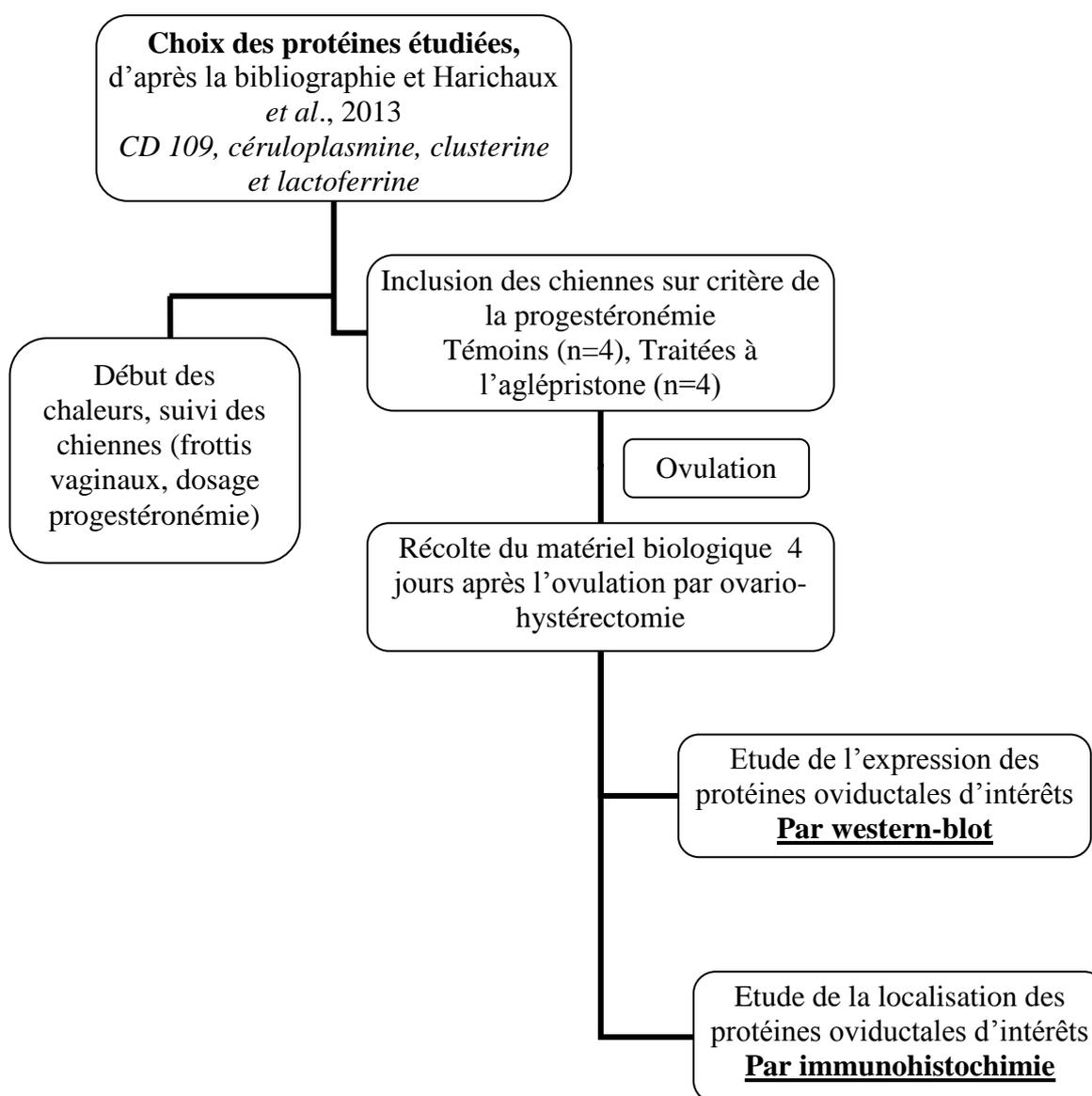
**Tableau 4 : Protéines candidates étudiées, potentiellement régulées par la progestérone dans l'oviducte canin, d'après Harichaux *et al.*, 2013.**

Nom de la protéine	Nature ou rôle au sein de l'oviducte	T-Test (P-value)	Effet de l'aglépristone	Bibliographie
CD109 antigène	Protéine membranaire	$1,9 \text{E-}07$	Diminution (x18,2)	Schilsky <i>et al.</i> , 1992
Céruloplasmine	Anti-oxydante	$4,5 \text{E-}06$	Diminution (x2,4)	Zwain et Amato, 2000 Fahiminyia <i>et al.</i> , 2010
Clusterine	Anti-apoptotique	$1,3 \text{E-}08$	Diminution (x15,3)	Jenne et Tschopp, 1992
Lactoferrine	Défense immunitaire	$2,3 \text{E-}06$	Uniquement présente sous aglépristone	Zumoffen <i>et al.</i> , 2013

#### 1.4. Stratégie expérimentale

Dans un premier temps, l'expression des protéines candidates chez les deux lots de chiennes a été validée par western-blot. Dans un second temps, la localisation des protéines candidates a été validée par immunohistochimie mais par manque de temps, seulement pour le lot témoin (Figure 8).

**Figure 8 : Stratégie expérimentale simplifiée utilisée dans cette étude.**



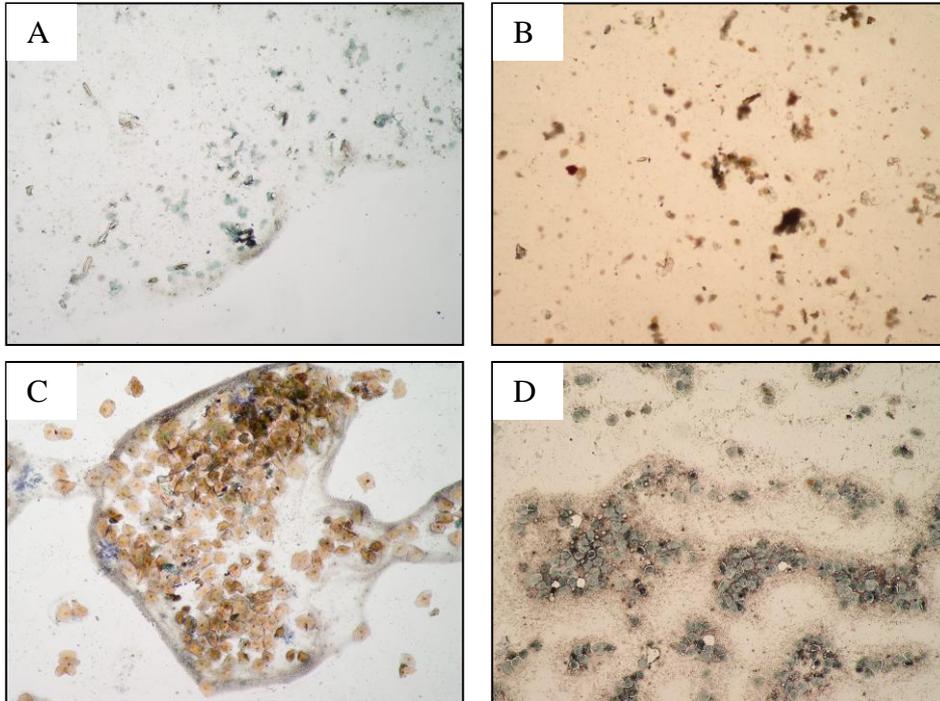
## 2. Détermination des périodes du cycle œstral

Les cycles ovariens des chiennes ont été suivis par frottis vaginaux hebdomadaires et coloration de Harris-Shorr (Réactifs RAL, CML, Nemours, France) (Figure 9). Dès l'entrée en œstrus un dosage quotidien de la progestérone a été réalisé (analyseur Elecsys 2010, Roche, Meylan, France). En effet, en raison de la lutéinisation des follicules préovulatoires, le dosage de la progestérone plasmatique est utilisé pour déterminer le moment du pic de LH, quand la progestérone plasmatique est à 2 ng/mL, et le moment de l'ovulation, quand la progestérone atteint 6 ng/mL (Reynaud *et al.*, 2009). Après l'ovulation, une prise de sang a été réalisée chaque jour afin de mettre en évidence une éventuelle différence endocrinologique entre les 2 groupes.

### Figure 9 : Détermination de la période du cycle par frottis vaginal chez la chienne

(d'après Service CERCA, ENVA).

**A** : frottis d'anœstrus ; **B** : frottis de pro-œstrus ; **C** : frottis d'œstrus ; **D** : frottis de métœstrus.

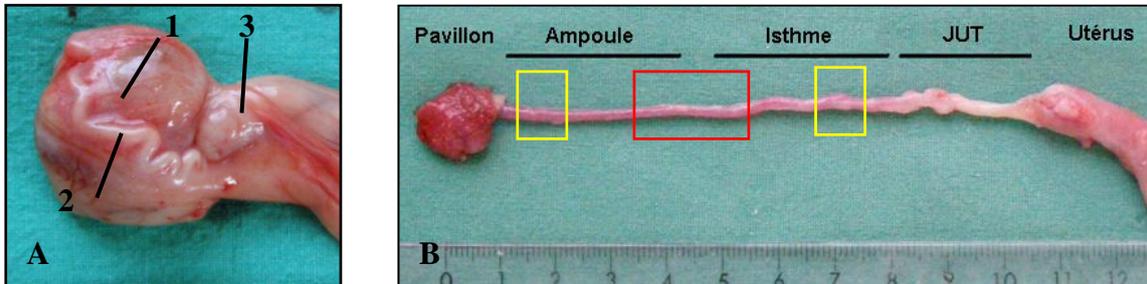


### 3. Prélèvement du matériel biologique

Les ovaires et les oviductes ont été prélevés lors d'une ovario-hystérectomie. Ils ont ensuite été disséqués juste après exérèse chirurgicale (Figure 10).

Après retrait de la bourse ovarique et dissection, les oviductes ont été rincés avec 100  $\mu$ L de PBS (Phosphate Buffered Saline) et ce fluide oviductal dilué a été centrifugé à 500 g pour retirer d'éventuelles cellules en suspension. Le fluide a été congelé immédiatement à  $-18^{\circ}$  C. Un segment d'ampoule et un segment d'isthme de 1 cm de longueur ont été fixés (paraformaldéhyde 4 % dans PBS) pour réaliser des coupes histologiques ; le segment du milieu a été congelé pour extraire les protéines et effectuer les western-blots.

**Figure 10 : Anatomie de l'oviducte canin** : **A** : dans la bourse ovarique ; **B** : après dissection. 1 : ovaire (dans la bourse ovarique) ; 2 : oviducte ; 3 : utérus ; JUT : jonction utéro-tubaire. Les *cadres jaunes* désignent les segments utilisés pour l'immunohistochimie ; le *cadre rouge* désigne le segment utilisé pour le western-blot.



Pour la préparation des coupes histologiques en vue de l'immunohistochimie, les segments d'oviducte ont ensuite été inclus en paraffine : après déshydratation par deux bains successifs dans l'alcool à 70 % puis à 100 %, les tissus ont été incubés dans du butanol. Enfin, les tissus ont été incubés dans trois bains successifs de paraffine à 56°C avant d'être placés dans des moules en plastiques remplis de paraffine et conservées à température ambiante.

Des coupes histologiques d'une épaisseur de 7  $\mu\text{m}$  ont été réalisées puis déposées sur des lames de verre préalablement traitées au 3-aminopropyl-triéthoxy-silane dilué à 5 % dans l'acétone (coating).

## 4. Western-blot

### 4.1. Principe de la technique

Le western-blot est une technique de biologie des protéines utilisant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer selon leur masse des protéines préalablement dénaturées. Ces protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose, où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt (Burnette, 1981).

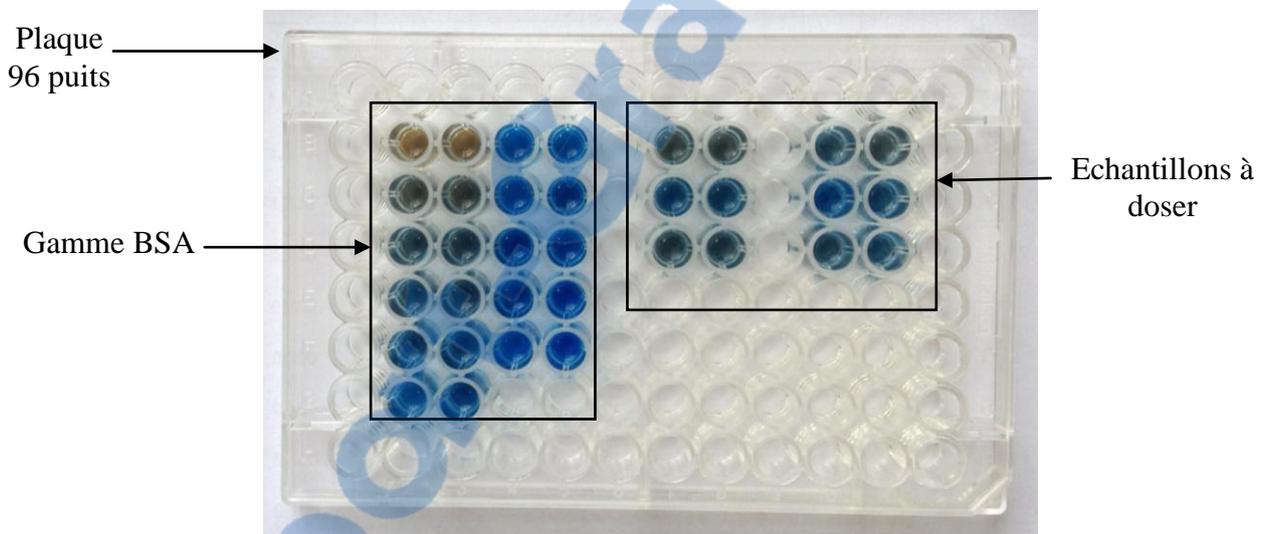
### 4.2. Préparation des échantillons (dosage des protéines)

Les 8 oviductes prélevés aux stades J+4 ont été broyés dans l'azote liquide puis dilués dans du tampon de lyse (KCl 10 mM, Tris 10 mM, EDTA 0,5 mM, IGEPAL CA-630 1 %, inhibiteurs de protéases 1 % ; pH 7,2).

Après centrifugation, un dosage des protéines selon la méthode de Bradford a été effectué (Bio-Rad Protein Assay®, Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France), afin de déposer sur les gels la même quantité de protéines pour chaque échantillon. Cette méthode est basée sur la modification de la longueur d'onde d'absorption du bleu de Coomassie G-250 en milieu acide après sa fixation sur les acides aminés (Bradford, 1976).

La valeur obtenue pour chaque animal a été comparée à une courbe standard établie avec des concentrations connues de BSA (Bovine Serum Albumin). La photo 1 ci-dessous illustre le dosage protéique des échantillons dans une plaque 96 puits par la méthode de Bradford.

**Photo 1 : Dosage protéique par la méthode de Bradford, plaque 96 puits avec la gamme BSA (Bovine Serum Albumin) et les échantillons à doser.**



### 4.3. Electrophorèse

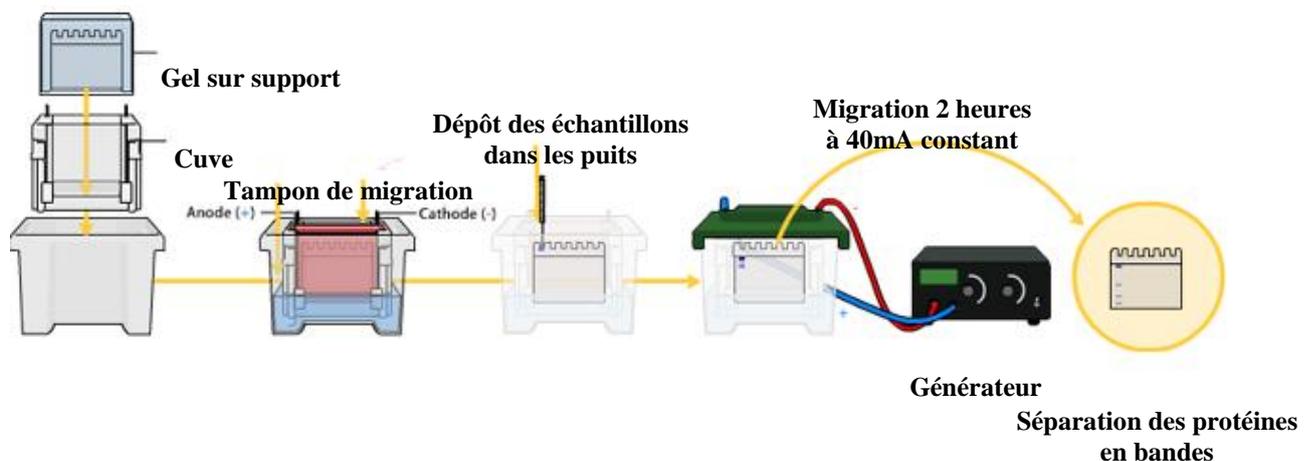
Les protéines de l'échantillon ont ensuite été séparées selon leur taille par électrophorèse sur gel d'acrylamide 10 % (Tableau 5).

**Tableau 5 : Composition du gel d'acrylamide lors de l'électrophorèse.**

Nature du gel	Mini gel (20 mL)	
Gel de séparation à 10 %	1,5 M Tris-HCL pH8,8	5 mL
	Acrylamide 30 %	5 mL
	Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 %	200 µL
	Persulfate d'ammonium (APS) 10 %	100 µL
	Temed	20 µL
	Eau déminéralisée	9,7 mL

Pour chaque animal, 50 µg de protéines ont été mélangés à du tampon Laemmli 2X (Tris 240 mM, SDS 700 mM, glycérol 30 %, pH 6,8, bleu de bromophénol) et du β-mercapto-éthanol 5mM puis chauffés 5 min à 95°C au bain-marie à sec. Les échantillons ont ensuite été posés sur glace puis chargés pour migration dans un mini-gel SDS-PAGE à 10 % (migration sous ampérage constant 40 mA et à 4°C pendant environ 2h) (Figure 11).

**Figure 11 : Principe de la séparation du gel d'électrophorèse SDS-PAGE (d'après : Biotech Rouen).**



#### 4.4. Transfert sur membrane

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par les anticorps, elles ont été transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose dans un tampon de migration (Tableau 6). Le transfert s'effectue sous voltage constant 40V et à 4°C toute la nuit (Bio-Rad).

**Tableau 6 : Composition d'un litre de tampon de migration utilisé lors du transfert sur membrane de nitrocellulose.**

<b>Tampon de migration</b>	14,4 g Glycine 3 g Tris-glycine 1 g SDS	À diluer dans 1 litre d'eau distillée
----------------------------	---	---

Le lendemain, la membrane a été colorée au rouge Ponceau pendant 15 min pour vérifier le bon transfert des protéines, puis rincée au PBS-Tween 20 0,1 % pendant 20 min.

#### 4.5. Blocage

Des précautions ont été prises pour minimiser les interactions non spécifiques entre les protéines présentes sur la membrane et les anticorps utilisés. La membrane a été incubée pendant 1h à 37°C dans une solution de lait écrémé en poudre dilué à 5 % dans le PBS-Tween (pH 7,4) afin de saturer les sites non spécifiques.

#### 4.6. Détection et révélation

La membrane a ensuite été incubée 1h30 à 37°C avec l'anticorps associé à la protéine d'intérêt dans un mélange lait 5 % / PBS-Tween. Après un lavage dans du PBS-Tween, puis une nouvelle saturation de 30 min à 37°C dans le lait 5 % / PBS-Tween, la membrane est incubée 1h à 37°C avec l'anticorps secondaire associé couplé à la peroxydase. Nous ne disposons pas d'anticorps spécifique des protéines canines. Des anticorps produits chez le lapin et chez la chèvre et dirigés contre des protéines humaines ou murines ont été testés sur nos échantillons comme indiqué dans le Tableau 7.

Pour les anticorps primaires de lapin, un anticorps secondaire anti lapin, couplé à la peroxydase a été utilisé au 1/1000<sup>ème</sup> (Sigma-Aldrich A6154). Pour les anticorps primaires de chèvre, un anticorps secondaire anti chèvre, produit chez le lapin, a été utilisé (Jackson Laboratories 305-035-00).

**Tableau 7: Liste des protéines et des anticorps primaires associés** (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne), **conditions et concentrations testées en Western-blot.**

<b>Protéines</b>	<b>Rôle ou nature de la protéine</b>	<b>Anticorps primaire</b>	<b>Concentration</b>
CD 109	Protéine membranaire	Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre une partie interne de la CD109 humaine, H-91 sc-98793	1/500 0,4 µg/mL
Céruloplasmine	Anti-oxydante	Anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la partie N-terminale de la céruloplasmine humaine, N-20 sc-21240	1/500 0,4 µg/mL
Clusterine	Anti-apoptotique	Anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la partie C-terminale de la clusterine de souris, M-18 sc-6420	1/500 0,4 µg/mL
		Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la partie C-terminale de la clusterine humaine, H-330 sc-8354	1/500 0,4 µg/mL
Lactoferrine	Défense immunitaire	Anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre une partie interne de la lactoferrine humaine, N-20 sc-14431	1/500 0,4 µg/mL

La révélation a été effectuée par chimioluminescence : la membrane a été mise en contact 1 min avec le substrat luminal de la peroxydase (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific), puis avec un film autoradiographique (Amersham GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). La présence des protéines a été identifiée grâce à des anticorps produits par des lapins ou des chèvres.

## 5. Immunohistochimie

Après préparation des coupes histologiques, les lames ont été déparaffinées dans deux bains successifs de toluène durant 10 min, puis réhydratées par deux lavages à l'éthanol à 100 % puis 50 % durant 5 min, avant rinçage dans le PBS.

Les lames ont ensuite été pré-incubées dans une solution de citrate de sodium 40 mM bouillant pendant 10 min dans le but de démasquer les épitopes. Après rinçage dans le PBS, les lames ont été incubées pendant 20 min à température ambiante dans du sérum de cheval (kit ImmPRESS anti-goat IgG Peroxidase, Vector Laboratories, CliniSciences, Nanterre, France) afin de minimiser la liaison non spécifique.

Puis les lames ont été incubées toute une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire correspondant à la protéine étudiée à une concentration de 2 µg/mL dans un mélange lait 5 % / PBS-Tween.

Pour vérifier la spécificité du marquage, certaines coupes histologiques ont été incubées avec des IgG de l'animal ayant produit l'anticorps primaire (Tableau 8) à la même concentration que ce dernier.

**Tableau 8 : Liste des IgG (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) utilisées pour vérifier la spécificité du marquage, suivant l'anticorps primaire utilisé.**

<b>Anticorps primaire</b>	<b>IgG purifiées correspondantes</b>
anticorps polyclonal de chèvre	IgG purifiées à partir de sérum de chèvre, I-5256, Sigma-Aldrich
anticorps polyclonal de lapin	IgG purifiées à partir de sérum de lapin, I-5006, Sigma-Aldrich

Le lendemain, les lames ont été rincées deux fois au PBS-Tween pendant 5 min, puis incubées 10 minutes à température ambiante dans de l'eau oxygénée à 0.3 %, dans le but d'épuiser la peroxydase endogène. Après 2 nouveaux lavages, une incubation de 45 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase a été réalisée.

Enfin, après deux derniers lavages au PBS-Tween, le substrat de la peroxydase (ImmPACT NovaRED Peroxidase Substrate, Vector Laboratories) a été ajouté pendant quelques minutes (suivi de la révélation au microscope) avant rinçage à l'eau distillée.

Après une contre-coloration par l'hématoxyline de Shandon (Réactifs RAL) ammoniaquée (ammoniaque 3 % dans éthanol), les échantillons ont été montés entre lame et lamelle dans le milieu Immu-mount (Thermo Fisher Scientific, Cergy-Pontoise, France) et observés aux grossissements x200 et x1000 au microscope Olympus BX41 (Zeiss, Rungis, France).

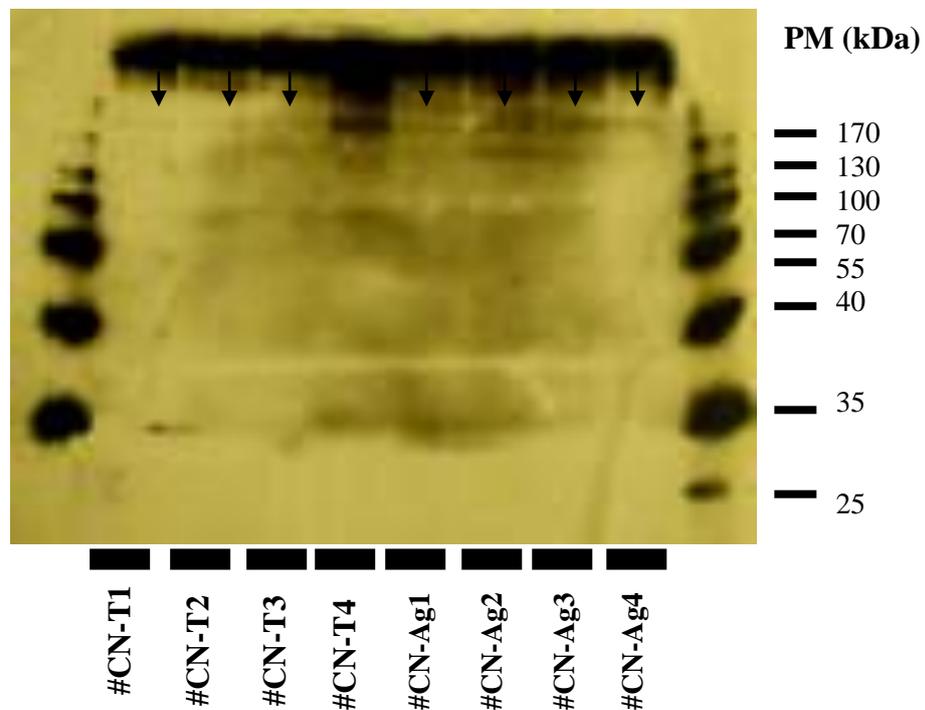
## C. Résultats

### 1. Détection des protéines d'intérêt par western-blot

#### 1.1. Expression de la protéine CD109

La Figure 12 présente le film obtenu après immunomarquage de la protéine CD 109 par western-blot.

**Figure 12 : Détection de la protéine CD109 par western-blot dans les fluides oviductaux de 4 chiennes témoins et 4 chiennes traitées à l'aglépristone au stade J+4.**

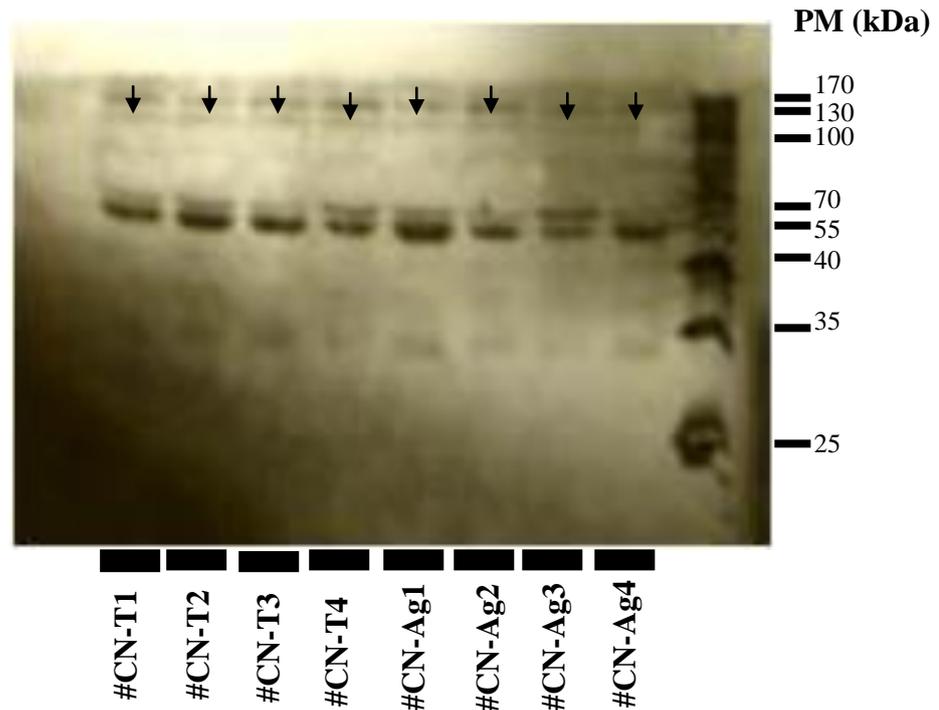


Une bande au poids moléculaire attendu (170kDa) a été observée chez les 4 chiennes traitées à l'aglépristone et chez les 4 chiennes témoins. Pour une chienne témoin, une bande de très forte intensité a été observée, tandis que les 3 autres bandes témoins étaient d'intensité plus faible.

## 1.2. Expression de la protéine Céruloplasmine

La figure 13 présente le film obtenu après immunomarquage de la protéine céruloplasmine par western-blot.

**Figure 13 : Détection de la protéine céruloplasmine par western-blot dans les fluides oviductaux de 4 chiennes témoins et 4 chiennes traitées à l'aglépristone au stade J+4.**

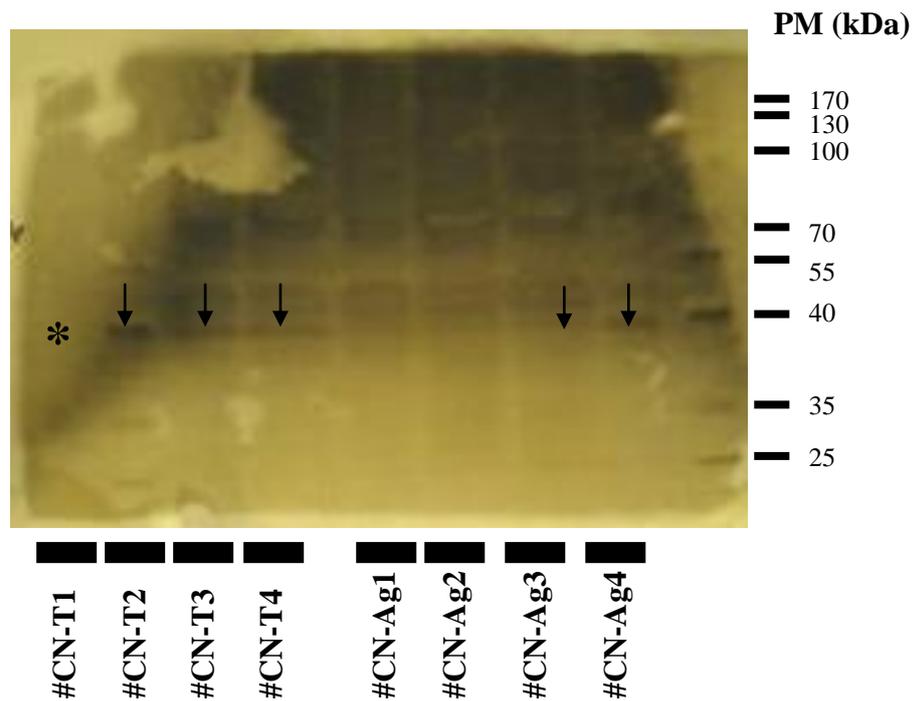


Une bande a été observée aux alentours de la taille attendue (130 kDa) pour l'ensemble des échantillons témoins et traités à l'aglépristone mais nous avons pu observer aussi des bandes non spécifiques de différents poids moléculaires, allant de 35 kDa à 55 kDa. Les bandes à 55 kDa correspondent probablement à une fixation non spécifique de l'anticorps sur l'albumine.

### 1.3. Expression de la protéine Clusterine

Deux anticorps ont été testés afin de détecter la protéine clusterine par western-blot : l'anticorps 6420 et l'anticorps H330. La figure 14 présente le film obtenu après immunomarquage avec l'anticorps 6420.

**Figure 14 : Détection de la clusterine (anticorps 6420) par western-blot sur les fluides oviductaux de 4 chiennes témoins et 4 chiennes traitées à l'aglépristone au stade J+4.**



Une bande au poids moléculaire attendu (40 kDa) a été observée sur 3 chiennes témoins et 2 chiennes traitées. La qualité du film rend difficile la visualisation précise des bandes pour les autres échantillons.

La détection de la clusterine avec l'anticorps H330 n'a pas fonctionné pour l'ensemble des échantillons testés et aucune bande n'a été observée.

#### **1.4. Expression de la protéine Lactoferrine**

Toutes nos séries de western-blot pour détecter la lactoferrine ont échoué. Nous n'avons jamais visualisé de bande au poids moléculaire attendu. De nouvelles tentatives avec un gel à pourcentage d'acrylamide différent seront réalisées au laboratoire.

## **2. Détection des protéines oviductales d'intérêt par immunohistochimie**

### **2.1. Difficultés rencontrées**

En raison des contraintes de temps et de difficultés rencontrés lors de la contre-coloration par l'hématoxyline de Shandon, seulement 2 chiennes témoins sur les 4 ont été utilisées en immunohistochimie.

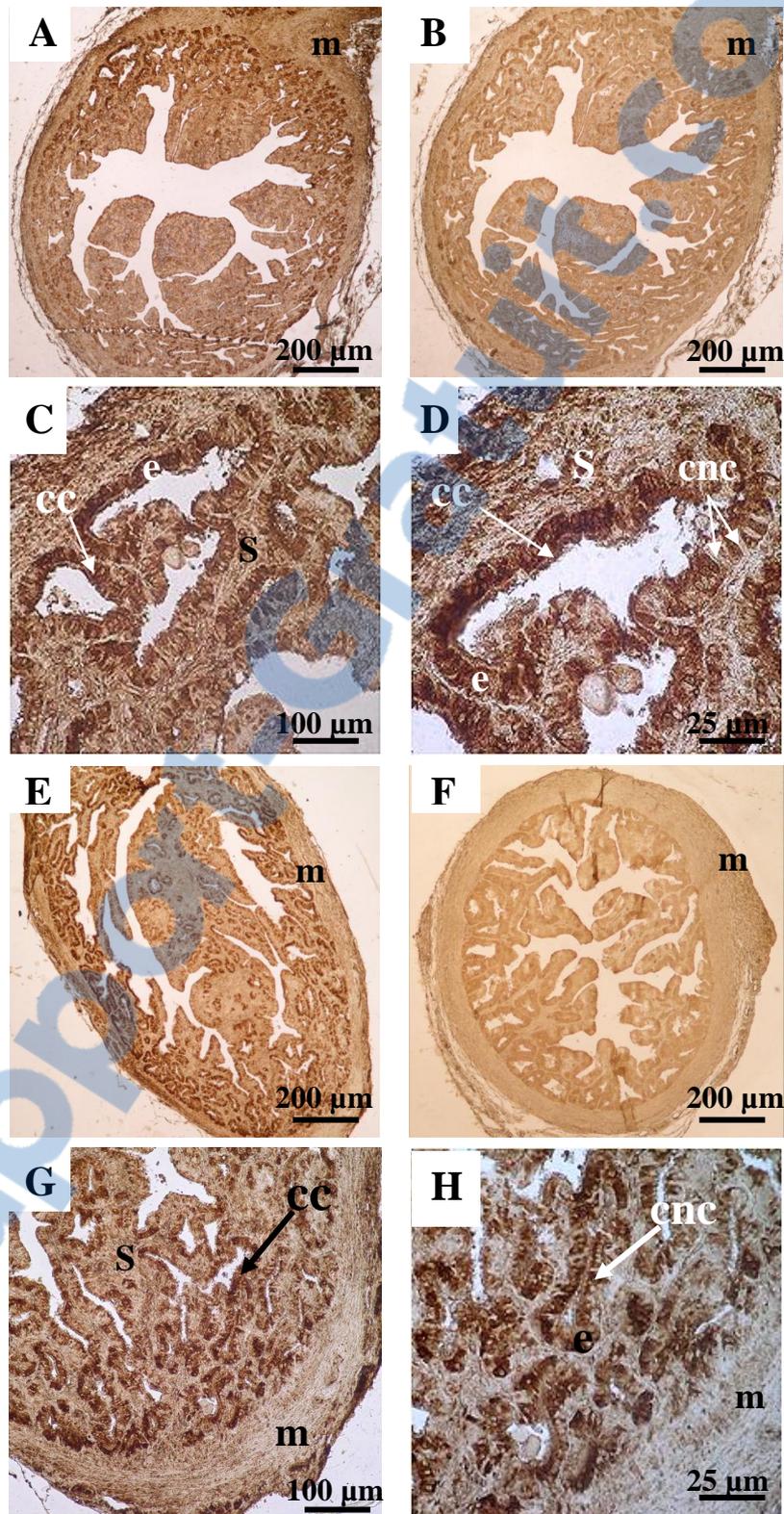
La détection de la lactoferrine n'a pas fonctionné (aucun marquage spécifique) pour les 2 essais effectués

### **2.2. Expression de la protéine CD109**

La protéine CD109 a été détectée spécifiquement dans les cellules ciliées et les cellules non ciliées de l'épithélium tubaire au stade J+4 sur l'ensemble des coupes histologiques (2 chiennes témoins, Figure 15). Pour vérifier la spécificité du marquage, une coupe histologique « contrôle » a été incubée avec des IgG spécifiques de l'animal ayant produit l'anticorps primaire à la même concentration que l'anticorps (Figures 15B et 15F).

Son expression ne semble pas dépendre du type de cellule puisque les cellules ciliées et non ciliées sont marquées (Figure 15D). Cependant, nous avons observé un marquage hétérogène des cellules ciliées : certaines d'entre elles ne sont pas marquées. Les cellules ciliées les plus marquées étaient celles situées en périphérie. Enfin, aucune différence d'expression de la CD 109 n'apparaissait selon la région considérée, puisque l'isthme et l'ampoule étaient marqués de la même façon.

**Figure 15 : Expression de la protéine CD 109 dans l'oviducte (ampoule et isthme) au cours du stade J+4 chez la chienne. (A, B, C, D) : Ampoule ; (E, F, G, H) : Isthme ; (B, F) : Contrôles (IgG non spécifiques).**



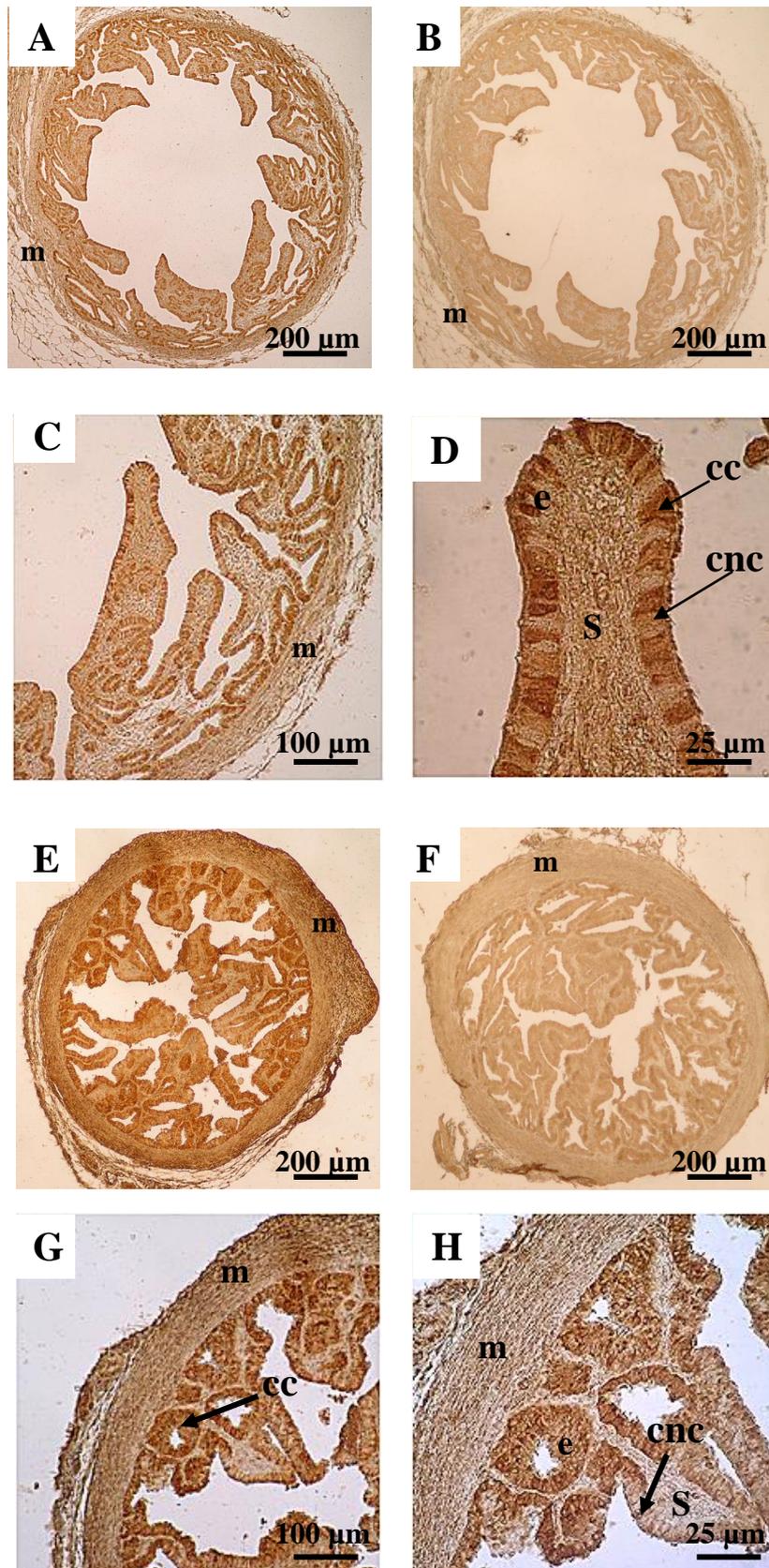
*m* : couche musculaire ; *s* : stroma ; *e* : épithélium  
*cc* : cellules ciliées ; *cnc* : cellules non ciliées

### **2.3. Expression de la protéine Céruloplasmine**

Les résultats obtenus après détection par immunohistochimie de la céruloplasmine sont présentés sur la Figure 16.

La protéine céruloplasmine est détectée seulement dans les cellules ciliées de l'épithélium (Figure 16D) au stade J+4 sur l'ensemble des coupes histologiques utilisées. Son expression ne semble pas être modifiée suivant la région considérée puisque l'ampoule et l'isthme sont marqués de la même façon. Pour vérifier la spécificité du marquage, une coupe histologique « contrôle » a été incubée avec l'IgG spécifique de l'animal ayant produit l'anticorps primaire utilisé à la même concentration que ce dernier (Figures 16B et 16F).

**Figure 16 : Expression de la protéine céruloplasmine dans l'oviducte (ampoule et isthme) au stade J+4 chez la chienne. (A, B, C, D) : Ampoule ; (E, F, G, H) : Isthme ; (B, F) : Contrôles (IgG non spécifiques).**



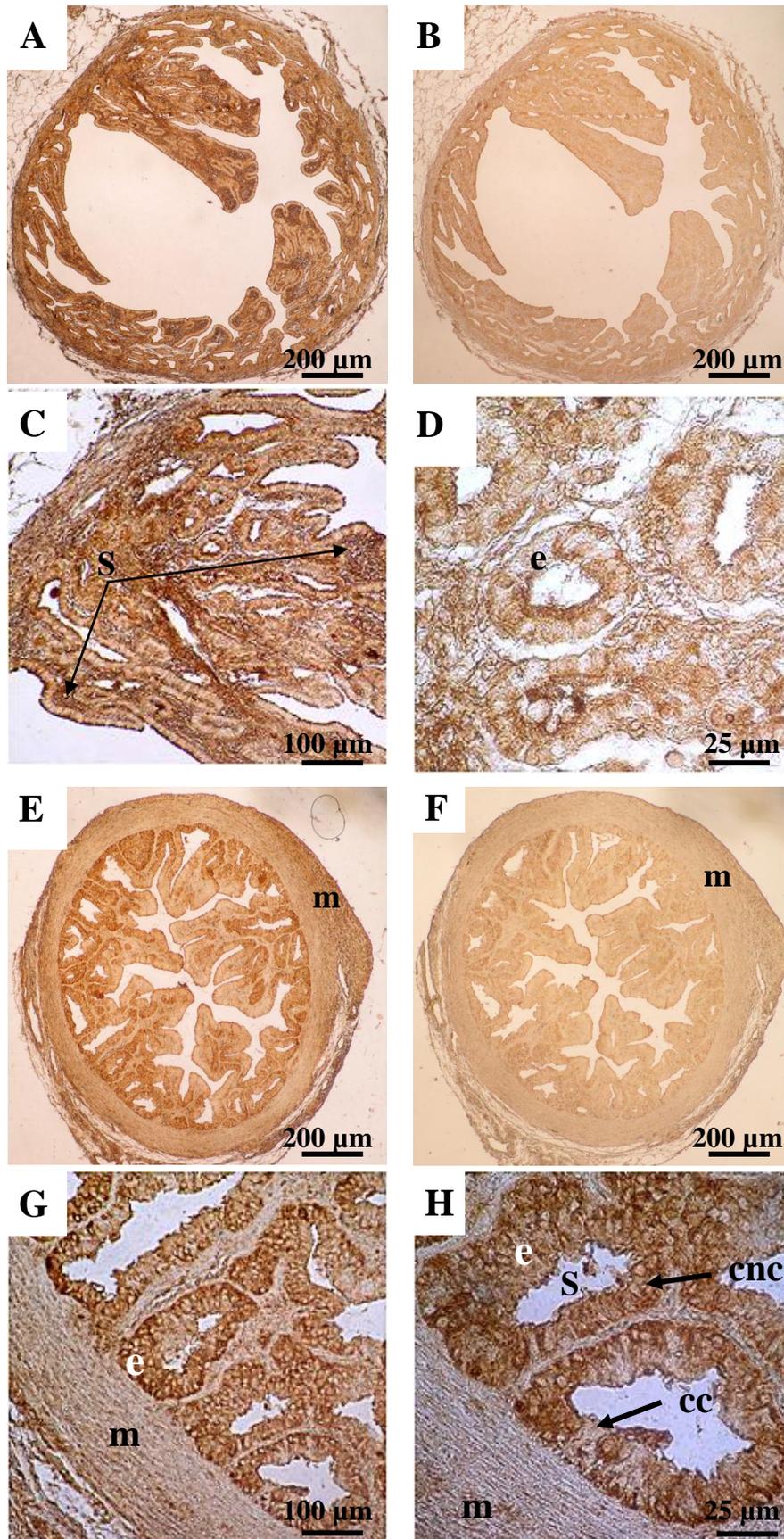
*m* : couche musculaire ; *s* : stroma ; *e* : épithélium  
*cc* : cellules ciliées ; *cnc* : cellules non ciliées

#### **2.4. Expression de la protéine Clusterine**

La protéine clusterine (anticorps 6420) a été détectée dans le tissu oviductal au stade J+4 sur l'ensemble des coupes histologiques utilisées (Figure 17). Pour vérifier la spécificité du marquage, une coupe histologique « contrôle » a été incubée avec l'IgG spécifique de l'animal ayant produit l'anticorps primaire (Figures 17B et 17F).

Une différence d'expression a été observée. Dans l'isthme, seul la majorité du cytoplasme des cellules sécrétrices de l'épithélium était marqué (Figure 17H), tandis que dans l'ampoule, très peu de marquage était observé, à part dans le stroma (Figure 17C). Cependant, la qualité de l'image rend difficile l'appréciation exacte.

**Figure 17 : Expression de la protéine clusterine dans l'oviducte (ampoule et isthme) au stade J+4 chez la chienne. (A, B, C, D) : Ampoule ; (E, F, G, H) : Isthme ; (B, F) : Contrôles (IgG non spécifique).**



*m* : couche musculaire ; *s* : stroma ; *e* : épithélium  
*cc* : cellules ciliées ; *cnc* : cellules non ciliées



## D. Discussion

Dans cette étude, nous avons cherché à analyser les effets de la progestérone sur l'expression et la localisation cellulaire de protéines d'intérêts présentes dans l'oviducte et potentiellement régulées par cette hormone au stade J+4, moment clé du passage de l'ovocyte au stade métaphase II fécondable. Le choix des quatre protéines d'intérêt étudiées a été basé sur une analyse protéomique du fluide tubaire réalisée par l'équipe de Harichaux *et al.* (2013). Dans cette étude, suite à l'administration d'un antagoniste de la progestérone (l'aglépristone), une sur ou une sous-expression de certaines protéines (variant d'un facteur allant de 2 à 25) suggérait un rôle de la progestérone sur leur expression.

Deux lots d'animaux au stade J+4 ont été comparés : un lot témoin n'ayant préalablement reçu aucun traitement (n = 4) et un lot traité par l'aglépristone (n = 4) pendant une période d'environ 7 à 10 jours autour de l'ovulation. La technique du western-blot nous a permis de confirmer l'expression de ces quatre protéines à la fois chez les animaux traités et chez les animaux témoins. La technique d'immunohistochimie nous a permis de localiser leur expression (protéine sécrétée ou excrétée) au sein du tissu oviductal. Cependant, par manque de temps, seuls les animaux témoins ont été testés en immunohistochimie.

Dans notre étude, nous avons détecté l'expression de la protéine CD109 chez les animaux témoins et chez les animaux traités à l'aglépristone. L'immunohistochimie nous a permis de révéler la présence de la protéine CD109 dans les cellules ciliées et non ciliées de l'épithélium tubaire de l'ampoule et de l'isthme chez les chiennes témoins. Cette protéine pourrait donc être sécrétée par l'épithélium tubaire ou également diffuser depuis le sérum via la vascularisation de l'oviducte.

Dans l'étude menée par Harichaux *et al.* (2013), l'expression de la protéine CD109 a été divisée par un facteur dix-huit suite au traitement à l'aglépristone. La progestérone semble donc augmenter l'expression de cette protéine, identifiée comme un nouveau membre de la famille des macroglobulines (Lin *et al.*, 2002). Bien que sa fonction précise ne soit pas encore connue, des études ont montré que la protéine CD109 était impliquée dans l'inhibition de la signalisation de TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) par sa fixation sur le récepteur TGF  $\beta$ 1 (Finsson *et al.*, 2006 ; Audran, 2012). Une dérégulation de la signalisation du TGF- $\beta$  induit des anomalies au cours du développement embryonnaire et le développement de processus néoplasiques comme le cancer du sein ou des carcinomes épidermoïdes (Hashimoto *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2004 ; Sato *et al.*, 2007 ; Hasegawa *et al.*, 2007 ; Hagiwara *et al.*, 2008).

Dans ce travail, nous avons étudié l'environnement tubaire au stade J+4 durant lequel l'ovocyte termine la métaphase II et devient fécondable. Il est possible qu'une augmentation de la sécrétion de CD109 par la progestérone à ce moment clé du cycle permette de diminuer les risques de dérégulation de la voie de TGF- $\beta$  et par conséquent, diminue le risque d'apparition d'anomalies. Ainsi, cette régulation d'expression de la protéine CD109 par la progestérone permettrait la mise en place d'un microenvironnement tubaire sain, propice à une fécondation et un développement embryonnaire précoce (pour rappel, l'embryon canin passe entre 5 et 6 jours dans l'oviducte avant implantation dans l'utérus). Des études sur l'association entre la protéine CD109 et la voie de signalisation de TGF- $\beta$  chez la chienne pourraient être intéressantes pour mieux caractériser ce rôle.

Nous avons détecté l'expression de la protéine céruloplasmine à la fois chez les animaux témoins et chez les animaux traités. Une différence d'expression a été observée selon le type cellulaire chez les chiennes témoins : elle apparaissait uniquement dans les cellules ciliées et pas dans les cellules non ciliées sécrétrices. La céruloplasmine est une protéine de transport du cuivre dans le sang, d'origine hépatique et appartenant à un groupe de protéines appelées alpha 2 globulines. L'étude de Harichaux *et al.* (2013) a révélé que l'expression de la céruloplasmine était divisée par un facteur deux suite au traitement par l'aglépristone. La progestérone aurait donc un rôle activateur sur son expression. Néanmoins, notre étude nous a montré que les cellules non ciliées sécrétrices n'étaient pas marquées donc, la céruloplasmine a probablement une origine extra-tubaire et n'est pas produite au sein même de l'oviducte. Elle pourrait diffuser depuis la circulation générale. Chez l'homme, des études ont montré son expression dans le placenta, les testicules (Aldred *et al.*, 1987) et les glandes mammaires (Jaeger *et al.*, 1991). Il semblerait aussi que l'utérus puisse à la fois être à l'origine d'une sécrétion de forme active de céruloplasmine mais également que les cellules de l'épithélium utérin soient capables d'incorporer le cuivre transporté par cette dernière (Shilsky *et al.*, 2007).

Nous avons détecté la présence de la protéine clusterine chez les animaux témoins et chez les animaux traités à l'aglépristone. Une différence d'expression a été observée suivant la région étudiée sur les chiennes témoins. Dans l'ampoule, la clusterine se situe dans le stroma. Dans l'isthme, elle se situe dans les cellules sécrétrices. Ces premiers résultats nous orientent donc vers une origine sécrétoire de la clusterine par l'épithélium tubaire de l'isthme dans le fluide oviductal.

L'expression de la clusterine a été diminuée d'un facteur quinze suite au traitement à l'aglépristone au stade J+4 dans l'étude menée par Harichaux *et al.* (2013). La progestérone aurait donc un rôle fortement stimulant sur sa sécrétion. Jomary *et al.* (1999) ont montré chez l'homme qu'une forte expression de clusterine sous forme sécrétée était anti-apoptotique au cours du développement. Ainsi, à la vue de nos résultats et de ceux obtenus par Harichaux *et al.* (2013), une sécrétion accrue de clusterine sous l'influence de la progestérone au sein de l'oviducte au stade J+4 pourrait permettre de maintenir un équilibre physiologique via la production de facteur anti-apoptotique, créant ainsi un environnement favorable à la fécondation et au développement embryonnaire précoce.

Nous n'avons pas réussi à détecter la présence de la lactoferrine par western-blot et immunohistochimie suite à des problèmes de spécificité de l'anticorps. Nous allons donc tester d'autres anticorps et insister pour analyser cette protéine d'intérêt. L'étude de Harichaux *et al.* (2013) a révélé la présence de cette protéine dans le fluide oviductal et une surexpression par un facteur 25 suite au traitement à l'aglépristone. La progestérone aurait donc un effet fortement inhibiteur sur sa sécrétion. Une étude récente chez l'homme menée par Zumoffen (Zumoffen *et al.* 2013) a révélé que la lactoferrine, isolée du fluide oviductal humain, pourrait interagir avec les spermatozoïdes et les ovocytes afin de moduler leur interaction, notamment dans la régulation de la polyspermie.

Cette étude nous a donc permis d'effectuer une première analyse du fluide oviductal en nous focalisant sur l'expression et la localisation de quatre protéines d'intérêt, au stade J+4, suite à un traitement avec un antagoniste de la progestérone (l'aglépristone). Ce travail s'inscrit dans un projet plus global visant à comprendre les rôles de la progestérone dans la maturation ovocytaire, la fécondation et le développement embryonnaire précoce. Afin de valider les résultats de protéomique obtenus par Harichaux *et al.* (2013), d'autres anticorps vont être testés au sein du laboratoire afin de compléter ce travail.



## CONCLUSION

L'étude du microenvironnement tubaire dans l'espèce canine a pour but de mieux connaître les conditions propices à la maturation ovocytaire, la fécondation et le développement embryonnaire précoce afin de pouvoir éventuellement les reconstituer in vitro. L'oviducte est aujourd'hui considéré comme un microenvironnement complexe nécessaire à la maturation ovocytaire et au développement embryonnaire précoce. Les particularités de la physiologie de la reproduction chez la chienne par rapport aux autres mammifères en font un modèle particulièrement intéressant. L'environnement endocrinien, et notamment les concentrations plasmatiques de progestérone sont à l'origine d'une lutéinisation pré-ovulatoire et une concentration sanguine très élevée en progestérone est observée pendant la phase préovulatoire chez la chienne. L'injection d'un antagoniste de la progestérone induit un important retard de reprise de méiose ovocytaire et un blocage du transit des spermatozoïdes. Cette injection induit aussi des modifications du protéome oviductal.

L'objectif de notre étude était d'explorer les effets de la progestérone sur la sécrétion et la localisation de quatre protéines oviductales (CD 109, céruloplasmine, clusterine et lactoferrine) en utilisant un inhibiteur de la progestérone : l'aglépristone. Ces effets ont été explorés 4 jours après l'ovulation chez 4 chiennes témoins et 4 chiennes traitées. L'expression des protéines a été analysée plus finement par western-blot et la localisation cellulaire de ces protéines a été explorée par immunohistochimie. Seules des chiennes témoins ont été utilisées en immunohistochimie. Ceci ne permet donc pas de comparer les deux lots afin d'observer d'éventuels modifications de lieux de sécrétion induites par le traitement à l'aglépristone.

L'étude quantitative menée par Harichaux et son équipe (2013) a montré que ces 4 protéines avaient une régulation modifiée suite à l'administration d'aglépristone, laissant sous entendre un rôle régulateur de la progestérone sur leur sécrétion. Très peu d'étude sont consacrées aux fonctions exactes de ces protéines dans l'espèce canine. Notre étude a confirmé leur présence dans le fluide oviductal en période péri-ovulatoire mais nous n'avons pas observé, sur notre petit échantillon, d'effet quantitatif significatif de l'aglépristone sur leur expression. Les protéines étaient localisées dans l'ampoule et dans l'isthme. Nous avons observé que la CD109 et la clusterine étaient localisées dans les cellules sécrétrices de l'épithélium tubaire tandis que la céruloplasmine était localisée sur les cellules ciliées uniquement.

De telles données nous encouragent à étudier la fonction précise de ces protéines dans la fonction de reproduction chez la chienne afin de comprendre pourquoi la progestérone intervient dans la régulation de leur expression. Les biotechnologies *in vitro* dans l'espèce canine restent encore inefficaces par rapport aux autres espèces (taux de maturation *in vitro* inférieur à 10 %) ; comprendre les variations de la composition du microenvironnement tubaire sous l'effet de la progestérone constitue donc un enjeu biotechnologique important.

Ce travail est une première ébauche qu'il conviendra de compléter afin de mieux caractériser la sécrétion des protéines oviductales chez la chienne et le rôle de la progestérone sur celles-ci pour mieux comprendre les variations de la composition du microenvironnement tubaire.

# BIBLIOGRAPHIE

- ABE H, ONODERA M, SUGAWARA S, SATOH T, HOSHI H. (1999). Ultrastructural features of goat oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *J. Anat.*, **195**, 515-521.
- AGUILAR J, REYLEY M. (2005). The uterine tubal fluids: secretion, composition and biological effects. *Anim. Reprod.*, **2**, 91-105.
- ALDRED AR, GRIMES A, SCHREIBER G, MERCER JF. (1987). Rat ceruloplasmin. Molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta, and testis. *J Biol Chem.*, **262**, 2875-2878.
- APARICIO IM, GARCIA-HERREROS M, O'SHEA LC, HENSEY C, LONERGAN P, FAIR T. (2011). Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.*, **84**, 910-921.
- AREEKIJSEREE M, THONGPAN A, VEJARATPIMOL R. (2005). Morphological features of porcine oviductal epithelial cells and cumulus-oocyte complex. *Kasetsart J. Nat. Sci.*, **39**, 136-144.
- AUDRAN E. (2012). Recherche de biomarqueurs des cellules propagatrices de glioblastome : étude de la signalisation calcique et du protéome membranaire. Thèse Pharma, Strasbourg.
- AUSTIN CR. (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian Journal of Scientific Research*. **4**:581-596.
- AVILES M, GUTIERREZ-ADAN A, COY P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs ? *Mol. Hum. Reprod.*, **16**, 896-906.
- BARONE R. (2001). *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4 : Splanchnologie II*. Troisième édition. Paris : Édition Vigot frères, 951 p.
- BRUSSOW K-P, RATKY J, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2008). Fertilization and Early Embryonic Development in the Porcine Fallopian Tube. *Reprod. Dom. Anim.*, **43**, 245-251.
- BAUDRILLARD E. (1992). L'oviducte des mammifères et son rôle dans la reproduction. Thèse Méd.Vét., Alfort.
- BAVISTER BD. (2000) Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*, **53**, 619-626.
- BIEMANN K, HUNT DF, HIGNITE CE. (1968). Structure elucidation of dinucleotides by mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 378-383.
- BLANCHARD S. (2006). L'insuffisance lutéale chez les femelles domestiques et la femme, Thèse Méd. Vét., Alfort.

- BOICE M, GEISTERT R, BLAIR R, VERHAGE H. (1990). Identification and characterization of the novo synthesized porcine oviductal secretory protein. *Biol. Reprod.*, **43**, 929-938.
- BRADFORD M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.*, **72**, 248-254.
- BUHI W, O'BRIEN B, ALVAREZ I, ERDOS G, DUBOIS D. (1993). Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biol. Reprod.*, **48**, 1274-1283.
- BURNETTE WN. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* **2** :195-203.
- BUTTYAN R, OLSSON CA, PINTAR J, CHANG C, BANDYK M, SAWCZUK IS. (1989). Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 3473-3481.
- CHANG MC. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature.* **168**: 697-698.
- CHAPMAN NR, KENNELLY MM, HARPER KA, EUROPE-FINNER GN, ROBSON SC. (2006). Examining the spatio-temporal expression of mRNA encoding the membrane-bound progesterone receptor alpha isoform in human cervix and myometrium during pregnancy and labour. *Mol. Hum. Reprod.*, **12**, 19-24.
- CATHENOZ L, MARSAN C. (1996). Contribution à l'étude de la reproduction chez la chienne : analyse des dossiers des chiennes suivies au centre d'étude en reproduction canine assistée de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort de 1990 à 1993. Thèse Méd. Vét., Alfort, n°38.
- CHABBERT-BUFFET N, MEDURI G, BOUCHARD P, SPITZ IM. (2005). Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Hum. Reprod. Update.*, **11**, 293-307.
- CHANG SP. (2008). Comparison of Crinone 8 % intravaginal gel and intramuscular progesterone for luteal support in in vitro fertilization. *J. Chin. Med. Assoc.*, **8**, 381-385.
- CHASTANT-MAILLARD S, VIARIS DE LESEGNO C, CHEBROUT M, THOUMIRE S, MEYLHEUC T, FONTBONNE A, CHODKIEWICZ M, SAINT-DIZIER M, REYNAUD K. (2011). The Canine Oocyte: Uncommon Features of in Vivo and in Vitro Maturation. *Reprod. Fertil. Dev.*, **3**, 391-402.
- CONCANNON P, CANN JP, TEMPLE M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil.*, **39**, 3-12.

CONCANNON P, TSUTSUI T, SHILLE V. (2001). Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **57**, 169-179.

COUSINS RJ. (1985). Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.*, **65**, 238-309.

CROXATTO HB. (2002). Physiology of Gamete and Embryo Transport through the Fallopian Tube. *Reprod. Biomed. Online*, **4**, 160-169.

DEBURE L, VAYSSIERE JL, RINCHEVAL JL, LOISON F, LE DREAN Y, MICHEL D. (2003). Intracellular clusterin causes juxtannuclear aggregate formation and mitochondrial alteration. *J. Cell. Sci.*, **116**, 3109-3121.

DOBRINSKI I, IGNOTZ GG, THOMAS PG, BALL BA. (1996). Role of Carbohydrates in the Attachment of Equine Spermatozoa to Uterine Tubal (oviductal) Epithelial Cells in Vitro. *Am. J. Vet. Res.*, **11**, 1635-1639.

DUMON C. (1992). Physiologie sexuelle de la chienne. In *Reproduction du chien et du chat*. PMCAC Ed., Paris, 11-18.

EHRENWALD E, FOOTE RH, PARKS JE. (1990). Bovine Oviductal Fluid Components and Their Potential Role in Sperm Cholesterol Efflux. *Mol. Reprod. Dev.*, **2**, 195-204.

ELASSAR A, LIU X, SCRANTON V, WU CA, PELUSO JJ. (2012). The relationship between follicle development and progesterone receptor membrane component-1 expression in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, **97**, 572-578.

FAHIMINIYA S, REYNAUD K, LABAS V, BATARD S, CHASTANT-MAILLARD S, GERARD N. (2010). Steroid hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **8**, 132-145.

FERNANDES MS, PIERRON V, MICHALOVICH D, ASTLE S, THORNTON S, PELTOKETO H, LAM EW, GELLERSEN B, HUHTANIEMI L, ALLEN J, BROSENS JJ. (2005). Regulated expression of putative membrane progesterin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *J. Endocrinol.*, **187**, 89-101.

FINNISON KW, TAM BY, LIU K, MARCOUX A, LEPAGE P, ROY S, BIZET AA, PHILIP A. (2006). Identification of CD109 as part of the TGF- $\beta$  receptor system in humankeratinocytes, *FASEB J.* **20**, 1525-1527.

FONTBONNE A, BUFF S, GARNIER F. (2000). Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. *Point Vét.* **31**, **209**, 395-401.

FONTBONNE A, REYNAUD K, MARSELOO N. (2004). In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. In : Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, 4-6 août 2004, 144-146.

- FONTAINE E, REYNAUD K, THOUMIRE S, CHEBROUT M, FAURE L, SEGALINI M. (2009). Microenvironnement tubaire: rôle dans la maturation des ovocytes canins in vivo et in vitro. *Bull. Acad. Vét. France*, **162**, 145-154.
- FRENCH LE, WOHLWEND A, SAPPINO AP. (1994). Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J. Clin. Invest.*, **93**, 877-884.
- FUNK CR, DE MAYO FJ. (1999). Progesterone actions on reproductive tract, In: *Encyclopedia of reproduction, vol. 4*, Academic Press, 6-15.
- GELLERSEN B, FERNANDES MS, BROSENS JJ. (2009). Non genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum. Reprod. Update*, **15**, 119-138.
- GRAHAM JD, CLARKE CL. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.*, **18**, 502-519.
- GRANNER DK, MURRAY RK, MAYES PA, RODWELL VW. (2002). *Biochimie de Harper, 25e édition américaine*. Les Presses de l'Université Laval, De Boeck, 594-608.
- GUERIN C, FONTBONNE A. (1997). Les frottis vaginaux et le suivi du cycle œstral chez les carnivores. Intervet Ed., Angers, 1-16.
- GUTIERREZ A, GARDE J, GARCIA-ARTIGA C, VASQUEZ I. (1993). Ram Spermatozoa Cocultured with Epithelial Cell Monolayers: An in Vitro Model for the Study of Capacitation and the Acrosome Reaction. *Mol. Reprod. Dev.*, **3**, 338-345.
- HAGIWARA S, MURAKUMO Y, SATO T, SHIGETOMI T, MITSUDO K, TOHNAI I, UEDA M, TAKAHASHI M. (2008). Up-regulation of CD109 expression is associated with carcinogenesis of the squamous epithelium of the oral cavity, *Cancer Sci.*, **99**, 1916–1923.
- HASEGAWA M, HAGIWARA S, SATO T, JIJIWA M, MURAKUMO Y, MAEDA M, MORITANI S, ICHIHARA S, TAKAHASHI M. (2007). CD109, a new marker for myoepithelial cells of mammary, salivary, and lacrimal glands and prostate basal cells, *Pathol. Int.*, **57**, 245–250.
- HASHIMOTO M, ICHILARA M, WATANAB T, KAWAI K, KOSHIKAWA K, YUASA T, TAKAHASHI N, YATABE Y, MURAKUMO Y, ZHANG JM, NIMURA Y, TAKAHASHI M. (2004). Expression of CD109 in human cancer, *Oncogene*. **23**, 3716–3720.
- HOECHST-ROUSSEL. (1996). Alizine. *Plaquette Informativ*e.
- HOLT WV, FAZELI A. (2010). The Oviduct as a Complex Mediator of Mammalian Sperm Function and Selection. *Mol. Reprod. Dev.*, **77**, 934–943.
- HORNE AW, KING AE, SHAW E, MACDONALD SE, WILLIAMS AR, SAUNDERS PT, CRITCHLEY H.O. (2009). Attenuated sex steroid receptor expression in fallopian tube of women with ectopic pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**, 5146-5154.

HOURCADE J D, PEREZ-CRESPO M, FERNANDEZ-GONZALEZ R, PINTADO B, GUTIERREZ-ADAN A. (2010). Selection Against Spermatozoa with Fragmented DNA after Postovulatory Mating Depends on the Type of Damage. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **8**, 9-19.

HUGENTOBLER SA, SREENAN JM, DISKIN MG, MORRIS DG. (2007a). Ion concentrations in oviduct and uterine fluid and blood serum during the oestrous cycle in the bovine. *Theriogenology*, **68**, 538-548.

HUGENTOBLER SA, SREENAN JM, LEESE H.J, HUMPHERSON PG, WATSON T, DISKIN MG, MORRIS DG. (2007b). Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle in bovine. *Mol. Reprod. Dev.*, **74**, 445-454.

HUGENTOBLER SA, SREENAN JM, HUMPHERSON PG, LEESE HJ, MORRIS DG. (2008). Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Mol. Reprod. Dev.*, **75**, 496-503.

HUGENTOBLER SA, SREENAN JM, HUMPHERSON PG, LEESE H.J, DISKIN MG, MORRIS DG. (2010). Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *Reprod. Fertil. Dev.*, **22**, 684-694.

HUNTER RH. (1998). Have the Fallopian Tubes a Vital Rôle in Promoting Fertility? *Acta Obs. Gyn. Scand.*, **77**, 475–486.

HUNTER RH. (2011). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol. Rev.*, **87**, 244-255.

HUNTER RH, FRASER RH. (2005). The Fallopian Tubes in Domestic Mammals: How Vital Is Their Physiological Activity? *Reprod. Nutr. Dev.*, **45**, 281–290.

HUNTER RH, WILMUT I. (1984). Sperm Transport in the Cow: Peri-ovulatory Redistribution of Viable Cells Within the Oviduct. *Reprod. Nutr. Dev.*, **24**, 597–608.

JAEGER JL, SHIMIZU N, GITLIN JD. (1991). Tissue-specific ceruloplasmin gene expression in the mammary gland. *Biochem. J.*, **280**, 671-677.

JENNE DE, TSCHOPPJ. (1992). Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem Sci.*, **17**, 154-159.

JOHNSTON SD, OLSON PNS., ROOT KUSTRITZ MV. (2001). The canine estrous cycle. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia : WB Saunders, 16-31.

JOMARY C, CHATELAIN G, MICHEL D, WESTON A, NEAL M, JONES SE. (1999). Effect of targeted expression of clusterin in photoreceptor cells on retinal development and differentiation. *J. Cell. Sci.*, **112**, 1455-1464.

KENNGOTT RA, VERMEHREN M, SAUER U, EBACH K, SINOWATZ F. (2011). Cellular expression and localization of oestrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor mRNA in the bovine oviduct combining laser-assisted microdissection, quantitative PCR and in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.*, **59**, 312-327.

- KOLLE S, DUBIELZIG S, REESE S, WEHREND A, KONIG P, KUMMER W. (2009). Ciliary Transport, Gamete Interaction, and Effects of the Early Embryo in the Oviduct: Ex Vivo Analyses Using a New Digital Videomicroscopic System in the Cow. *Biol. Reprod.*, **81**, 267–274.
- LAEMMLI UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- LAM X, GIESEKE C, KNOLL M, TALBOT P. (2000). Assay and Importance of Adhesive Interaction Between Hamster (*Mesocricetus Auratus*) Oocyte-cumulus Complexes and the Oviductal Epithelium. *Biol. Reprod.*, **62**, 579–588.
- LEESE HJ, HUGENTOBLER SA, GRAY SM, MORRIS DG, STURMEY RG, WHITEAR SL. (2008). Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod. Fertil. Dev.*, **20**, 1-8.
- LESSEY BA, WAHAWISAN R, GORELL TA. (1981). Hormonal regulation of cytoplasmic oestrogen and progesterone receptors in the beagle uterus and oviduct. *Mol. Cell Endocr.*, **21**, 171-180.
- LIN M, SUTHERLAND DR, HORSFALL W. (2002). Cell surface antigen CD109 is a novel member of the alpha(2) macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins. *Blood* **99**, 5, 1683–1691.
- LISHKO P, BOTCHKINA I, KIRICHOK Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*, **471**, 387–391.
- LUCIANO AM, LODDE V, FRANCIOSI F, CECILIANI F, PELUSO JJ. (2010). Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization and early embryonic development. *Reproduction*, **140**, 663-672.
- LYONS RA, SARIDOGAN E, DJAHANBAKHCH O. (2006). The Reproductive Significance of Human Fallopian Tube Cilia. *Hum. Reprod. Update*, **12**, 363–372.
- MARTUS NS, VERHAGE HG, MAVROGIANNIS PA, THIBODEAUX J. (1998). Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal glycoprotein. *J. Reprod. Fertil.*, **113**, 323-329.
- MENEZO Y, GUERIN P. (1997). The Mammalian Oviduct: Biochemistry and Physiology. *Europ. J. Obs. Gyn. Reprod. Biol.*, **73**, 99–104.
- NUTU M, WEIJDEGARD B, THOMAS P, THURIN-KJELLBERG A, BILLIG H, LARSSON DG. (2007). Membrane progesterone receptor gamma : tissue distribution and expression in ciliated cells in fallopian tube. *Mol. Reprod. Dev.*, **74**, 843-850.
- NUTU M, WEIJDEGARD B, THOMAS P, THURIN-KJELLBERG A, BILLIG H, LARSSON D.G. (2009). Distribution and hormonal regulation of membrane progesterone receptors beta and gamma in ciliated epithelial cells of mouse and human fallopian tubes. *Mol. Reprod. Dev.*, **7**, 89-92.

- PELUSO J.J, PAPPALARDO A, LOSEL R, WEHLING M. (2006). Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's anti-apoptotic action. *Endocrinology*, **147**, 3133-3140.
- REYNAUD K, FONTBONNE A, MARSELOO N, VIARIS DE LESEGNO C, SAINTDIZIER M, CHASTANT-MAILLARD S. (2005). In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, **130**, 193-201.
- REYNAUD K, FONTBONNE A, MARSELOO N, VIARIS DE LESEGNO C, SAINTDIZIER M, CHASTANT-MAILLARD S. (2006). In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. *Theriogenology*, **66**, 1685-1693.
- REYNAUD K, VIARIS DE LESEGNO C, CHEBROUT M, THOUMIRE S, CHASTANT-MAILLARD S. (2009). Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the preovulatory period in the female dog. *Theriogenology*. **72**, 1120-1131.
- REYNAUD K, LABAS V, HARICHAUX T, THOUMIRE S, TAHIR M.Z, CHASTANT-MAILLARD S, SAINT-DIZIER M. (2011). Differential and quantitative analysis of dog oviductal fluid. *Reproduction, Fertility and Development*, **24**, 147-147.
- REYNAUD K, SAINT-DIZIER M, HAVARD T, TAHIER MZ, THOUMIRE S, CHASTANT-MAILLARD S. (2013). Administration of a progesterone antagonist (aglépristone) in beagle bitches induces cysts, alters meiosis resumption in oocytes and prevents fertilization. In: 7th Workshop on Mammalian Folliculogenesis and oogenesis, ESHRE Campus 2012, Stresa, Italie, 19-21 avril 2012.
- RIJSSELAERE T, VAN SOOM A, VAN CRUCHTEN S, CORYN M, GORTZ K, MAES D. (2006). Sperm distribution in the genital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation. *Reproduction*, **128**, 801-811.
- ROMERO-SANCHEZ M, PEIPER S.C, EVANS B, WANG Z, CATASUS L, RIBE A, PRAT J, GIRI JG. (2008). Expression profil of heptahelical putative membrane progesterone receptors in epithelial ovarian tumours. *Hum. Pathol.*, **39**, 1026-1033.
- SATO T, MURAKUMO Y, HAGIWARA S, JIJIWA M, SUZUKI, YATABE Y, TAKASHASHI M. (2007). High-level expression of CD109 is frequently detected in lung squamous cell carcinomas, *Pathol. Int.*, **57**, 719-724.
- SCHILSKY MI, ALA A, WALKER AP, ASHKAN K, DOOLEY JS. (2007) *Wilson's disease*, *lancet*. **369**, 397-408.
- SCHILSKY ML, R J STOCKERT RJ, POLLARD. (1992). Caeruloplasmin biosynthesis by the human uterus. *Biochem. J.* **28** : 657-661.
- SIDHU KS, MATE KE, RODGER JC. (1998). Sperm-oviduct Epithelial Cell Monolayer Co-culture: An in Vitro Model of Sperm-female Tract Interactions in a Marsupial, the Tammar Wallaby (*Macropus Eugenii*). *J. Reprod. Fert.*, **114**, 55-61.

- STEINHAEUER N, BOOS A, GUNZEL-APPEL AR. (2004). Morphological changes and proliferative activity in the oviductal epithelium during hormonally defined stages of the oestrous cycle in the bitch. *Reprod. Domest. Anim.*, **39**, 110-119.
- STRUNKER T, GOODWIN N, BRENDKER C, KASHIKAR N, WEYAND I, SEIFERT R, KAUPP B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> influx in human sperm. *Nature*, **471**, 382–386.
- SUAREZ S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Dev. Biol.*, **52**, 455-462.
- SUAREZ S, PACEY A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update*, **12**, 23-37.
- SUAREZ S, SUSAN S. (2008). Regulation of Sperm Storage and Movement in the Mammalian Oviduct. *Int. J. Dev. Biol.*, **52**, 455–462.
- TAHIR MZ, REYNAUD K, THOUMIRE S, CHASTANT-MAILLARD S, SAINT-DIZIER M. (2012). Expression of oviductin mRNA in the canine oviduct during the periovulatory period. *Reprod. Dom. Anim.*, **47** : 487.
- TAHIR MZ, REYNAUD K, GRIMARD B, THOUMIRE S, CHASTANT-MAILLARD S, SAINT-DIZIER M. (2013). Expression of nuclear and membrane progesterone receptors in the canine oviduct during the periovulatory period. *Reprod. Fertil. Dev.*, **25**, 1065-1076.
- THOMAS P. (2008). Characteristics of membrane progesterin receptor  $\alpha$  (mPR $\alpha$ ) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Neuroendocrinology*, **29**, 292-312.
- TSUTSUI T. (1989). Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fertil.*, **39**, 269-275.
- ULBRICH SE, KETTLER A, EINSPANIER R. (2003). Expression and localization of oestrogen receptor  $\alpha$ , oestrogen receptor  $\beta$  and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **84**, 279-289.
- ULBRICH SE, ZITTA K, HIENDLEDER S, WOLF E. (2010). In Vitro Systems for Intercepting Early Embryo-maternal Cross-talk in the Bovine Oviduct. *Theriogenology*, **73**, 802–816.
- VERMEIRSCH H, VAN DES BROECK W, SIMOENS P. (2002). Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in canine vaginal and vulvar tissue and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reprod. Fertil. Dev.*, **14**, 251-258.
- WESSEL T, SCHUCHTER U, WALT H. (2004). Ciliary motility in bovine oviducts for sensing rapid non-genomic reactions upon exposure to progesterone. *Horm. Metab. Res.*, **36**, 136-141.
- YANG F, NAYLOR SL, LUM JB. (1986). Characterization, mapping and expression of the human céruloplasmine gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 3257–3261.

ZHANG H, KIM JK, EDWARDS CA, XU Z, TAICHMAN R, WANG CY. (2005). Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat. Cell. Biol.*, **7**, 909-915.

ZHANG JM, HASHIMOTO M, KAWAI K, MURAKUMO Y, SATO T, ICHIHARA S, NAKAMURA S, TAKAHASHI M. (2004). CD109 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix, *Pathol. Int.*, **55**, 165–169.

ZHU Y, BON J, THOMAS P. (2003). Identification, classification and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 2237-224.

ZUMOFFEN CM, GIL R, CAILLE AM, MORENTE C, MUNUCE MJ, GHERSEVICH SA. (2013). A protein isolated from human oviductal tissue *in vitro* secretion, identified as human lactoferrin, interacts with spermatozoa and oocytes and modulates gamete interaction. *Hum. Reprod.*, **28**, 1297-1308.

ZWAIN I, AMATO P. (2000). Clusterin protects granulosa cells from apoptotic cell death during follicular atresia. *Exp Cell Res.* **257**,101-10.

Rapport-Gratuit.com

# **EFFET D'UN ANTAGONISTE DE LA PROGESTÉRONNE SUR L'EXPRESSION DE QUATRE PROTÉINES D'INTÉRÊTS DANS L'OVIDUCTE EN PÉRIODE PÉRI-OVULATOIRE CHEZ LA CHIENNE**

**Laure Vialle**

## **Résumé**

La physiologie de la reproduction chez la chienne présente certaines particularités par rapport aux autres mammifères. Les ovocytes sont ovulés à un stade immature (vésicule germinative) et n'atteignent le stade métaphase II dans l'oviducte que deux à trois jours après l'ovulation. Une lutéinisation et des concentrations très élevées de progestérone sont observées pendant la phase préovulatoire. L'importance de la progestérone pour la maturation ovocytaire et la fécondation a été mise en évidence par l'injection d'un antagoniste des récepteurs nucléaires de la progestérone. Cette injection induit un important retard de reprise de méiose ovocytaire et un blocage du transit des spermatozoïdes. Une analyse protéomique du fluide oviductal en période péri-ovulatoire a permis de mettre en évidence un rôle de la progestérone dans la régulation de l'expression des protéines du fluide oviductal.

L'objectif de notre étude était de caractériser l'effet de la progestérone sur les niveaux d'expression de quatre protéines oviductales (céruloplasmine, clusterine, lactoferrine et CD 109) et de localiser les lieux de synthèse de ces protéines en période péri-ovulatoire chez la chienne. Les fluides oviductaux issus de 8 chiennes ovariectomisées ont été analysés 4 jours après l'ovulation. Les chiennes étaient divisées en deux lots : 1 lot témoin (n = 4) et 1 lot traité par l'aglépristone en période péri-ovulatoire (n = 4). L'expression des quatre protéines d'intérêts a été analysée par la technique du western-blot. La localisation des protéines a été analysée par immunohistochimie. Les premiers résultats montrent une expression des protéines chez les deux lots d'animaux. Les protéines étaient localisées dans l'ampoule et dans l'isthme. Nous avons observé que la CD109 et la clusterine étaient localisées dans les cellules sécrétrices de l'épithélium tubaire tandis que la céruloplasmine était localisée sur les cellules ciliées uniquement. Cependant, certains anticorps testés ne semblent pas croiser chez le chien. Des recherches sont encore nécessaires afin de mieux caractériser les effets de la progestérone sur l'expression des protéines oviductales chez la chienne en période péri-ovulatoire.

**Mots clés :** OVIDUCTE / PROGESTÉRONNE / AGLÉPRISTONE / ÉTUDE EXPERIMENTALE / CD 109 ANTIGÈNE / CERULOPLASMINE / CLUSTERINE / LACTOFERRINE / CARNIVORE / CHIENNE.

## **Jury :**

Président : Pr.

Directeur : Mme. Bénédicte GRIMARD

Co-directeur : Mme. Karine REYNAUD

Assesseur : Mr. Laurent TIRET

# **THE EFFECT OF A PROGESTERONE ANTAGONIST ON THE EXPRESSION OF FOUR PROTEINS OF INTEREST IN THE OVIDUCT DURING PERIOVULATORY PERIOD IN BITCHES**

**Laure Vialle**

## **Summary**

The reproductive physiology of female dogs differs from that of other mammals, particularly regarding oocyte maturation. Indeed, in bitches, immature oocytes (germinal vesicles) are released and become metaphase II oocytes in the oviduct, two to three days after ovulation. Furthermore, the endocrine environment is unique: as a result of pre-ovulatory luteinisation, high progesterone concentrations are found during the ovulatory phase. The role of progesterone in oocyte maturation and fertilization (intra-oviduct events) has been demonstrated by injection of progesterone nuclear receptor antagonists. These injections lead to a significant delay in meiosis and to a restriction in the flow of spermatozoa.

This study was designed to characterize the effect of progesterone on the expression levels of four oviductal proteins (ceruloplasmine, clusterine, lactoferrine and CD 109 antigen) and to locate the sites of synthesis of these proteins in the periovulatory period. Oviductal fluids from female dogs were analyzed four days after ovulation. The dogs were split into two groups: a group (n = 4) treated with aglépristone during the periovulatory period and a control group (n = 4) left untreated. The expression of the four proteins was analyzed by the western-blot technique. The localization of the proteins was determined by immunohistochemistry. Preliminary results show a protein expression in both groups. We observed that CD109 and clusterin were localized in the secretory cells of the tubal epithelium, while ceruloplasmin was found in ciliated cells only. However, it may be that some tested antibodies do not cross in dogs. Oviductal proteins characterization in bitches warrants further investigation.

**Keywords** : OVIDUCT / PROGESTERON / AGLEPRISTONE / EXPERIMENTAL STUDY / CD 109 ANTIGEN / CERULOPLASMINE / CLUSTERINE / LACTOFERRINE / CARNIVORE / BITCH.

## **Jury :**

Président : Pr.

Director : Mme. Bénédicte GRIMARD

Codirector : Mme. Karine REYNAUD

Assessor : Mr. Laurent TIRET

