

Table des matières

Table des matières	1
Liste des abréviations	3
Introduction	5
Etude bibliographique : la maturation ovocytaire	7
A – La maturation nucléaire	9
1 – Rupture de la vésicule germinative	11
2 – Condensation des chromosomes	11
3 – Blocage en métaphase II	12
B – La maturation cytoplasmique de l’ovocyte	12
1 – Aspects morphologiques	12
2 – Aspects moléculaires	13
C – L’expansion du cumulus	14
D – Régulation de la méiose	14
1 – Inhibition de la reprise avant l’ovulation	14
a – Les projections transzonales	14
b – Les jonctions communicantes	15
c – Les molécules échangées via ces jonctions communicantes	17
• L’OMI	17
• L’AMPc	18
2 – Acquisition progressive de l’aptitude à reprendre la méiose	18
3 – Mécanismes de reprise de la méiose	19
a - La disparition des jonctions communicantes	19
b - L’hormone lutéinisante et l’AMPc	19
c - Les molécules-clé de la reprise de la méiose : Meiosis Promoting Factor et Mitogen-Activated Protein kinases	20
• MPF	20
• MAPkinases	25
• Kinases et AMPc	25
4 – Blocage au stade métaphase II	27
E - Particularités de la méiose ovocytaire chez la chienne	27
1 – Un modèle endocrinien singulier	27
2 – L’ovulation d’un ovocyte bloqué en prophase I	28
3 – Des conditions de maturation ovocytaire difficiles	29
4 – Des conditions de fécondation particulières	32

Etude expérimentale : effet de la modulation du niveau d'AMPc sur la reprise de la méiose ovocytaire chez la chienne	33
A – Matériels et méthodes	35
1 – Collecte des ovaires de chienne	35
2 – Milieux de dissection et de maturation	36
a – Le milieu de dissection	36
b – Les milieux de maturations : les traitements visant à moduler le rôle de l'AMPc	36
3 – Dissection et la sélection des ovocytes	37
4 – Fixation et coloration des ovocytes mis en culture	39
a – Fixation	40
b – Coloration	40
5 – Observation des ovocytes au microscope confocal	42
6 – Détermination du stade de maturation des ovocytes	44
B – Résultats	45
1 – Effectifs - difficultés de manipulation	45
2 – Images de méiose ovocytaire canine obtenues	47
3 – Effets des traitements sur la reprise de méiose	51
Discussion	55
Conclusion	61
Bibliographie	63
Annexes	71
Composition du PBS	73
Composition du milieu de base M199	75
Caractéristiques physiques, chimiques et biologiques du RpAMPc	77
Caractéristiques physiques, chimiques et biologiques du dbAMPc	79
Caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de la forskoline	81
Tableau récapitulatif des âges des chiennes, du type d'intervention chirurgicale réalisée sur chaque chienne et de la répartition des ovocytes pour la mise en culture	83
Feuilles utilisées lors de l'observation microscopique des ovocytes afin de noter les stades d'observation des ovocytes	85

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
AMH : hormone anti Müllerienne
AMPc : adénosine mono phosphate cyclique
ARN : acide ribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
BSA : sérum albumine de bœuf
CSF : cyostatic factor
Cx : connexines
dbAMPc : dibutyryl adénosine mono phosphate cyclique
DIV : développement *in vitro*
FIV : fécondation *in vitro*
GSH : glutathion
GV : vésicule germinative
GVBD : rupture de la vésicule germinative
LH : hormone lutéinisante
MAP kinases : mitogen-activated protein kinases
MI : métaphase I
MII : métaphase II
MIV : maturation *in vitro*
MPF : facteur promoteur de la méiose
MTOC : centre organisateur des microtubules
OMI : inhibiteur de la méiose ovocytaire
PBS : phosphate buffered saline
PKA : protéine kinase AMPc dépendante
PKC : protéine kinase calcium dépendante
RpAMPc : sel de Rp-adénosine 3', 5'-cyclic mono- phosphorothioateate triethylammonium
SVF : sérum de veau fœtal
TGF- β : transforming growth factor β

Introduction

La France compte actuellement 8,7 millions de chiens, trente-cinq mille éleveurs et pas moins de neuf cent mille chiots naissent chaque année dont cent cinquante mille sont inscrits aux Livre des Origines Françaises. Pourtant, l'espèce canine est certainement l'espèce domestique la plus en retard en matière de techniques de reproduction assistée. L'insémination artificielle en sperme congelé représente en effet, l'état le plus avancé des biotechnologies disponibles. Ce retard s'explique par des obstacles physiologiques, par la rareté du matériel biologique nécessaire aux expériences et par le très faible nombre d'équipes travaillant sur la reproduction assistée canine dans le monde.

Dans l'espèce canine, cela fait seulement une dizaine d'années que la recherche fondamentale en biologie du développement a émergé alors que l'application pour les éleveurs des techniques de reproduction assistée représenterait un atout considérable ; les techniques de détection des chaleurs et de l'ovulation, de détermination du moment de l'insémination artificielle, et du stade ovocytaire apte à la fécondation, ainsi que la production d'embryons *in vitro* sont indispensables pour maîtriser la reproduction dans l'espèce canine et les espèces apparentées et pourquoi pas à long terme, permettre d'éviter la disparition d'espèces menacées telles que le loup, le renard ou le lycaon.

La production d'embryons *in vitro* en reproduction canine pourrait également permettre :

- l'augmentation du nombre de descendants par femelle génétiquement intéressante,
- une reproduction d'animaux infertiles en saillie ou en insémination,
- la recherche de tares génétiques (diagnostic préimplantatoire) : sur quelques cellules prélevées chez l'embryon, certaines anomalies de l'ADN peuvent être recherchées. Seuls les embryons indemnes de la tare seraient ensuite transférés dans l'utérus d'une femelle receveuse.
- la congélation d'embryons (stockage et échanges de patrimoines génétiques).

Cette production d'embryons *in vitro* nécessite trois phases successives : une phase de maturation *in vitro* (MIV), une phase de fécondation *in vitro* (FIV) et une phase de développement embryonnaire (DIV). Tandis que ces processus sont bien maîtrisés dans d'autres espèces (souris, vache, femme), chacune de ces étapes pose problème chez la chienne.

L'obtention d'un ovocyte mature pouvant être fécondé est un pré requis indispensable mais la maturation *in vitro* ne permet d'obtenir actuellement que 10% d'ovocytes fécondables, représentant donc une étape fortement limitante (Reynaud *et al.*, 2004).

La maturation ovocytaire comporte deux phases, la maturation nucléaire d'une part et la maturation cytoplasmique d'autre part, ces deux aspects contribuant ensemble à ce que l'ovocyte soit fécondable (sans polyspermie) et que l'embryon découlant de cette fécondation puisse évoluer normalement. Dans la plupart des espèces déjà étudiées, la maturation nucléaire s'effectue sans difficulté particulière contrairement à la maturation cytoplasmique. Dans le cas des chiennes, des difficultés sont rencontrées à la fois au cours de la maturation nucléaire et de la maturation cytoplasmique. Dans cette étude, nous nous intéresserons à l'amélioration de l'efficacité et du rendement de la maturation nucléaire.

La chienne représente ainsi un cas particulier pour le déroulement de la maturation nucléaire. En effet, l'ovocyte libéré au moment de l'ovulation est encore au stade prophase I (vésicule germinative ; Tsutsui, 1975), diploïde, au lieu d'être déjà passé au stade haploïde (métaphase II) comme chez les femelles des autres espèces de mammifères. La reprise de la méiose ovocytaire nécessitera quarante-huit à soixante heures dans l'oviducte (Tsutsui, 1975 ; Marseloo *et al.*, 2004). Les mécanismes inducteurs de cette maturation nucléaire, bien connus chez les espèces habituellement étudiées, mammifères ou non, sont complètement inconnus dans l'espèce canine.

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'importance d'un facteur connu pour jouer un rôle déterminant dans la maturation nucléaire de l'ovocyte des mammifères, l'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc).

Après avoir présenté les mécanismes généraux de régulation de la reprise de la méiose partagés par la plupart des mammifères, les quelques éléments connus chez la chienne seront exposés. Une seconde partie rendra compte des résultats de mon travail expérimental concernant le rôle de l'AMPc et l'importance des cellules de granulosa dans la reprise de la méiose ovocytaire des chiennes ainsi que dans la survie de l'ovocyte. En conclusion nous montrerons que l'absence des cellules de la granulosa ne provoque pas la dégénérescence des ovocytes, mais que ces cellules inhibent la reprise de la méiose. Cependant, l'AMPc ne jouerait pas un rôle central dans cette reprise, qui semblerait peut être plutôt contrôlée par une voie calcique.

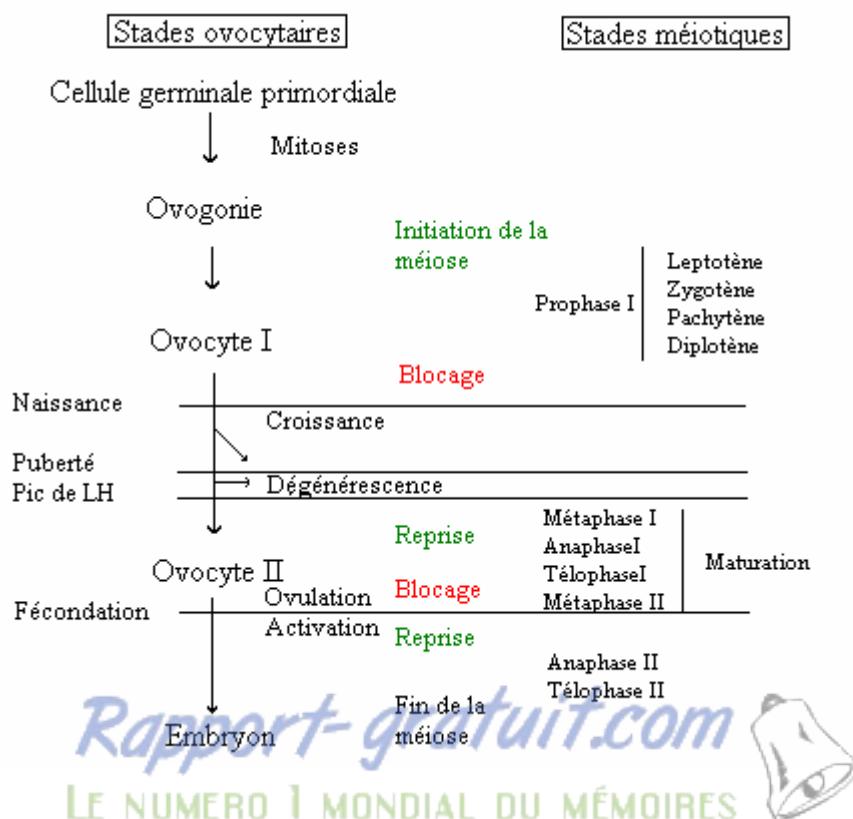
Etude bibliographique : la maturation ovocytaire

Etude bibliographique : la maturation ovocytaire

A - Maturation nucléaire

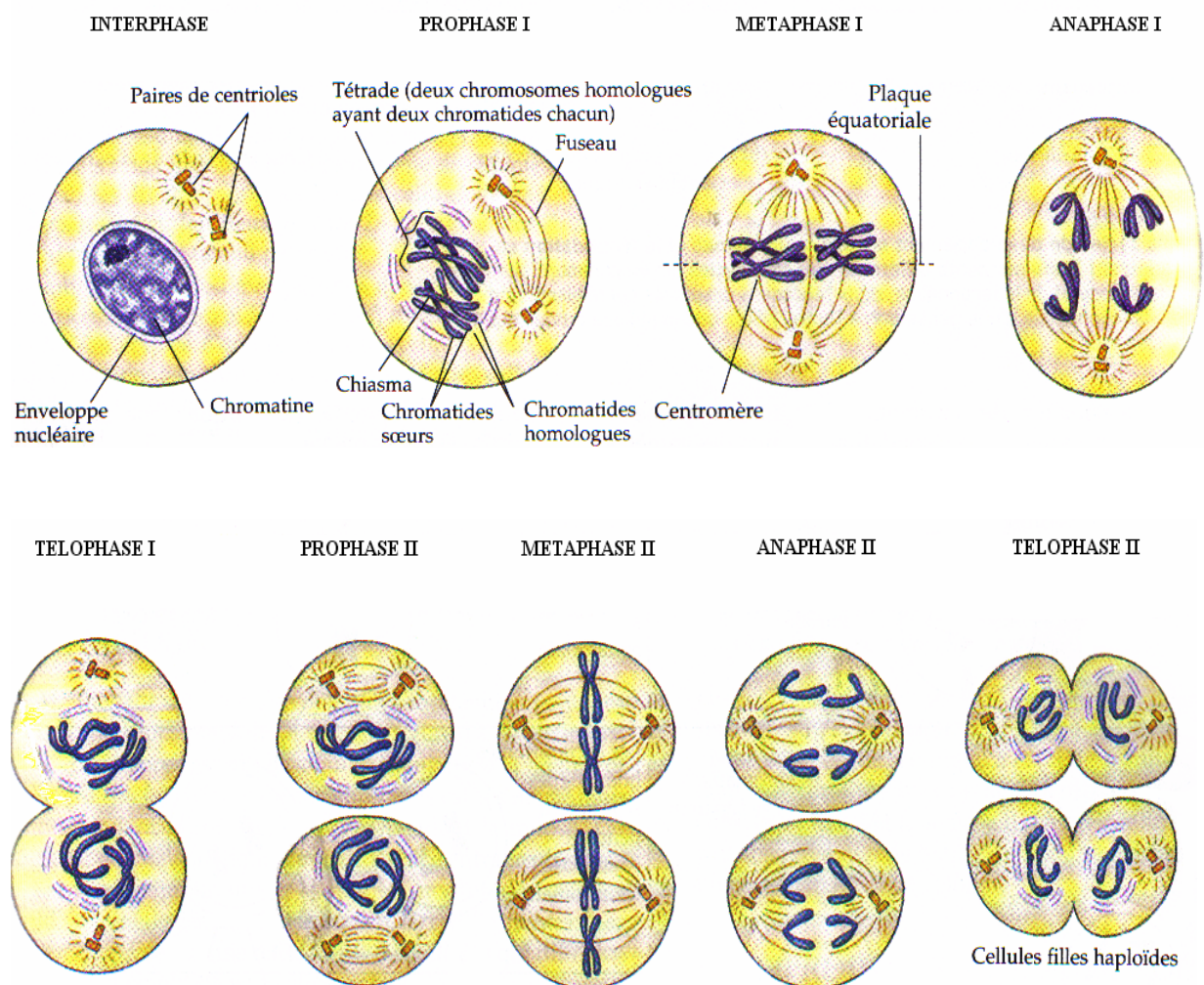
Suite à la décharge ovulatoire de l'hormone de lutéinisation (LH), le follicule mûr libère l'ovocyte. Il est bloqué en prophase de première division méiotique et appelé ovocyte I. De façon concomitante à l'ovulation, on observe une poursuite de la méiose qui amènera l'ovocyte I en métaphase de deuxième division méiotique (ovocyte II), le stade fécondable (Figure 1). L'ensemble des mécanismes qui contrôlent la transition du stade ovocyte I au stade ovocyte II définit la maturation ovocytaire. Cette maturation comprend des aspects nucléaires et cytoplasmiques. L'évolution nucléaire correspond au passage du matériel génétique depuis le stade dictyé (ou stade diplotène) de la prophase I jusqu'au stade métaphase II. En parallèle se déroule une maturation cytoplasmique avec synthèse et accumulation d'acides ribonucléiques (ARN), évolution des organites et migration de granules corticaux.

Figure 1 : Principales étapes de la vie de l'ovocyte, depuis la cellule germinale primordiale jusqu'à l'embryon (d'après Mermillod et Le Lannou, 1999). Les phases méiotiques et les arrêts/reprises du cycle cellulaire sont représentés. Avant et après la puberté, la plupart des ovocytes sont voués à la dégénérescence lors de l'atrésie folliculaire. La maturation n'a lieu qu'à la suite du pic ovulatoire de LH c'est-à-dire après la puberté, chez la femelle cyclique. La terminaison de la méiose nécessite l'activation de l'ovocyte par fécondation ou parthénogenèse.



Rappelons par ailleurs que la mitose et la méiose sont deux divisions cellulaires qui diffèrent l'une de l'autre. La première contribue au renouvellement cellulaire des cellules constitutives d'un organisme tandis que la deuxième intervient dans le cadre de la reproduction. Les mécanismes mis en œuvre dans les deux cas sont semblables mais les « produits finaux » sont différents : en effet, la mitose conduit à la formation de deux cellules filles génétiquement identiques entre elles et identiques à la cellule mère alors que la méiose aboutit à la formation de plusieurs cellules filles génétiquement différentes l'une de l'autre et de la cellule mère. De plus, ces cellules ne sont pas morphologiquement identiques et ne contiennent qu'un lot de chromosomes (matériel génétique à n chromosomes). Néanmoins les cycles cellulaires dans lesquels ces deux divisions sont intégrées sont très proches et ne diffèrent que par leur durée (plusieurs heures pour la mitose contre plusieurs années pour la méiose) et par la phase M de division. Cette phase comporte quatre temps lors des mitoses : prophase, métaphase, anaphase et télophase. Les méioses en comportent huit : prophase I, métaphase I, anaphase I, télophase I, prophase II très réduite, métaphase II, anaphase II et télophase II (Figure 2).

Figure 2 : Phases de la méiose (d'après Campbell, 1995). Les dessins ci-dessous illustrent la méiose d'une cellule animale dont le nombre diploïde est 4.

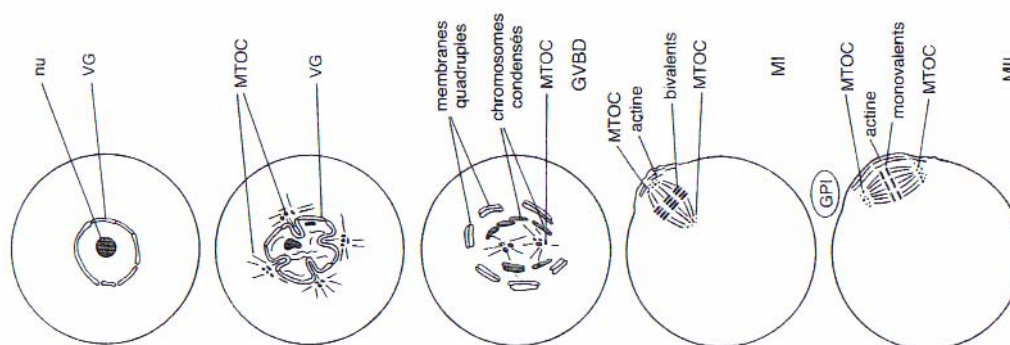


1 - Rupture de la vésicule germinative

Les ovocytes bloqués en prophase I de méiose dans le follicule préovulatoire sont caractérisés par leur noyau encore appelé vésicule germinative : l'enveloppe nucléaire est présente, l'ADN est décondensé et un à deux nucléoles peuvent être observés (Figure 3).

La rupture de la vésicule germinative (GVBD, Germinal Vesicle Breakdown) est le premier signe visible de reprise de méiose. Elle se produit dans les heures (environ trois heures chez la souris) qui suivent la mise en culture des ovocytes ou le signal ovulatoire de LH (Donahue, 1968). Elle commence par un plissement (plus ou moins important selon les espèces) de l'enveloppe nucléaire qui pourrait être en rapport avec le début de condensation des chromosomes. Les pores nucléaires disparaissent d'abord puis l'enveloppe se fragmente avant de disparaître rapidement (onze minutes après les premiers signes de désorganisation chez la souris). Il ne subsiste que des « saccules » à double paroi qui rejoignent le pool de réticulum endoplasmique et participeraient à la formation des pronoyaux, après la fécondation (Szollosi *et al.*, 1972). Le nucléole, devenu peu actif dès la fin de la croissance ovocytaire, disparaît rapidement au contact du cytoplasme. Seul le réseau de lamines A, B et C subsistera jusqu'à la métaphase I.

Figure 3 : Changements nucléaires et formation de la première division méiotique chez les rongeurs (d'après Mermillod et Le Lannou, 1999). VG : vésicule germinative ; GVBD : rupture de la vésicule germinative ; nu : nucléole ; MTOC : centre organisateur des microtubules ; MI : métaphase de première division méiotique ; MII : métaphase de deuxième division méiotique ; GPI : premier globule polaire.



2 - Condensation des chromosomes

La réplication ovocytaire de l'ADN (phase S du cycle cellulaire) a lieu après les divisions goniales (figure 1 et 2), juste avant l'entrée de l'ovocyte en prophase méiotique (stade préleptotène de la méiose). L'ovocyte I est donc une cellule diploïde ($2n=78$ pour le chien) ayant déjà accompli sa réplication d'ADN (phase G2) et possédant donc quatre compléments chromatiniens (4c), c'est-à-dire deux fois la quantité d'ADN d'une cellule en phase G1. Dès le début de l'ovogenèse, les chromosomes sont au stade bivalents (chromosomes appariés par paires d'homologues) et les chiasmes (recombinaisons par chevauchement ou crossing over) apparaissent dès le stade pachytène de cette prophase. Les chromosomes reprennent ensuite une morphologie diffuse au stade diplotène et la conserveront jusqu'à la reprise de méiose et aux premiers signes d'ondulation membranaires.

précédant la GVBD. A ce moment, les chiasmes se terminent et les chromosomes, associés à des fragments d'enveloppe nucléaire, connaissent une condensation croissante qui sera complète après environ trois heures. Les kinétochores (points d'accrochage des chromosomes aux microtubules) des chromosomes deviennent apparents et sont captés par les tubules en cours d'élongation depuis les centrosomes. Ces tubules s'organisent en deux pôles, formant le fuseau métaphasique. Notons que les transcriptions, déjà ralenties après la croissance ovocytaire, cessent complètement dès les premiers signes de condensation des chromosomes (Wassarman et Letourneau, 1976).

3 - Blocage en métaphase II

Les chromosomes quittent ensuite les fragments d'enveloppe nucléaire et s'arrangent en plaque métaphasique de la première division méiotique (métaphase I).

Chez la souris, la pré métaphase I (condensation des chromosomes et arrangement en plaque métaphasique) dure environ six heures et la métaphase I dure quatre heures. Cette durée importante est sans doute due au temps nécessaire à la synthèse et à l'assemblage du fuseau méiotique. Des anaphases et télophases sont visibles après dix à treize heures, en même temps qu'une boursoflure de la membrane qui deviendra le premier globule polaire. Ces deux phases sont rapides, les chromosomes homologues se séparent et migrent aux pôles du fuseau alors que le corps intermédiaire, une région riche en filaments et tubules participe à l'étranglement et finalement à l'expulsion du premier globule polaire. Après la télophase, la prophase II est également très rapide, les chromosomes s'arrangent rapidement sur la seconde plaque métaphasique alors que se forme le second fuseau méiotique, plus allongé que le premier.

L'expulsion du premier globule polaire et la formation du second fuseau méiotique sont les preuves que la maturation nucléaire ovocytaire est complète.

Une fois arrivé en métaphase II, l'ovocyte reste bloqué à ce stade jusqu'à son activation par le spermatozoïde lors de la fécondation (ou l'activation artificielle).

B - La maturation cytoplasmique de l'ovocyte

La maturation cytoplasmique regroupe l'ensemble des remaniements ovocytaires qui ont lieu au cours de la folliculogenèse et éventuellement de la maturation *in vitro*. Ces remaniements sont aussi bien moléculaires que morphologiques et ne sont, pour la plupart, connus que par leurs conséquences sur la capacité de l'ovocyte à être fécondé et à permettre le développement embryonnaire.

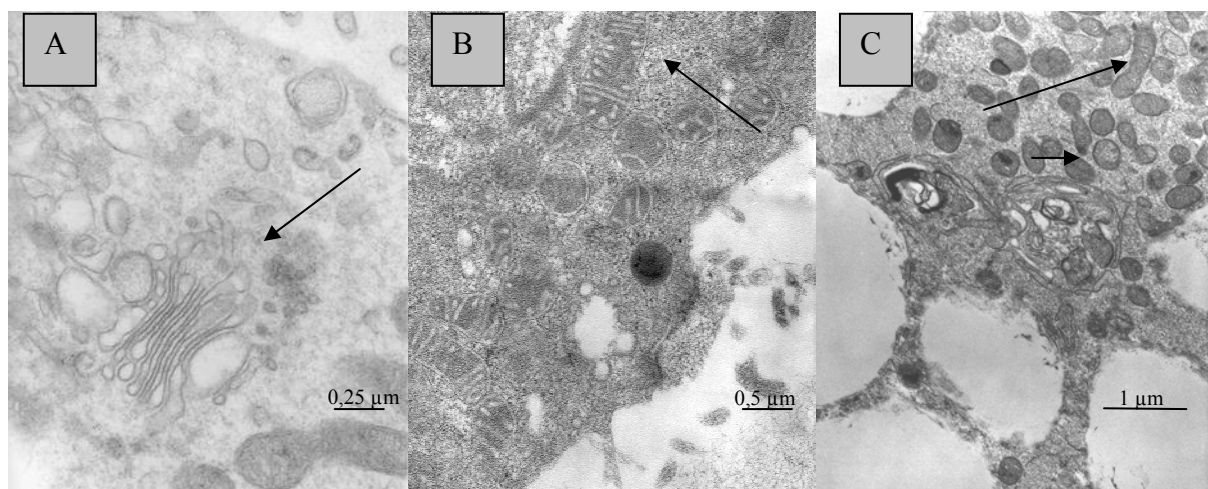
1 - Aspects morphologiques

La migration des granules corticaux est sans doute le trait le plus marquant de la maturation cytoplasmique. Elle a des conséquences importantes sur la fécondation et plus précisément concourt à éviter la polyspermie. Ces granules ont une localisation cytoplasmique sous-corticale diffuse dans l'ovocyte immature et, dès la reprise de méiose, commencent à migrer vers la zone corticale, s'associent au cytosquelette de cette zone (filaments d'actine) et y restent jusqu'à la fécondation. Leur contenu sera alors libéré dans l'espace périvitellin (espace compris entre l'ovocyte et la zone pellucide). Cette migration des granules, sous la dépendance des microtubules, s'accompagne d'un rassemblement des autres organites (mitochondries, appareil de Golgi) dans la zone périnucléaire (Figure 4).

Pendant la maturation, les microvillosités de la surface ovocytaire disparaissent dans la région surplombant le matériel nucléaire (Maro *et al.*, 1990 ; Gallicano *et al.*, 1994). La couche sous-corticale uniforme de filaments d'actine s'épaissit à cet endroit, ce qui pourrait aider à la stabilisation de ce réseau de filaments et donc au blocage de l'ovocyte en métaphase II. Cette région est également dépourvue de granules corticaux. La différenciation de la surface ovocytaire à l'aplomb du matériel nucléaire pourrait être importante dans la fécondation. En effet, nous pouvons observer que le spermatozoïde ne pénètre jamais dans cette région pauvre en protéines de surface, ce qui permettrait d'éviter l'expulsion de la tête du spermatozoïde en même temps que le second globule polaire ce qui conduirait à une impasse reproductive (Mermillod et Le Lannou, 1999). Les filaments d'actine interviennent également dans la constriction du pont cytoplasmique menant à l'expulsion des globules polaires. En plus de leur rôle dans la formation du fuseau méiotique, les microtubules interviennent aussi dans l'expulsion des globules polaires, avec les filaments d'actine.

De même, les mitochondries migrent durant la méiose : situées autour de la vésicule germinative au début de la méiose, elles se dispersent ensuite à l'occasion de l'émission du premier globule polaire.

Figure 4 : Organites cytoplasmiques présents au sein d'un ovocyte canin ayant mûri *in vitro* soixante-douze heures (microscopie électronique, Christine Viaris, photos personnelles). A : appareil de golgi ; B et C : mitochondries.



2 - Aspects moléculaires

Une des caractéristiques importantes de la maturation ovocytaire est la traduction de nombreux transcrits stockés à l'état quiescent dans l'ovocyte. Ceci entraîne des changements notables des profils de néosynthèses protéiques, évoluant tout au long de la maturation. Peu des protéines sont actuellement connues. Néanmoins, certaines protéines intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire méiotique, telle que la cycline B, en font partie. On considère qu'environ 60% des transcrits maternels présents dans l'ovocyte I sont détruits lors de la maturation (Huarte *et al.*, 1987 ; Strickland *et al.*, 1988).

Des changements métaboliques interviennent également au cours de la maturation et l'un d'eux a des conséquences importantes pour la fécondation, il s'agit de la synthèse de glutathion (GSH). Le niveau de GSH est très faible dans l'ovocyte immature, augmente pendant la maturation pour atteindre un maximum à la métaphase II puis chute à nouveau dans l'embryon précoce. Le GSH intervient dans la réduction des ponts disulfures lors de la

décondensation de la chromatine du spermatozoïde et le remplacement des protamines de l'ADN du spermatozoïde par des histones. Le GSH accumulé pendant la maturation serait à la fois originaire de l'ovocyte et du cumulus, ce qui constitue une explication possible de l'importance de la présence de cellules de cumulus pour la qualité de la maturation cytoplasmique.

C – L'expansion du cumulus

Les cellules du cumulus subissent elles aussi des transformations notables au cours de la maturation. La plus spectaculaire est l'expansion du cumulus. Cette expansion résulte de la dispersion des cellules suite à la production par ces cellules d'une matrice viscoélastique abondante s'accumulant dans les espaces intercellulaires. L'acide hyaluronique est le composant majeur de cette matrice, lui conférant sa viscosité. Cette matrice permet à l'ensemble cumulus-ovocyte de conserver son intégrité même après la rupture des complexes de jonction ovulatoire et permet donc aux cellules de cumulus de continuer à envoyer des facteurs diffusibles vers l'ovocyte en cours de maturation. De plus, ce cumulus expansé faciliterait la capture de l'ovocyte par le pavillon et favoriserait la fécondation (Chen *et al.*, 1993).

D - Régulation de la méiose

1 - Inhibition de la reprise avant l'ovulation

On sait depuis longtemps (Pincus et Enzmann, 1935) que si l'ovocyte est extrait de son contexte folliculaire et placé dans un milieu de culture, il reprend spontanément sa méiose, sans décharge de LH et bien avant que le follicule n'ait terminé sa croissance.

Cette inhibition folliculaire est maintenant bien admise même si les mécanismes moléculaires en sont encore mal connus. Elle repose sur les relations intrafolliculaires que l'ovocyte établit avec les cellules de granulosa qui l'entourent.

D'autre part, à long terme, un ovocyte dénudé va dégénérer et même si cet ovocyte est cultivé en présence d'un autre type cellulaire somatique (fibroblastes par exemple), il est incapable de reformer les communications nécessaires à son développement. Ceci montre bien que l'ovocyte est dépendant de la présence de cellules de granulosa pour se développer et maturer.

Enfin, la présence de cellules autour de l'ovocyte intervient également dans le contrôle du blocage méiotique : des ovocytes débarrassés de leurs cellules de cumulus, donc de leur environnement folliculaire, et placés en culture sont capables d'accomplir spontanément leur méiose jusqu'en métaphase II mais sont incapables d'être fécondés et de se développer normalement (Zhang *et al.*, 1995). Ceci indique que des facteurs provenant du fluide folliculaire et/ou des cellules de granulosa inhibent la maturation méiotique ovocytaire.

Il semble donc que la présence de cellules de cumulus soit importante pour la qualité de la maturation cytoplasmique (Salustri *et al.*, 1993 ; Cecconi et Colonna, 1996).

a - Les projections transzonales

Dans le follicule, les cellules de granulosa communiquent entre elles mais aussi avec l'ovocyte, bien qu'il existe entre la granulosa et l'ovocyte une "barrière" formée par la zone pellucide. La présence de cette zone pellucide n'est pourtant pas un obstacle aux échanges entre l'ovocyte et les cellules qui l'entourent. Pour communiquer, les cellules de granulosa

proches de l'ovocyte mettent en place des extensions cellulaires appelées projections transzonales. Ces projections cellulaires sont extrêmement nombreuses et forment un véritable réseau permettant des échanges considérables entre les cellules de granulosa et l'ovocyte. Leur cytosquelette est formé de microtubules, et les projections transzonales s'orientent vers l'ovocyte grâce aux jonctions d'attachement, c'est-à-dire aux desmosomes (connection des filaments intermédiaires) et aux jonctions adhérentes (connection des filaments d'actine).

Les communications entre l'ovocyte et ses cellules de granulosa évoluent en fonction de la maturation ovocytaire et folliculaire. Ainsi, aux stades précoces, les jonctions gap sont détectées dès la formation des follicules primordiaux. Dans les follicules primordiaux et secondaires, de très nombreuses microvillosités sont présentes et ces extensions des cellules du cumulus sont en contact avec les organelles ovocytaires (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique...) et pénètrent dans l'ooplasm, parfois jusqu'à proximité du noyau ovocytaire. Ensuite, dans le follicule préantral, les projections transzonales sont nombreuses et forment des jonctions adhérentes et gap, tandis que dans le follicule antral, les projections se rétractent peu à peu et forment moins de connections.

b - Les jonctions communicantes

A la zone de contact, entre l'ovocyte et les cellules de granulosa, au début du développement folliculaire (stade primordial et primaire), les échanges de molécules s'effectuent majoritairement via des vésicules sécrétoires, produites par l'ovocyte ou les cellules de granulosa, puis absorbées par endocytose. Ensuite dès que le follicule atteint le stade secondaire, les échanges continuent à se faire par exocytose/endocytose (avec libération de certains facteurs dans l'espace périvitellin ovocytaire), mais la communication s'effectue également activement par les jonctions communicantes (avec contact cellule-cellule).

Ces jonctions communicantes sont les jonctions gap (encore appelées "jonctions communicans" ou "nexus"). Ce sont des canaux membranaires entre les cellules. Elles permettent une communication intercellulaire directe et sont formées de connexons, hexamères de six sous-unités appelées connexines. La famille des connexines comporte au moins dix-sept protéines différentes, nommées selon leur poids moléculaire. Huit de ces connexines (Cx26, Cx30.3, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 et Cx57) ont déjà été mises en évidence dans les ovaires de nombreuses espèces. Néanmoins, toutes n'interviennent pas dans les jonctions ovocyte-granulosa. Certaines sont plutôt détectées dans les cellules de thèque ou de granulosa. Elles ne sont pas toutes toujours présentes dans les ovaires : ainsi, la Cx32 pourtant présente chez la souris au niveau des ovaires n'est pas détectable dans les ovaires chez la chienne alors qu'elle est exprimée dans le foie.

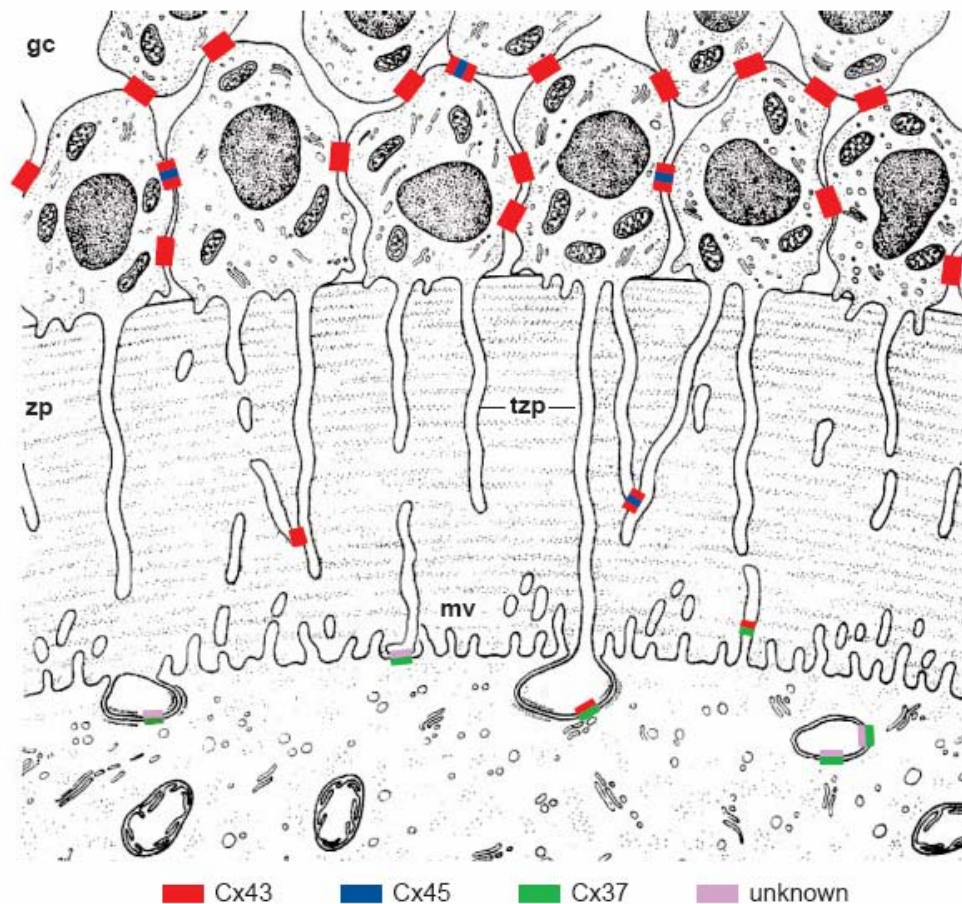
A l'interface ovocyte-cumulus, trois connexines (Cx37, Cx43 et Cx45) ont été mises en évidence jusqu'à présent (Figure 5). La connexine 37, produite par l'ovocyte, n'est présente que dans les jonctions gap à la surface de l'ovocyte. Cette connexine semble être particulièrement importante car le développement folliculaire et ovocytaire (donc la maturation nucléaire) est altéré dans les ovaires de souris invalidées pour le gène *Cx37*^{-/-} (homozygotique pour un allèle nul, *Cx37*^{-/-} ou souris knock-out *Cx37* ; Simon *et al.*, 1997) : les follicules sont normaux jusqu'au stade gros préantral, mais les follicules préovulatoires ne se développent jamais. Chez ceux-ci, il n'y a plus de connections ovocyte-cumulus, la croissance de l'ovocyte s'arrête, il n'y a pas d'ovulation et l'ovocyte ne peut reprendre sa méiose. La connexine 43, quant à elle, est présente au niveau des jonctions des projections transzonales et est également présente dans les cellules de granulosa (Wiesen et Midgley, 1994 ; Wright *et*

al., 2001 ; Kidder et Mhawi, 2002). Comme la connexine 37, la connexine 43 paraît primordiale car les souris mutées *Cx43*^{-/-} présentent des troubles de reproduction : le nombre de cellules germinales est très fortement réduit (-90%) et le développement folliculaire s'arrête précocement (pas de follicules antraux).

Ces nombreuses jonctions couplant l'ovocyte à ses cellules de granulosa en font donc un syncytium fonctionnel. L'existence des multiples projections transzonales traversant la zone pellucide et de ces nombreux types de contacts possibles entre l'ovocyte et les cellules qui l'entourent montre bien que l'ovocyte n'est pas "séquestré" dans une zone pellucide imperméable.

Figure 5 : Modèle proposé pour l'agencement des différentes connexines mises en évidence dans les complexes cumulo-ovocytaires murins. La Cx37 semble être la seule exprimée par l'ovocyte. La connexine la plus importante du cumulus est la Cx43 qui participe d'une part à des jonctions gap ovocyte-cumulus et d'autre part entre cellules de granulosa directement ou par l'intermédiaire des projections transzonales. La Cx45 est minoritaire et n'est jamais retrouvée au niveau de la membrane ovocytaire. D'autres connexines sont exprimées dans les complexes cumulo-ovocytaires mais leur localisation n'a pas été déterminée au niveau ultrastructural (d'après Kidder et Mhawi, 2002).

gc : cellules de granulosa ; zp : zone pellucide ; tzp : projections transzonales ; mv : microvillosités.



c - Les molécules échangées via ces jonctions communicantes

Ces projections ont plusieurs fonctions telles que le transfert de substances permettant la formation de la zone pellucide, l'échange de nutriments, de facteurs de croissance, mais également l'évacuation des catabolites venant de la zone pellucide ou de l'ovocyte.

Les deux types cellulaires ovocyte/granulosa sont couplés chimiquement, électriquement, partagent la majorité de leurs ions inorganiques et se transfèrent des molécules de faible poids moléculaire (1 000 Da). Une coopération métabolique se met en place, notamment concernant l'absorption de certains acides aminés, pour lesquels l'ovocyte a besoin des cellules de granulosa. D'autres composés peuvent également être échangés tels que des petits métabolites (ions, pyruvate, vitamines, nucléotides (ATP), purines (AMPc), Ca^{2+} ...), des petites molécules hydrosolubles, des sels minéraux et des protéines (facteurs de croissance...).

Le transfert de certaines molécules des cellules de granulosa à l'ovocyte pourrait donc contrôler la méiose ovocytaire et parmi ces facteurs inhibiteurs d'origine somatique, on peut citer l'OMI et l'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc).

• L'OMI

Le follicule produirait une ou plusieurs substances appelées "Oocyte Meiotic Inhibitor" ou OMI dont la nature reste incertaine bien que quelques candidats soient suspectés. L'OMI doit probablement transiter par le fluide folliculaire puisque celui-ci exerce une activité OMI transitoire *in vitro*. Plusieurs peptides à activité OMI ont été partiellement purifiés de fluide folliculaire de différentes espèces et plusieurs facteurs de croissance ou hormones ont été proposés comme candidats OMI (TGF- β , AMH, activine, inhibine, follistatine) mais à ce jour aucune certitude n'est possible quant à la nature chimique de l'OMI. Des bases puriques (hypoxanthine, adénosine), présentes dans le fluide folliculaire de plusieurs espèces pourraient jouer ce rôle d'OMI. Toutefois, le niveau de ces bases dans le fluide folliculaire ne change pas suite à la décharge gonadotrope ovulante et d'autre part, ces bases sont absentes du fluide folliculaire de certaines espèces (bovins) ayant par ailleurs une activité OMI. Ces bases agissent en maintenant un taux élevé d'AMPc intraovocytaire par inhibition de la phosphodiesterase (Downs *et al.*, 1989).

Depuis les expériences de Foote et Thibault en 1969, montrant le blocage méiotique d'ovocytes de vache ou de truie cultivés dans des follicules entiers ou dans des hémisections folliculaires, il était généralement admis que la paroi folliculaire était à l'origine du signal d'inhibition méiotique. On admettait également que l'OMI était originaire de la granulosa et transitait par le cumulus où il subissait une transformation activatrice avant d'être transmis à l'ovocyte. Cependant, des expériences récentes montrent que la thèque interne pourrait également intervenir dans la production d'OMI. En effet, il a été montré en utilisant des co-cultures d'ovocytes et de fragments de paroi folliculaire (Richard et Sirard, 1993) ou d'ovocytes et de primocultures de thèque et de granulosa (Kotsuji *et al.*, 1994) que la thèque et la granulosa coopèrent pour maintenir l'ovocyte au stade de vésicule germinative. Les meilleurs résultats de blocage méiotique *in vitro* sont en effet obtenus lorsque les deux types cellulaires sont présents. Le signal inhibiteur (OMI) pourrait donc être originaire de la thèque et, selon l'environnement gonadotrope, être ou non modifié et/ou transmis à l'ovocyte par la granulosa via le cumulus et le fluide folliculaire. Lors de la décharge gonadotrope ovulante, ce signal inhibiteur ne serait plus transmis par la granulosa.

- **L'AMPc**

L'AMPc semble jouer un rôle important dans le blocage et la reprise de méiose de nombreuses espèces. Ainsi, chez les rongeurs, des molécules augmentant le niveau d'AMPc sont capables de prolonger le blocage méiotique *in vitro*. C'est le cas d'analogues stables de l'AMPc franchissant les membranes tel que le dibutyryl-AMPc (dbAMPc) ou le 8-bromo AMPc, d'agents activateurs de l'adénylate cyclase (forskoline) ou encore d'inhibiteurs de la phosphodiesterase (isobutyl-méthyl xanthine ou IBMX, hypoxanthine). Cependant, ce rôle de l'AMPc ne semble pas aussi important dans les espèces autres que les rongeurs. En effet, il a été montré chez les bovins (Sirard, 1990) que les drogues agissant en élevant le taux d'AMPc intracellulaire n'ont qu'un effet transitoire sur le maintien du blocage méiotique. Les mécanismes régulateurs du blocage méiotique de l'ovocyte pourraient donc varier selon les espèces, ce qui pourrait également constituer une des difficultés d'identification de l'OMI.

2 - Acquisition progressive de l'aptitude à reprendre la méiose

La reprise de méiose n'est possible qu'à partir d'un certain stade de croissance ovocytaire et on parle alors de compétence méiotique. On admet généralement que l'ovocyte contenu dans le follicule à antrum est capable de reprendre sa méiose lorsqu'il a atteint 80% de sa taille définitive. Des études détaillées chez la chèvre (De Smedt *et al.*, 1994 ; Gall *et al.*, 1996) ont montré que cette compétence est acquise progressivement au cours de la folliculogénèse et de la croissance ovocytaire (Tableau 1). Les ovocytes deviennent d'abord capables d'accomplir la rupture de la vésicule germinative (follicules de 0,5 à 0,8 mm), puis de poursuivre la méiose seulement jusqu'en métaphase I (1 à 1,8 mm) et enfin en métaphase II (3 à 6 mm). La compétence ovocytaire à la fécondation et au développement embryonnaire (maturation cytoplasmique) s'acquière ultérieurement.

Le niveau de pré-meiosis promoting factor ou pré-MPF, intraovocytaire (c'est-à-dire la quantité de pré-MPF disponible au sein de l'ovocyte) pourrait constituer l'explication de l'acquisition progressive de la compétence méiotique par l'ovocyte en cours de folliculogénèse. En effet, il a été montré dans plusieurs espèces que le manque de compétence méiotique des ovocytes de petits follicules pourrait être dû à l'absence ou à la présence limitante de cycline B (Chesnel et Eppig, 1995 ; Hue *et al.*, 1997) ; cette cycline B étant une protéine interagissant avec la protéine intraovocytaire p34^{cdc2} pour constituer le pré-MPF.

Tableau 1 : Compétence méiotique de l'ovocyte de chèvre provenant de différentes classes de taille de follicules (d'après Gall *et al.*, 1996). GV : vésicule germinative ; GVBD : rupture de la vésicule germinative.

Taille follicule (mm)	Stade méiotique après 27 h de maturation	Ovocytes bloqués à ce stade (%)
< 0,5	GV	96
0,5-0,8	GVBD	76
1-1,8	métaphase I	90
> 3	métaphase II	96

3 - Mécanismes de reprise de la méiose

Les cellules de granulosa jouent également un rôle de stimulateur de la reprise de méiose. *In vivo*, la reprise de la méiose ovocytaire est induite au moment du pic de LH. A ce stade, dans le follicule préovulatoire, les récepteurs à LH sont présents dans les cellules de la thèque, mais également dans les cellules de la granulosa murales et dans certaines cellules du cumulus. Les cellules du cumulus pourraient ainsi participer à la reprise de méiose en produisant un signal d'induction (type pic de calcium), ou en réduisant les niveaux folliculaires d'un inhibiteur. En parallèle, les jonctions gap présentes entre l'ovocyte et les cellules du cumulus pourraient être bloquées/supprimées par la rétraction des projections transzonales (arrêt de la transmission d'un signal inhibiteur).

a - La disparition des jonctions communicantes

Suite au signal gonadotrope (décharge de LH) précédant l'ovulation, dans le follicule préovulatoire, ou lors de la mise en culture *in vitro* de complexes cumulus-ovocyte, on assiste à des modifications rapides des jonctions reliant les cellules du cumulus entre elles et à l'ovocyte : les projections commencent à se rétracter (par l'action du cytosquelette) et interrompre leur contact avec l'ovocyte. Ceci se traduit notamment par une disparition du marquage de la connexine 43 (protéine constitutive des jonctions perméables). La communication via les jonctions perméables entre l'ovocyte et les cellules avoisinantes diminue rapidement d'où un arrêt du passage de petites molécules entre le cumulus et l'ovocyte (Sutovsky *et al.*, 1993).

Ces observations conduisent à penser que la fermeture des jonctions communicantes entre ovocyte et cellules avoisinantes pourrait jouer un rôle dans la reprise de la méiose en stoppant le passage du signal inhibiteur. Cette hypothèse reste toutefois assez controversée (Mc Gaughey *et al.*, 1990). En effet, il semble que les premiers signes de reprise de la méiose soient visibles avant la disparition des communications entre ovocyte et cumulus. Cependant ces observations sont obtenues *in vitro*, sur des complexes cumulus-ovocyte en culture et un rôle de la fermeture des jonctions perméables dans la reprise de méiose *in vivo* n'est pas exclu.

b - L'hormone lutéinisante et l'AMPc

Les ovocytes bloqués en prophase I dans leurs follicules préovulatoires reprennent leur méiose à l'issue du pic de LH.

La LH agit sur l'expansion des cellules de cumulus en potentialisant l'action de la FSH présente dans le fluide folliculaire ; elle pourrait donc agir sur la reprise de la méiose par ce biais (fermeture des jonctions perméables et arrêt de transmission du signal inhibiteur). Toutefois, les mécanismes moléculaires permettant au signal LH d'induire la reprise de méiose sont encore mal élucidés. Des inhibiteurs de la protéine kinase A (AMPc dépendante) ou PKA peuvent induire la reprise de la méiose alors que des agents maintenant un taux élevé d'AMPc peuvent l'empêcher (Parrish *et al.*, 1992). Une diminution transitoire du niveau intra ovocytaire d'AMPc semble donc importante pour la reprise de la méiose. Cette diminution permet une inactivation de la PKA. Cependant, le récepteur de la LH agit essentiellement en activant l'adénylate cyclase synthétisant l'AMPc, donc en augmentant le niveau d'AMPc intracellulaire et on peut ainsi difficilement expliquer comment la LH peut induire la reprise de méiose.

Néanmoins, il a été montré que l'ovocyte et les cellules somatiques du follicule expriment des types différents de phosphodiesterases (Tsafiriri *et al.*, 1996) et également des types différents de sous-unités régulatrices de la PKA (Downs et Hunzicker-Dunn, 1995) pouvant être soumis à des mécanismes régulateurs différents. Ces observations font de l'ovocyte et du cumulus deux compartiments capables de réagir différemment au même stimulus. En utilisant des analogues de l'AMPc spécifiques de certaines isoformes de la PKA, Downs et Hunzicker-Dunn ont pu montrer que la stimulation de la PKA I (exprimée par l'ovocyte) inhibe la méiose alors que la stimulation de la PKA II (exprimée par le cumulus, en plus de la PKA I) induit l'expansion du cumulus et la GVBD.

De plus, la LH agit également sur les phosphoinositides par l'intermédiaire des phospholipases et mène à la formation de diacylglycérol et à la libération de calcium des stocks intracellulaires (Homa *et al.*, 1993 ; Homa, 1995). Cette seconde voie de transduction pourrait donc également intervenir dans la régulation de la reprise de méiose, avec intervention de protéines kinases calcium dépendantes (PKC). En effet, des oscillations calciques sont observées dans des ovocytes de souris reprenant la méiose (Carroll *et al.*, 1994) et la présence de calcium extracellulaire est nécessaire à l'activation de la reprise de méiose pour des ovocytes de rat dans leur follicule (Goren *et al.*, 1990). De plus, la néomycine, un inhibiteur de l'hydrolyse des phosphoinositides, bloque la reprise de méiose d'ovocytes bovins *in vitro* (Homa, 1991). De la même manière, le TMB-8, un agent bloquant du calcium intracellulaire, bloque la reprise de méiose spontanée de l'ovocyte de souris *in vitro* (Sato, 1992).

Luciano *et al.*, (2004) ont également rapporté récemment qu'une augmentation modérée du niveau intra ovocytaire d'AMPc assurerait une meilleure acquisition de la compétence ovocytaire chez les bovins. Cette amélioration serait corrélée à la présence de jonctions communicantes fonctionnelles entre l'ovocyte et les cellules du cumulus dès le début de la maturation ovocytaire *in vitro*.

L'importance respective de ces deux voies (PKA et PKC), les mécanismes précis et les interactions possibles sont encore mal définis. Une architecture hypothétique des signaux de blocage et de reprise de la méiose sera détaillée dans le chapitre suivant.

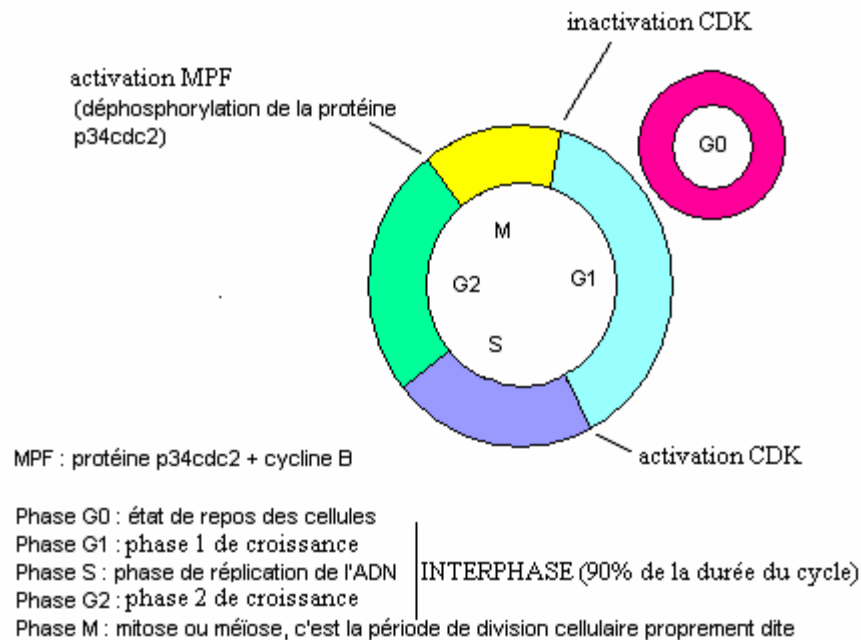
c - Les molécules-clé de la reprise de la méiose : Meiosis Promoting Factor et Mitogen-Activated Protein kinases ou MAPkinases

Deux kinases jouent un rôle majeur dans la reprise de la méiose ovocytaire chez les mammifères : le MPF et les MAPkinases, interagissant avec l'AMPc.

- **MPF**

Le mécanisme central de la reprise de la méiose est l'activation d'un facteur très ubiquitaire, associé à la transition G2/M de toute cellule eukaryote. Il s'agit du MPF ou M-phase promoting factor ou mitosis/meiosis promoting factor (Figure 6).

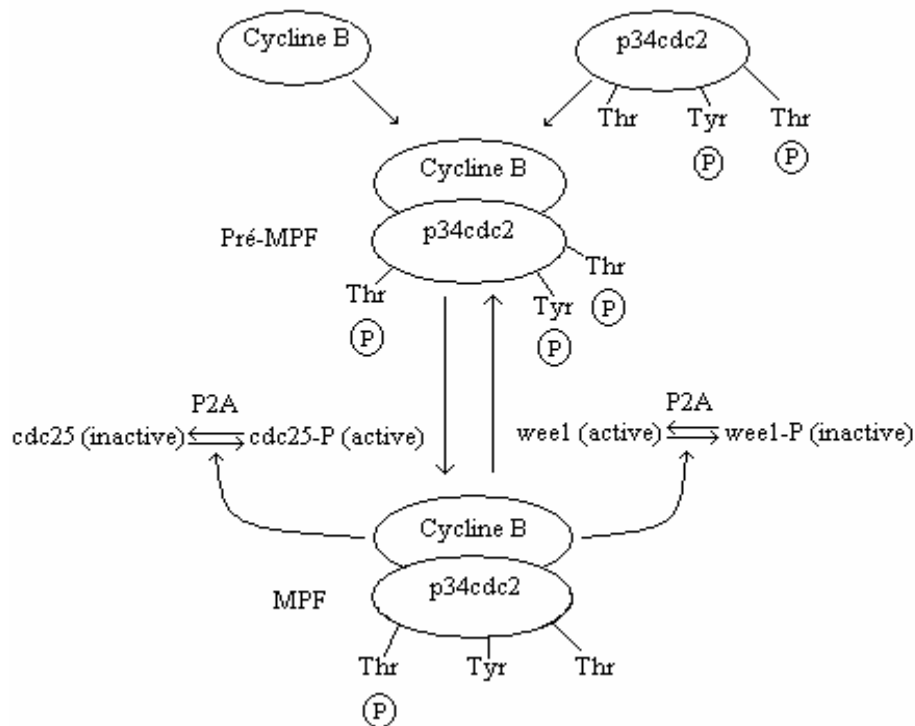
Figure 6 : Représentation schématique du cycle cellulaire. MPF : M-phase promoting factor ; CDK : cyclin-dependent-kinase.



La découverte du MPF remonte aux travaux de Masui et Markert en 1971 montrant que l'ovocyte de grenouille produisait un facteur induisant la reprise de la méiose. Ce MPF est un complexe de deux protéines : la protéine $p34^{cdc2}$, et une cycline B. La protéine $p34^{cdc2}$ est une sérine-thréonine kinase de 34 kDa, très conservée parmi les eukaryotes et ayant une forte affinité pour l'histone H1 comme substrat. La cycline B est une protéine de 45 kDa faisant partie de la famille des cyclines, protéines soumises à une séquence de synthèse et dégradation régulière au cours du cycle cellulaire et impliquées dans le passage entre les différentes phases du cycle.

L'activation du MPF, c'est-à-dire de l'activité kinase de la $p34^{cdc2}$ requiert deux événements : la formation du complexe $p34^{cdc2}$ -cycline B et la déphosphorylation de résidus tyrosines de la $p34^{cdc2}$. Le MPF actif est capable une fois activé d'augmenter son activité de manière autocatalytique (Figure 7).

Figure 7 : Mécanismes d'activation du MPF chez la souris (d'après Mermillod et Le Lannou, 1999). L'assemblage des deux sous-unités ($p34^{cdc2}$ et cycline B) mène à la formation du pré-MPF. Celui-ci est activé par déphosphorylation, sous la dépendance du produit du gène *cdc25* alors que la phosphorylation est contrôlée par le produit du gène *wee 1*. Une fois activé, le MPF peut autoamplifier son activité en agissant sur les niveaux de phosphorylation de *wee 1* et de *cdc25*. La phosphatase 2A (P2A) agit au contraire en inactivant le MPF.



L'activité MPF apparaît dès la GVBD (germinal vesicle break-down ou rupture de la vésicule germinative) et atteint un maximum vers la métaphase I (Figure 8 et 9). Elle chute lors de l'expulsion du premier globule polaire pour remonter à la métaphase II et rester stable jusqu'à la fécondation (Hashimoto et Kishimoto, 1988).

Figure 8 : Représentation schématique de la régulation moléculaire de la reprise de méiose (les interactions hypothétiques sont représentées par des flèches en pointillé ; d'après Mermillod et Le Lannou, 1999). Les voies de transduction de la PKA et de la PKC sont représentées. LH : luteinizing hormone ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; DAG : diacyl glycérol ; MAPK : mitosis activated protein kinase ; IP3 : inositol triphosphate ; MPF : M-phase promoting factor ; OMI : oocyte meiosis inhibitor ; PDE : phosphodiesterase ; PKA : protéine kinase AMPc dépendante ; PKC : protéine kinase calcium dépendante ; dbAMPc : dibutyryl AMPc (analogue structural de l'AMPc) ; Forskoline : activateur de l'adénylate cyclase ; RpAMPc : inhibiteur de la protéine kinase A ; GVBD : rupture de la vésicule germinative.

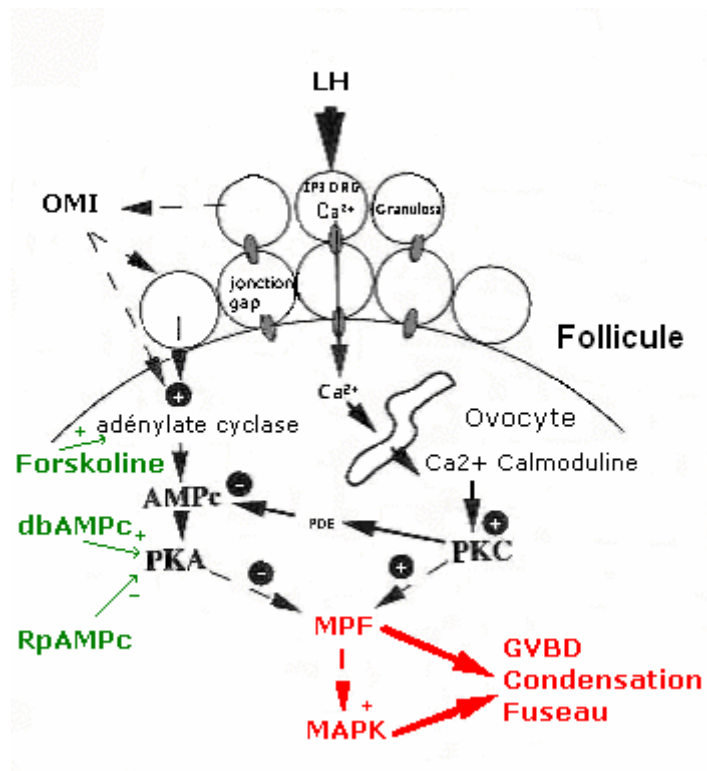
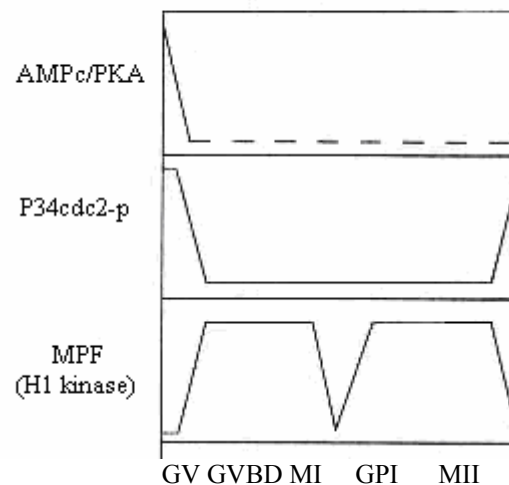


Figure 9 : Evolution de l'activité de la PKA, du taux de phosphorylation de la p34^{cdc2}, de l'activité H1 kinase du MPF et de l'activité MAP kinase au cours de maturation (d'après Mermillod et Le Lannou, 1999). Une chute (au moins transitoire) de l'AMPc entraîne l'inactivation de la PKA qui permet la déphosphorylation de la p34cdc2. Cette déphosphorylation de la p34cdc2 entraîne l'activation du MPF (activité H1 kinase). L'inactivation du MPF en fin de première méiose ne s'accompagne pas d'une rephosphorylation de la p34cdc2 mais d'une protéolyse des cyclines. La MAP kinase s'active en début de méiose et reste active jusqu'à la fécondation, prenant le relais du MPF en fin de méiose I. GV : vésicule germinative ; GVBD : rupture de la vésicule germinative ; MI, II : métaphase I, II ; GPI : expulsion du premier globule polaire.



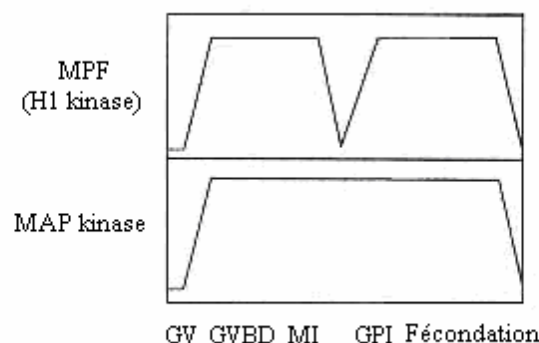
Les mécanismes d'activation du MPF sont différents selon les espèces et selon le stade méiotique. Ainsi, chez la souris, l'entrée en méiose (GVBD, condensation des chromosomes) ne nécessite pas de néosynthèses protéiques alors que le passage de métaphase I en métaphase II et l'expulsion du premier globule polaire sont inhibés par des inhibiteurs de synthèse protéique. Ceci indique que du pré-MPF (complexe p34^{cdc2} phosphorylée-cycline) est présent dans l'ovocyte immature et activé par déphosphorylation avant la GVBD. Chez la vache, la truie ou la brebis, par contre, des inhibiteurs de synthèse protéique inhibent l'entrée en méiose, indiquant que le niveau de pré-MPF n'est pas suffisant dans les ovocytes immatures de ces espèces et que la GVBD nécessite la synthèse préalable de cycline ou d'un autre élément régulateur situé en amont du MPF (Mermillod et Le Lannou, 1999).

La régulation de la phosphorylation du MPF est un élément important du contrôle de la reprise de méiose : le vanadate, un inhibiteur de tyrosine phosphatases, inhibe la reprise de méiose de l'ovocyte de souris et de rat (Goren et Dekel, 1994). Cependant, comme le montre la figure 5, le taux de p34^{cdc2} phosphorylée chute dès la reprise de méiose et ne change plus jusqu'à la fécondation alors que l'activité H1 kinase du MPF chute lors de la métaphase I et de l'expulsion du globule polaire. Cette chute d'activité ne serait donc pas sous le contrôle de mécanismes de phosphorylation mais peut-être due à la dégradation de la cycline, par un mécanisme ubiquitine-dépendant (Murray, 1995).

- **MAPkinases**

Normalement, la chute d'activité MPF en fin de mitose induit la sortie du cycle mitotique (décondensation des chromosomes, formation du noyau, désorganisation du fuseau) et l'entrée en interphase. Si ces phénomènes n'apparaissent pas lors de la chute d'activité MPF en fin de métaphase I de la méiose, c'est probablement grâce à l'activation d'une autre kinase, prenant le relais du MPF pour maintenir l'état de phosphorylation de ses substrats. Les protéines de la famille des Mitogen-Activated Protein kinases (MAP kinases ou MAPK) pourraient jouer ce rôle. Les MAP kinases ont un large spectre de substrats de phosphorylation (sérine-thréonine), dont certains en commun avec le MPF et ont la capacité d'activer des traductions et des transcriptions, d'influencer la dynamique des microtubules, des voies métaboliques et de transduction. Deux isoformes de MAP kinases (42 et 44 kDa) ont été détectées dans les ovocytes de plusieurs espèces et il a été montré que l'activité MAP kinase augmente dès la reprise de la méiose et se maintient pendant toute sa durée (Verlhac *et al.*, 1993). Les MAP kinases pourraient donc empêcher le retour en interphase lors de la chute d'activité MPF à la fin de la première méiose (Figure 10). Les MAP kinases pourraient également intervenir dans la mise en place du fuseau de métaphase I, celle-ci correspondant mieux (chronologiquement) avec l'activation des MAP kinases qu'avec celle du MPF (Dedieu *et al.*, 1996 ; Zernicka-Goetz *et al.*, 1997).

Figure 10 : Evolution de l'activité du MPF et des MAPkinases au cours de la maturation (d'après Mermillod et Le Lannou, 1999).



Un point commun à l'activation de ces protéines régulatrices ayant toutes des activités kinases est la cascade de phosphorylations qui en découle. Ces phosphorylations sont les réels effecteurs de la reprise de méiose et leur inhibition par la 6-diméthyl aminopurine (6-DAMP) inhibe la reprise de méiose spontanée dans plusieurs espèces et notamment chez les bovins (Lonergan *et al.*, 1997). Le lien entre ces phosphorylations et la reprise de méiose proprement dite n'est pas clairement établi mais elles interviennent sans doute dans la condensation des chromosomes (phosphorylation des histones), la GVBD, la formation du fuseau et les modifications transcriptionnelles et traductionnelles observées à ces stades.

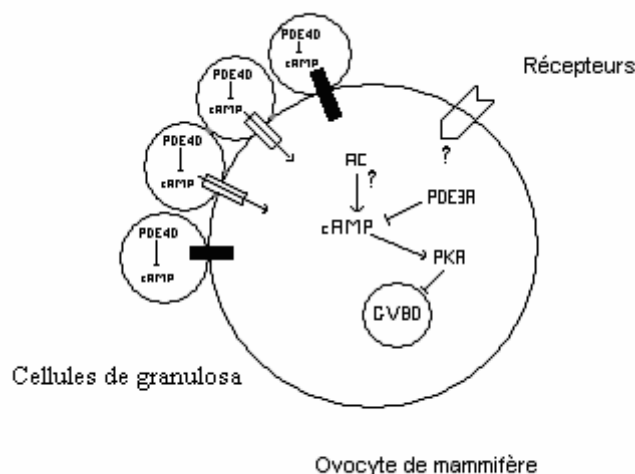
- **Kinases et AMPc**

Les liens entre les signaux de reprise de méiose et l'activation du MPF ne sont pas encore entièrement élucidés. Toutefois, un taux élevé d'AMPc, et donc une forte activité de la protéine kinase A (PKA) inhibe la déphosphorylation de la p34^{cdc2} du pré-MPF. C'est de cette

façon qu'une chute transitoire du niveau d'AMPc pourrait permettre l'activation du MPF et donc la reprise de méiose (Figure 8 et 11). Ceci est d'ailleurs confirmé par des expériences de fusion d'ovocytes de xénope et de souris (Sorensen *et al.*, 1985). Des ovocytes de xénope reprennent leur maturation lorsqu'ils sont fusionnés avec des ovocytes de souris en cours de maturation mais pas lorsque ces ovocytes de souris sont bloqués par le dibutyryl-AMPc. Par contre, lorsque des ovocytes de souris en métaphase II sont fusionnés à des ovocytes de souris bloqués au dibutyryl-AMPc, ces derniers reprennent leur méiose, ce qui montre qu'une fois activé, le MPF devient indépendant de la régulation par l'AMPc (Sorensen *et al.*, 1985).

C'est la déphosphorylation de la $p34^{cdc2}$ qui serait sous le contrôle de l'AMPc. En effet, cette déphosphorylation, concomitante à la reprise de méiose chez la souris, est inhibée par l'IBMX (inhibiteur de la phosphodiesterase, donc augmentant les niveaux d'AMPc). Mais il existe probablement des étapes intermédiaires entre la chute d'AMPc et l'activation du MPF. et l'AMPc agit probablement par l'intermédiaire de la PKA puisque des inhibiteurs de cette kinase peuvent induire la reprise de méiose d'ovocytes bloqués par l'IBMX.

Figure 11 : Régulation de l'AMPc et arrêt de la méiose (d'après Conti *et al.*, 2002). La provenance de l'AMPc observé au sein des ovocytes reste incertaine : néosynthèse impliquant l'adénylate cyclase ou transit depuis les cellules de granulosa via les jonctions communicantes ? Cette molécule en stimulant la PKA agirait en inhibant la reprise de méiose. Par ailleurs la dégradation de l'AMPc par les PDE fait appel à des types différents selon la cellule impliquée. AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; GVBD : rupture de la vésicule germinative ; PDE : phosphodiesterase ; PKA : protéine kinase AMPc dépendante.



Dans l'espèce canine, on sait maintenant (Saint-Dizier *et al.*, 2004) que dans les ovocytes bloqués en vésicule germinative et en GVBD, une faible activité des kinases est détectée alors que celle-ci est plus importante au cours des métaphases I et II. En conclusion, malgré les particularités des chiennes notamment dans le domaine de la reprise méiotique, l'activité des kinases suit le même modèle que chez les autres mammifères.

Finalement, une diminution du taux d'AMPc (par diminution de sa synthèse ou par augmentation de son taux de dégradation par les phosphodiesterases) conduit à la reprise de la méiose (rupture de la vésicule germinative) via le MPF et les MAPkinase dont les taux augmentent consécutivement à cette baisse.

4 - Blocage au stade métaphase II

Une fois le stade métaphase II atteint, l'ovocyte va rester bloqué à ce stade jusqu'à une éventuelle activation par la pénétration du spermatozoïde. Celle-ci provoque un influx de calcium, la dégradation de la cycline et donc l'inactivation du MPF (Figure 9). L'existence d'un facteur cytotatique (CytoStatic Factor ou CSF) a été mise en évidence en même temps que celle du MPF grâce à des injections de cytoplasme montrant que le cytoplasme d'ovocytes en métaphase II contient une substance capable de bloquer le cycle cellulaire (Masui et Markert, 1971). Cependant, le CSF n'a jamais été purifié. Le produit du protooncogène *c-mos*, la protéine p39^{mos}, pourrait représenter une partie de cette activité CSF. La fonction de la protéine p39^{mos}, bien étudiée chez les amphibiens, est moins bien connue chez les mammifères. Cependant, l'obtention de souris dont le gène *c-mos* a été invalidé a permis de montrer que celui-ci intervient non seulement dans le blocage en métaphase II mais également, en amont des MAPK, dans l'assemblage du fuseau et la réactivation du MPF après la première méiose (Araki *et al.*, 1996). Des modifications post-traductionnelles de la tubuline (acétylation, tyrosinisation) pourraient également participer à la stabilisation du fuseau de métaphase II, tout comme l'absence de centrioles dans les MTOC situés au pôle du fuseau.

E - Particularités de la méiose ovocytaire chez la chienne

Le chien est une espèce mono œstrienne poly ovulatoire non saisonnée qui présente un cycle sexuel particulièrement long que l'on divise en quatre phases :

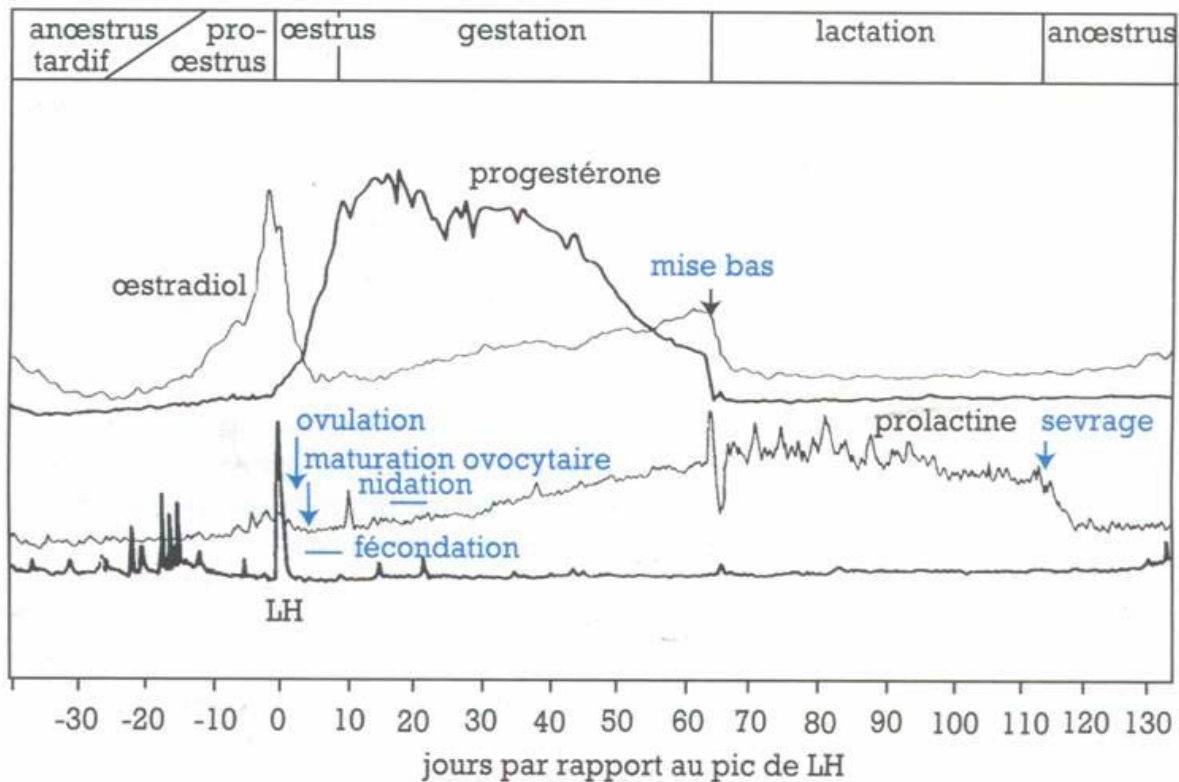
- le proœstrus (durant de 3 à 20 jours en moyenne), période caractérisée par des écoulements vaginaux mais au cours de laquelle la femelle refuse l'accouplement ;
- l'œstrus (durant 10 jours en moyenne) défini par l'acceptation de l'accouplement par la femelle ; c'est également au cours de cette période que se produit l'ovulation. Ces deux phases correspondent aux chaleurs proprement dites des chiennes.
- le métœstrus ou diœstrus (durant 2 mois), période de gestation ou de pseudogestation pendant laquelle la progestérone est sécrétée par le corps jaune ;
- l'anœstrus (de durée variable selon les races) s'étalant de trois à neuf mois, et qui correspond à la période de repos sexuel.

1 – Un modèle endocrinien singulier

Le cycle endocrinien des chiennes est également singulier ; en effet, durant le proœstrus, la concentration d'œstradiol augmente progressivement tandis que l'œstradiol décroît au début de l'œstrus, et que la progestérone commence à croître quelques jours avant l'ovulation au moment du pic de LH (ou Luteinizing Hormone). Cette lutéinisation préovulatoire est typique des chiennes et des renardes, et le taux de progestérone sanguin atteint cinq à sept ng/mL lors de l'ovulation (Concannon *et al.*, 1989). Par conséquent, les ovocytes présents dans les follicules préovulatoires sont exposés à cette augmentation de la progestérone avant l'ovulation qui a lieu spontanément un à trois jours après le pic de LH.

La durée de persistance du corps jaune est par la suite plus ou moins identique, que la chienne soit gestante ou non (deux mois environ). La période de lutéolyse est suivie par une longue période de repos sexuel (Concannon *et al.*, 1989 ; Johnston *et al.*, 2001).

Figure 12 : Evolution des taux circulants d'œstradiol, de progestérone et de prolactine chez la chienne en fonction de la période du cycle sexuel (d'après Concannon *et al.*, 1989). L'ovulation, la maturation ovocytaire, ainsi que la fécondation sont notées sur le graphique.



2 - L'ovulation d'un ovocyte bloqué en prophase I

Contrairement à la plupart des mammifères, l'ovocyte ovulé chez la chienne est au stade vésicule germinative, c'est-à-dire que son noyau est bloqué en prophase méiotique, soit en fin de phase G2 du cycle cellulaire (Figure 6). Chez la plupart des autres mammifères, rappelons que l'ovocyte est ovulé au stade métaphase II. La méiose se poursuit ensuite au sein des oviductes durant les quarante-huit à soixante-douze heures qui suivent l'ovulation. La chienne est donc réceptive à l'accouplement alors que des ovocytes immatures sont présents dans ses oviductes.

En effet, chez les chiennes, le pic de LH précède de trente-six à cinquante heures l'ovulation et signe le début de l'œstrus ou période d'acceptation du mâle (Concannon *et al.*, 1989). La maturation nucléaire ovocytaire quant à elle ne reprend qu'une fois les ovocytes ovulés, au sein des oviductes (Van der Stricht, 1923 ; Pearson et Enders, 1943 ; Tsutsui, 1975 ; Tsutsui, 1989). Par ailleurs, au cours d'un coït naturel, les spermatozoïdes atteignent les oviductes en vingt-cinq à cent-vingt secondes après l'éjaculation (Evans, 1933) et des spermatozoïdes mobiles peuvent être observés jusqu'à quatre à six jours après la copulation (Doak *et al.*, 1967) avalisant le fait que la maturation ovocytaire se poursuit chez la chienne alors que des spermatozoïdes circulent autour du complexe cumulo-ovocytaire. Cette dernière situation diffère de ce qui est observé chez les autres espèces chez qui les spermatozoïdes sont présents autour des ovocytes lorsque ceux-ci sont aptes à la fécondation c'est-à-dire après la maturation ovocytaire effectuée dans l'ovaire.

3 – Des conditions de maturation ovocytaire difficiles

La capacité des ovocytes de chienne à poursuivre leur méiose *in vitro* serait probablement également à corrélérer avec le diamètre des follicules dont ils sont issus puisque la compétence méiotique est acquise au cours de différents stades de la folliculogénèse chez plusieurs espèces (Sorensen et Wassarman, 1976 ; Motlik *et al.*, 1986 ; De Smedt *et al.*, 1994). Otoi *et al.*, en 2000 ont en effet montré que cette compétence chez la chienne dépend de la taille des ovocytes. Leur étude a montré que la maturation nucléaire ne pouvait s'observer qu'au-delà d'une certaine taille de l'ovocyte (100 µm). Les ovocytes mis en culture mesuraient ainsi au moins 100 µm de diamètre. De même il semblerait que la taille des follicules dont sont issus les ovocytes soit importante pour que la compétence nucléaire soit acquise (De Smedt *et al.*, 1994), celle-ci étant acquise lors de la folliculogénèse. L'équipe d'Otoi a également montré que la taille des follicules et celle des ovocytes pour l'acquisition de cette compétence sont corrélées (Tableau 2).

Tableau 2 : Relation entre le diamètre ovocytaire et la maturation ovocytaire (méiose) canine (d'après Otoi et al., 2000). GV : vésicule germinative ; GVBD : rupture de la vésicule germinative ; nb : nombre.

diamètre de l'ovocyte (µm)	nb d'ovocytes examinés	% d'ovocytes en GV	% d'ovocytes en GVBD	% d'ovocytes en métaphase I	% d'ovocytes en anaphase télophase I	% d'ovocytes en métaphase II	% d'ovocytes non identifiables
<100	74	35	4	2	0	0	33
100 à <110	107	48	19	15	0	0	25
110 à <120	164	23	20	49	3	8	61
120<	65	6	12	16	2	14	15

On rencontre de plus dans cette espèce des conditions de maturation ovocytaire particulières et les études réalisées rapportent de faibles taux de maturation *in vitro* des ovocytes de chiennes en comparaison avec ceux d'autres espèces domestiques. Ainsi, après soixante-douze à quatre-vingt-seize heures de culture, les pourcentages d'ovocytes observés en métaphase II s'étalent de 0% (Robertson *et al.*, 1992 ; Hewitt et England, 1999) à 32-42% (Nickson *et al.*, 1993 ; Yamada *et al.*, 1993) quel que soit le statut endocrinien des chiennes et les conditions de culture (Hewitt *et al.*, 1998 ; Hewitt et England, 1999), avec une moyenne de 10-20%.

Seuls deux types de culture semblent permettre d'augmenter significativement les taux de maturation :

- les ovocytes collectés à partir de follicules préovulatoires montrent de meilleurs taux de maturation (plus de 32% de métaphase II).
- de même la culture d'ovocytes dans des oviductes ligaturés donne de meilleurs résultats (63,8% des ovocytes reprennent leur méiose) par rapport à la culture d'ovocytes au sein d'oviductes exposés à l'air ambiant (27,1%) ou même au sein de gouttelettes (20,4%) ou encore accompagnée de cellules d'oviductes de chiennes (Luvoni *et al.*, 2003). Ce système est ingénieux et donne de bons résultats mais il est délicat à réaliser. Il requiert des oviductes ce qui suppose des ovariectomies et nécessite une standardisation du fait que les aspects des oviductes varient substantiellement selon le niveau du cycle sexuel. C'est pourquoi un

milieu de culture simplifie considérablement les choses et permet une meilleure reproductibilité.

L'amélioration des techniques de maturation chez la chienne apparaît de ce fait essentielle afin de développer la reproduction assistée dans l'espèce canine.

De récentes études ont cherché à améliorer la maturation *in vitro* des ovocytes de chiennes en faisant varier les conditions de culture (Cinone *et al.*, 1992 ; Robertson *et al.*, 1992 ; Hewitt et England, 1997, 1999 ; Hewitt *et al.*, 1998 ; Tableau 3). Cependant les résultats sont décevants par rapport à ceux obtenus pour les autres espèces domestiques. Par ailleurs, le taux de dégénérescence de 13 à 55% lors de ces cultures est important (Cinone *et al.*, 1992 ; Nickson *et al.*, 1993 ; Hewitt *et al.*, 1998 ; Saint-Dizier *et al.*, 2001).

Les faibles taux de maturation des ovocytes seraient à rattacher à la physiologie des chiennes. En effet, chez la plupart des mammifères, la maturation ovocytaire se produit au sein des follicules durant la folliculogenèse et la première division méiotique apparaît lors de l'ovulation. Ces ovocytes ovulés, bloqués en métaphase II, sont alors immédiatement fécondables dans les oviductes. Au contraire, les chiennes, qu'elles soient primipares ou multipares, ovulent des ovocytes immatures bloqués au stade vésicule germinative. Le premier globule polaire n'est émis que quarante-huit à soixante-douze heures post ovulation alors que ces ovocytes sont à mi-chemin des oviductes (Van der Stricht, 1923 ; Pearson et Enders, 1943 ; Tsutsui, 1975 ; Tsutsui, 1989). Il est probable que, contrairement au milieu oviductal, les conditions de maturation *in vitro* soient très suboptimales et restent encore à améliorer.

Tableau 3 : Taux de maturation ovocytaire obtenus en fonction des équipes de travail et des milieux de maturation utilisés (cf. page suivante). GV : vésicule germinative ; GVBD : rupture de la vésicule germinative ; MI : métaphase I ; MII : métaphase II ; nb : nombre ; M199 : milieu de culture modifié de Eagle (Sigma) ; SVF : sérum de veau fœtal ; BSA : sérum albumine de bœuf ; FSH : hormone stimulante de la folliculogenèse ; hcg : human chorionic gonadotropine ; oest : oestrogènes E2 ; Prog : progestérone P4.

Tableau 3 : Taux de maturation ovocytaire obtenus en fonction des équipes de travail et des milieux de maturation utilisés.

Auteurs et année	Conditions de culture	nb d'ovocytes/ μ l	Temps de culture	% de GV	% de GVBD	% de MI	% de M II
Yamada et al., 1992	milieu TYH (Krebs Ringer) 10%SVF 37°C, 5%CO ₂	groupe de 15-20 ovocytes antraux dans 400 μ l	48	/	/	/	27
			72	/	/	/	32
Nickson et al., 1993	M199 + 10% SVF + 20 μ g oest + glutamine pyruvate	/	24	/	/	/	39
			48				37 (pronoyaux)
			72				
Yamada et al., 1993	TYH + 10% SVF à 37°C et 5% CO ₂	groupe de 15-20 dans 400 μ l	72	/	/	/	32(superovulées) 12 (anoestrus)
Hewitt, England, 1997	M199 + 0,3% BSA	groupe de 10 dans 400 μ l	96	/	37(proœstrus)	19	
			96	/	41(œstrus)	11	
	M199 + 0,3% BSA avec 1 μ g d'oest avec 1 μ g de prog avec oest + prog contrôle	10 dans 400 μ l	48	/	56	13	
				/	33	17	
				/	50	20	
				/	50	4	
	M199 + 0,3% BSA avec 1 μ g d'oest avec 1 μ g de prog avec oest + prog contrôle	10 dans 400 μ l	96	/	45	10	
				/	59	0	
				/	63	4	
				/	63	0	
Hewitt et England, 1998	M199 + 5-10- 20 %SVF M199 + 0,3-4 % BSA	groupe de 10 dans 400 μ l	48	/	40	36	
			96	/	47	14	
Hewitt et England, 1999	M199 +/- cell. oviduct. SVF+0,3%/4% BSA		48	/	45	7	
			96	/	63	11	
Otoi et al., 2000	M199 + 5%SVF et 5 μ g/ml insuline et cell. cumulus bovine	/	72	/	/	16	26
Saint-Dizier et al, 2001	M199 + 20% SVF à 38,5°C et 5% CO ₂	groupe de 10-30 dans 500 μ l	24	68,90	19,3	6,7	1,7
			48	59	31	7,3	2,1
			72	60,3	27,4	8,1	2,1

4 - Des conditions de fécondation particulières

Les conditions de fécondation sont également particulières : par exemple, il a été montré que la fécondation peut intervenir *in vitro* alors que les ovocytes sont immatures (Saint-Dizier *et al.*, 2001) et entraîner la reprise de la méiose (28.3% des ovocytes fécondés étaient observés en métaphase I et II voire avec deux pronoyaux, contre seulement 10.2% pour le groupe témoin). De plus, cette fécondation *in vitro* s'accompagne d'un très fort pourcentage de polyspermie.

Les ovocytes de chiennes seraient-ils fécondables à des stades immatures ? Alors que plusieurs études montrent que ce ne serait pas le cas, la fécondation ne pouvant se produire qu'une fois le stade métaphase II atteint (Gier, 1950 ; Holst et Phemister, 1971 ; Tsutsui, 1989), une étude *in vivo* menée par Van der Stricht en 1923 rapporte la présence d'une tête de spermatozoïde au sein d'ovocytes au stade vésicule germinative ou en métaphase I. Par ailleurs, d'autres études (Mahi et Yanagimachi, 1976 ; Yamada *et al.*, 1993 ; Hewitt et England, 1997) indiquent que le niveau de maturation des ovocytes de chiennes lors de la fécondation ne modifie pas sensiblement le taux de pénétration des spermatozoïdes au sein de ces ovocytes. L'étude de Saint-Dizier menée en 2001 dans notre laboratoire montre quant à elle que la pénétration *in vitro* des spermatozoïdes est possible à des stades immatures. Par ailleurs, cette étude rapporte également qu'après soixante-douze heures de culture, 53.3% des ovocytes dans lesquels les spermatozoïdes ont pénétrés présentent une reprise de leur méiose (c'est-à-dire que ces ovocytes sont observés au stade vésicule germinale break-down et au delà) contre seulement 37.6% pour les ovocytes témoins (non mis en relation avec des spermatozoïdes). Cette stimulation serait mise en évidence dès le stade vésicule germinative mais aucune donnée ne permet de conclure quant à l'intensité de cette stimulation ou quant à l'évolution des ovocytes à l'issue de cette reprise. Néanmoins, cette pénétration à un stade immature et cet effet positif sur la reprise de méiose n'est observée que très rarement *in vivo* (Reynaud *et al.*, 2005).

Par ailleurs, cette stimulation a également été décrite chez les mollusques tel le clam (*Spisula solidissima*) par Yi *et al.*, en 2002. Cette étude montrerait notamment qu'une augmentation du niveau d'AMPc serait requise préalablement à la diminution afin de réinitialiser la poursuite de la méiose.

L'AMPc semble donc jouer un rôle central dans la reprise de la méiose chez les mammifères. Les mécanismes de reprise de la méiose n'ayant pas encore été élucidés chez la chienne, il paraissait intéressant d'explorer l'effet d'une modulation du niveau intraovocytaire d'AMPc, dans cette espèce, sur le taux de reprise de la méiose.

Nous avons donc mené une étude visant à augmenter ou diminuer le niveau intraovocytaire de l'AMPc dans le but d'observer les éventuels effets sur la reprise de méiose.

**Etude expérimentale :
effet de la modulation du
niveau d'AMPc sur la
reprise de la méiose
ovocytaire chez la chienne**

Etude expérimentale : effet de la modulation du niveau d'AMPc sur la reprise de la méiose ovocytaire chez la chienne

De notre étude bibliographique, il ressort que deux voies métaboliques différentes (l'une impliquant l'AMPc et l'autre impliquant le calcium via la protéine kinase calcium dépendante, Figure 8) ont un rôle dans la reprise de la méiose ovocytaire. L'importance relative de chacune de ces deux voies semble varier selon les espèces (Mermillod et Le Lannou, 1999).

De nombreuses études ont été réalisées chez plusieurs espèces (notamment chez la souris et les bovins) pour essayer de comprendre l'importance de l'AMPc dans la reprise de la méiose ovocytaire. Ces expériences visaient essentiellement à moduler le niveau intra ovocytaire de l'AMPc (en le baissant généralement) afin d'observer une éventuelle reprise de la méiose.

Cependant, chez le clam (*Spisula solidissima*), Yi *et al.* (2002) ont montré que la reprise de la méiose faisait suite à une augmentation de ce niveau d'AMPc et non pas à une diminution comme c'est le cas dans les espèces mammifères. L'objectif de notre étude était de déterminer pour l'ovocyte canin l'influence d'une augmentation ou d'une diminution du niveau intra ovocytaire de l'AMPc.

Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle des cellules de granulosa dans la reprise de la méiose ovocytaire ainsi que pour la survie de l'ovocyte. Ces cellules pourraient, en effet, sécréter une ou plusieurs substances à l'origine du blocage de la reprise de méiose (voir la partie bibliographie).

A - Matériels et méthodes

1 - Collecte des ovaires de chienne

Nous avons travaillé sur des ovaires de trente-quatre chiennes récoltés à l'issue d'ovariectomies de convenance (vingt-neuf chiennes) ou d'ovariohystérectomies (cinq chiennes opérées pour pyomètre), pratiquées par les étudiants à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (Unité de Reproduction) alors que les chiennes étaient en anœstrus ou en méœstrus. Les chiennes de races très différentes et âgées de un à huit ans étaient pour la plupart en bonne santé (exception faite des chiennes présentant un pyomètre, lesquelles furent opérées dans un but curatif).

Une fois ces ovaires prélevés, ceux-ci sont placés dans des tubes maintenus à 38,5°C et contenant du tampon phosphate ou "Phosphate Buffered Saline" (PBS, une solution de conservation isotonique ; Annexe 1) puis transportés au laboratoire dans l'heure suivant leur exérèse. Le maintien des ovaires à une température physiologique est important afin d'éviter un choc thermique nuisible aux ovocytes.

2 - Milieux de dissection et de maturation

a – Le milieu de dissection

Les ovaires sont dilacérés (Figure 13) et les ovocytes sont sélectionnés dans du **milieu de dissection** composé :

- d'un milieu M199 / HEPES (Sigma, St Quentin-Fallavier, France)
- de 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF ; Invitrogen, Cergy Pontoise, France)
- et de 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine, Sigma).

b – Les milieux de maturations : les traitements visant à moduler le rôle de l'AMPc

Le **milieu de maturation** se compose d'un milieu de culture de base auquel on ajoute selon le traitement, différentes molécules.

Le milieu de culture de base comporte :

- du milieu M199 (Sigma, Annexe 2).
- et 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Sigma).

Ce mélange une fois réalisé est stérilisé à l'aide d'un filtre Minisart (0,2µm) puis conservé dans l'étuve à 38,5°C avec 5% de dioxyde de carbone où le pH du milieu s'équilibre. Ce milieu est préparé préalablement aux manipulations afin de lui permettre de s'équilibrer dans l'incubateur. Par ailleurs lorsque ce milieu est déposé dans les puits des boîtes quatre puits, de l'eau pure est également déposée entre les puits afin de limiter la déshydratation du milieu.

Cinq lots de traitement ont été réalisés (Tableau 4) :

- Les lots n° 1 (ou lots témoins) d'ovocytes sont placés dans des puits ne contenant que du milieu de culture.
- Les ovocytes du lot n° 2 sont mis en culture dans un milieu de maturation comportant du milieu de culture auquel est ajouté un inhibiteur des protéine kinases A, le Rp-Adénosine 3', 5' – cyclic mono - phosphorothioate triethylammonium salt (Rp-cAMP, Sigma, Annexe 3) à la concentration de 1 mM (Figure 8).
- Les ovocytes du lot n° 3 sont mis en culture dans le milieu de culture additionné de dibutyryl AMPc (dbAMPc, Sigma, Annexe 4), un analogue de l'AMPc, à raison de 2 mM.
- Ceux du lot n° 4 reçoivent un activateur de l'adénylate cyclase, la forskoline à 100 µM (Sigma, Annexe 5).
- Enfin, dans notre lot n° 5, les ovocytes mis en culture sont dénudés mécaniquement c'est-à-dire débarrassés des cellules de granulosa qui les entourent avant d'être déposés dans le milieu de culture (Figure 14 C et D).

Le choix de ces cinq groupes fut fait avec comme objectif d'évaluer l'importance du niveau intracellulaire d'AMPc et son rôle dans la reprise de la méiose. Le dibutyryl AMPc et la forskoline visent à augmenter les niveaux d'AMPc tandis que le RpAMPc permet de réduire le rôle fonctionnel de l'AMPc. L'étude des ovocytes dénudés a pour but de savoir comment un ovocyte peut évoluer et survivre en culture sans ses cellules de granulosa (arrêt des communications ovocyte-granulosa et de l'apport en nutriments et en AMPc) et d'étudier le rôle des relations ovocyte-granulosa dans la reprise de la méiose chez la chienne.

Tableau 4 : Composition et conséquences des différents traitements visant à moduler la fonction de l'AMPc pendant la maturation *in vitro*.

Groupes	Composition du milieu de culture	Effet du composé	Fonction médiée par l'AMPc
Témoin	M199 + 20% SVF		
dbAMPc	M199 + 20% SVF + 2mM dbAMPc	analogue de l'AMPc	+
Forskoline	M199 + 20% SVF + 100µM forskoline	activateur de l'adénylate cyclase	+
Dénudés	M199 + 20% SVF + dénudation mécanique		?
Rp-AMPc	M199 + 20% SVF + 1mM RpAMPc	inhibiteur de la PKA	-

3 – Dissection et la sélection des ovocytes

Ces ovaires sont ensuite isolés de leur bourse ovarique, des vaisseaux ainsi que du tissu adipeux les entourant, dans une boîte de Pétri à l'aide d'une lame de rasoir puis transférés dans une autre boîte de Pétri contenant du milieu de dissection et maintenue à 38,5°C grâce à une plaque chauffante (Figure 13). Sous une hotte à flux laminaire, l'ovaire est alors lacéré régulièrement dans sa totalité et selon son axe longitudinal puis transversal toujours à l'aide d'une lame de rasoir puis il est agité doucement dans le milieu de dissection (voir ci-dessous) afin de libérer les ovocytes. A l'issue de cette manipulation, la boîte est placée sous la loupe binoculaire afin de récolter les ovocytes. Seuls les ovocytes non dénudés présentant un cytoplasme uniformément sombre et avec au moins deux couches de cellules de granulosa (Figure 14 A et B) sont aspirés à l'aide d'une pipette à bouche assez large puis déposés dans une boîte pour fécondation *in vitro* (FIV). Les ovocytes sont alors mesurés et les ovocytes d'un diamètre supérieur à 100 µm, zone pellucide comprise, sont sélectionnés. Lorsque la sélection est terminée, les ovocytes sont rincés une première fois dans le puits n° 1 de la boîte quatre puits. Chaque puits de la boîte contient 500 µl de milieu de maturation. Puis ils sont rincés une seconde fois dans le puits n° 2 avant d'être déposés dans les puits n° 3 et 4 où ils sont cultivés par groupe de vingt. Enfin, cette boîte est rapidement transférée dans l'incubateur où elle reste pendant les soixante-douze prochaines heures à 38,5°C et dans une atmosphère contenant 5% de dioxyde de carbone dans l'air.

Chaque ovaire est lacéré individuellement dans une boîte de Pétri mais les ovocytes des différents ovaires prélevés le même jour sont regroupés dans la même boîte FIV puis répartis par groupe de vingt dans les différents traitements. Ainsi, si les ovaires de deux chiennes différentes sont utilisés des groupes homogènes de vingt ovocytes sont constitués à partir de dix ovocytes d'une paire d'ovaires et dix de l'autre paire. Ce sont alors ces lots qui une fois composés sont rincés deux fois dans les puits n°1 et n°2 puis sont mis en culture dans les puits n°3 voire 4 selon le nombre d'ovocytes obtenus.

Figure 13 : Récolte et mise en maturation des ovocytes.

Avant de débuter le travail sur les ovaires, le matériel est préparé et notamment la pipette à bouche (A) ainsi que le milieu de maturation qui est mis à équilibrer dans l'incubateur. Les ovaires de chienne sont ensuite isolés de leur bourse ovarique (B). Une fois bien individualisés (C et D), ils sont dilacérés à la lame de rasoir. Les complexes cumulo-ovocytaires (COCs) sont sélectionnés parmi les fragments de cortex obtenus (E). Les COCs de mauvaise qualité ne sont pas conservés (lysés, trop petits, cytoplasme clair,...). Les COCs sélectionnés (cytoplasme noir, homogène, avec une à trois couches de cellules de granulosa) sont déposés dans une boîte de Pétri (F) avant d'être transférés dans les boîtes quatre puits par groupe de vingt, dans des milieux de culture différents. Une barre d'échelle = 1cm.

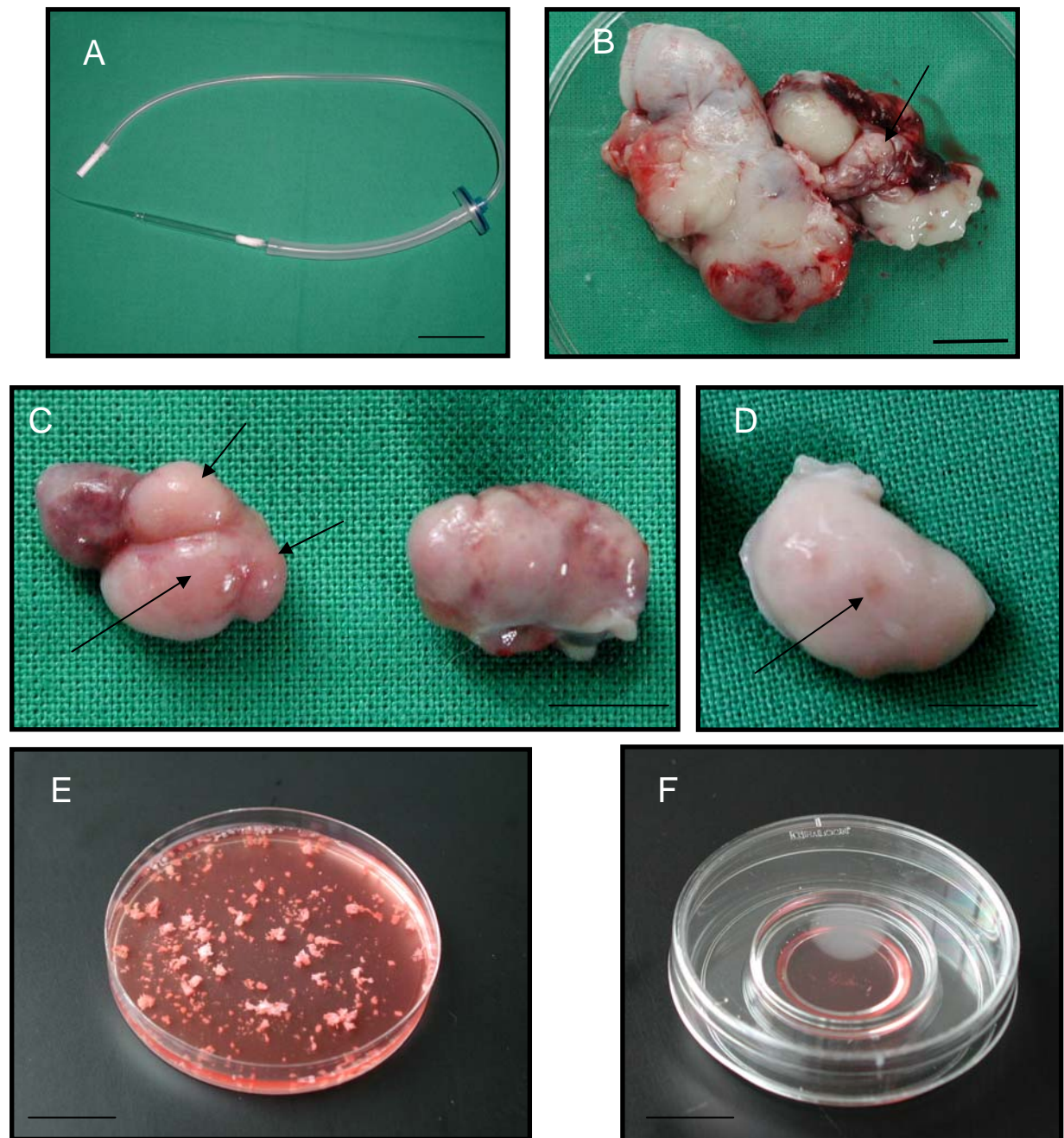
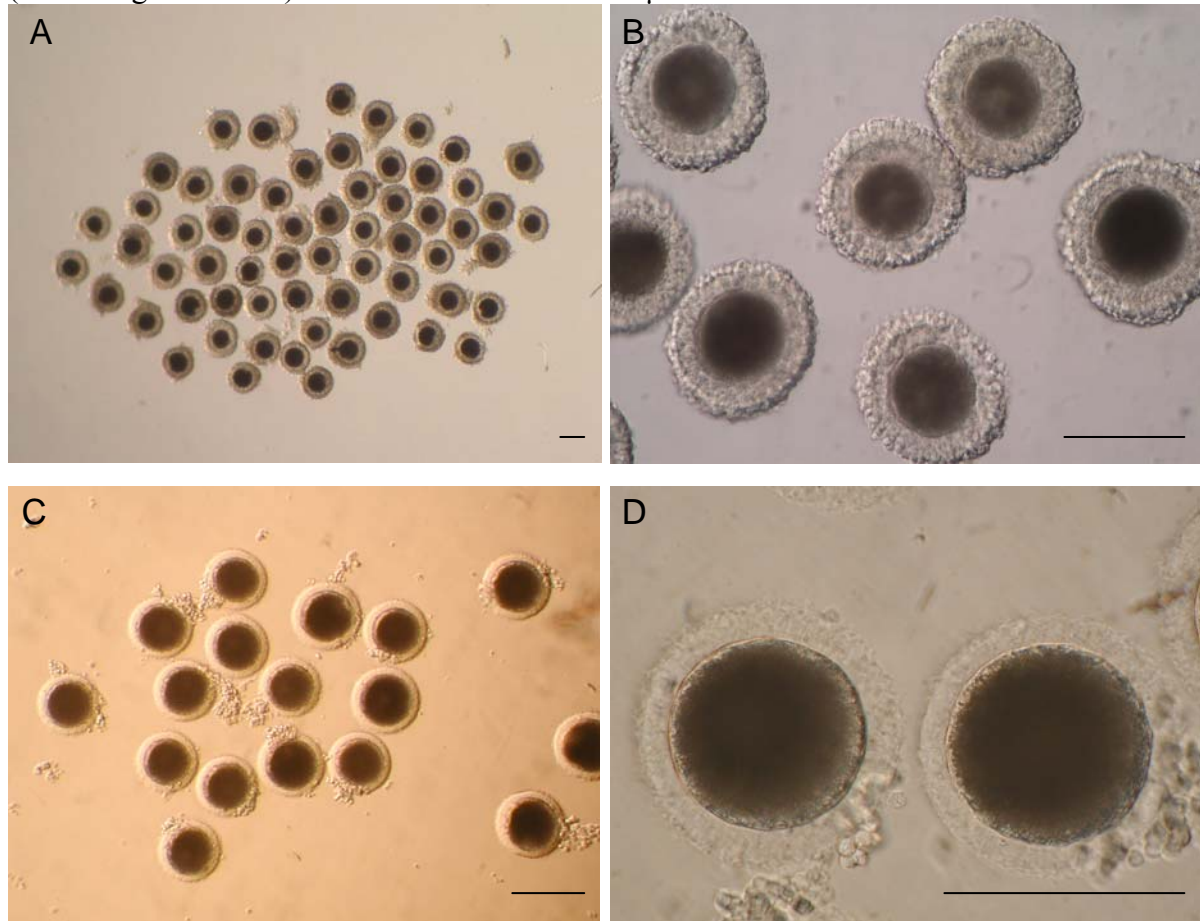


Figure 14 : Ovocytes de plus de 100 μm de diamètre (zone pellucide comprise) après leur sélection et préalablement à leur mise en culture en microscopie optique. Les ovocytes présentant un cytoplasme uniformément noir et sphérique ainsi que deux couches de cellules de granulosa (A et B) sont sélectionnés puis mesurés. Les ovocytes devant être dénudés pour les besoins du protocole (C et D) ne sont dénudés qu'une fois cette sélection réalisée. La partie centrale des ovocytes légèrement plus claire correspond au noyau de ces cellules (vésicule germinative). Une barre d'échelle = 100 μm .



4 - Fixation et coloration des ovocytes mis en culture

Ces deux manipulations interviennent à l'issue des soixante-douze heures de culture. L'organisation des microtubules cytoplasmiques étant étroitement associée à la maturation nucléaire des ovocytes chez le Chien (Saint-Dizier *et al.*, 2001), la coloration des microtubules ainsi que de la chromatine est réalisée.

Les ovocytes doivent préalablement être dénudés, c'est-à-dire débarrassés de leurs cellules de granulosa, ces cellules empêchant une bonne observation du stade nucléaire. Une pipette assez fine pour n'autoriser que le passage des ovocytes entourés de leur zone pellucide est utilisée pour cela. Mécaniquement et par une série d'allers et retours dans cette pipette, les ovocytes sont peu à peu dénudés dans du milieu de dissection.

a – Fixation

Les ovocytes sont alors déposés dans du paraformaldéhyde à 2% (50 µl de paraformaldéhyde à 20% auquel sont ajoutés 450 µl du milieu M199) pendant trente minutes, à 38,5°C. Ces mêmes ovocytes sont ensuite transférés dans du paraformaldéhyde à 4% toujours pendant 30 minutes et à 38,5°C. Le principe de cette fixation consiste en une réalisation de liaisons covalentes entre les protéines des ovocytes ou cross linking. Une fois cette fixation réalisée, les ovocytes sont rincés dans du PBS, puis disposés dans de l'albumine sérique bovine (BSA, Sigma, Fraction V) à 2% (2g/100ml) dissoute dans du PBS (PBS/BSA), sous des gouttes d'huile minérale (Sigma) puis mis dans ce même milieu au réfrigérateur en attendant la coloration. Cette coloration doit être réalisée peu avant l'observation des ovocytes à l'aide du microscope confocal, du fait de sa labilité. L'albumine possède un rôle protecteur vis à vis des ovocytes, et empêche que les ovocytes ne collent au substrat plastique de la boîte.

b - Coloration

Deux méthodes de coloration sont utilisées afin de marquer d'une part l'acide désoxyribonucléique (ADN) et d'autre part la tubuline, réseau filamenteux qui participe au maintien des cellules ainsi qu'à la séparation des chromosomes homologues et de leurs chromatides (fuseau méiotique). La coloration du matériel génétique utilise l'Ethidium Homodimère 2 (Molecular Probes, Interchim, Montluçon), un colorant qui marque particulièrement l'ADN. L'éthidium homodimère 2 (EH-2) se lie fortement aux doubles brins d'ADN, aux simples brins d'ADN ou encore à l'ARN et aux oligonucléotides augmentant ainsi considérablement la fluorescence émise. De plus, la fluorescence émise lorsque cet EH-2 est fixé à l'ADN double brins est également deux fois plus importante que celle émise lorsqu'il est lié à l'ARN.

La tubuline, quant à elle, est détectée par immunocytochimie grâce à un anticorps primaire monoclonal anti-tubuline de chèvre, obtenu chez la souris (Sigma), que l'on détecte ensuite avec un anticorps secondaire anti-souris auquel un fluorochrome est lié (l'Alexa Fluor ; Tableau 5).

La coloration débute par une perméabilisation des ovocytes. Les ovocytes fixés sont dans un premier temps rincés dans du tampon phosphate puis déposés dans du Triton X100 (Sigma) dilué à 0,5% (0,5 ml/100 ml PBS/BSA), pendant quinze à trente minutes à température ambiante, ce qui augmente la perméabilité des ovocytes permettant en particulier aux colorants de pénétrer davantage au sein de ces cellules. Suit un blocage des liaisons non-spécifiques qui utilise de la BSA à 2% pendant trente minutes à température ambiante. Cette BSA a la propriété de se fixer de manière non spécifique sur les molécules cellulaires d'où ce terme de blocage non-spécifique. Enfin les ovocytes sont marqués (marquage spécifique) par l'anticorps primaire anti-tubuline dissout au 1/200ème dans PBS/BSA pendant une heure et demi à 37°C. Cette étape est réalisée sous une goutte d'huile minérale. Les ovocytes sont ensuite rincés trois fois de suite dans du tampon phosphate pendant quinze minutes à chaque fois.

Dans un deuxième temps, les ovocytes sont marqués à l'éthidium homodimère 2 dilué au 1/500ème dans PBS/BSA ainsi qu'avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa Fluor et dilué au 1/500ème dans PBS/BSA, pendant une heure à 37°C (Tableau 5). Ce second marquage est réalisé également sous une goutte d'huile. Les ovocytes sont ensuite rincés dans du PBS à température ambiante pendant deux fois quinze minutes. Une "post fixation" est ensuite réalisée à l'aide de paraformaldéhyde à 2% pendant vingt minutes à température ambiante. Les ovocytes sont alors rincés une dernière fois puis montés entre lame et lamelle

dans une goutte de milieu de montage (Vectashield, Vector, Interchim, Montluçon, France). Ce milieu à base de glycérol possède des propriétés telles que la fluorescence s'altère moins rapidement ("antifading") tout en limitant également la déshydratation des ovocytes. Cette deuxième étape de coloration doit être réalisée à l'abri de la lumière afin de limiter au maximum toute diminution de la fluorescence liée à une trop grande exposition du fluorochrome à la lumière. En effet, la fluorescence est extrêmement photosensible : l'exposition à la lumière conduit de manière irréversible à la perte de cette fluorescence et donc pour cette raison chaque étape de la coloration doit être réalisée en prenant bien soin de protéger les boîtes de la lumière (aluminium par exemple). Ces lames conservées à l'obscurité sont ensuite observées au microscope confocal.

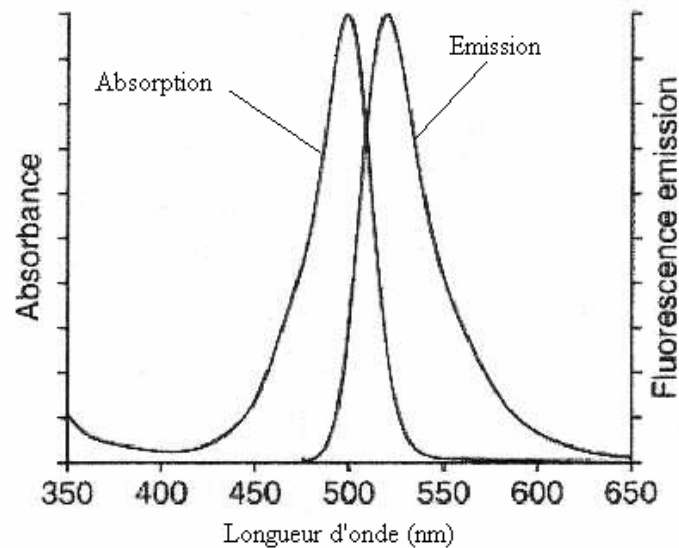
Tableau 5 : Caractéristiques des anticorps primaire anti α -tubuline, secondaire, et de l'éthidium homodimère 2.

	Espèce productrice	Rôle	Concentration utilisée	Absorption	Emission	Laser
Ac anti α -tubuline	Souris (Mc)	Ac primaire	25 μ g IgG/mL	—	—	—
Ac secondaire couplé à l'Alexa fluor 488	Chèvre (Pc)	Ac secondaire	4 μ g/mL	495 nm	519 nm (vert)	Argon 488 nm
Ethidium homodimère2	—	Agent intercalant de l'ADN	2 μ M	498 nm	624 nm (rouge)	Argon 488 nm

Ac : anticorps ; Mc : monoclonal ; Pc : polyclonal ; Ig : immunoglobuline

La fluorescence est un processus d'absorption et d'émission d'énergie qui concerne essentiellement des molécules polyaromatiques à cause de leurs doubles liaisons. L'absorption d'énergie ou excitation se fait grâce au laser dans le cas du microscope confocal. Une fois le fluorochrome excité, ce dernier émet en retour un photon afin de retrouver sa stabilité. Ce photon présente une longueur d'onde supérieure à celle nécessaire à l'excitation. Par exemple, l'Ethidium homodimère-2 est excitable par l'Argon (longueur d'onde de 488 nm), soit du vert et émet dans le rouge (longueur d'onde de 624 nm). L'Alexa Fluor quant à lui est excitable par l'Argon également mais émet dans le vert (longueur d'onde de 519 nm). Dans notre cas nos colorants sont donc excitables par la même longueur d'onde (Figure 15).

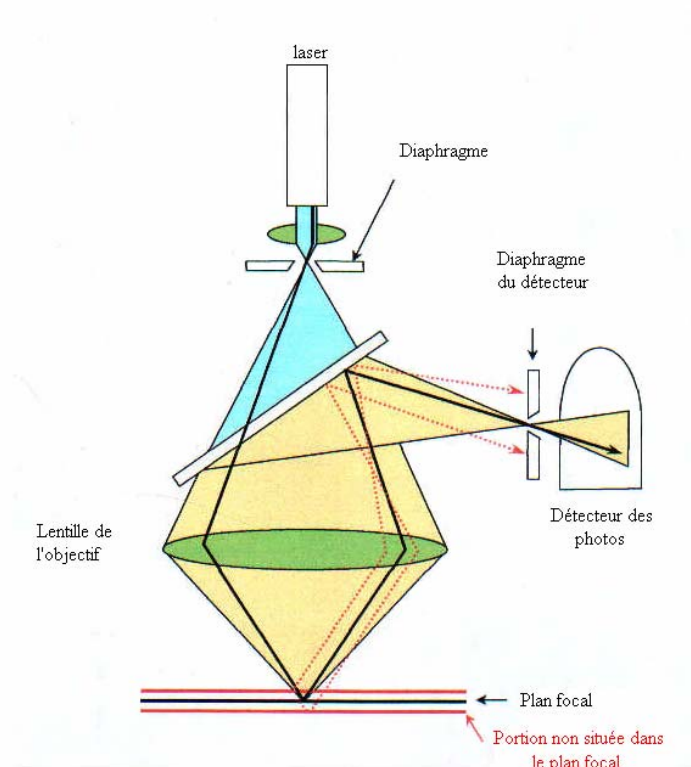
Figure 15 : Spectres d'absorption et d'émission de l'Ethidium homodimère-2 et de l'Alexa Fluor.



5 - Observation des ovocytes au microscope confocal

La microscopie confocale autorise l'observation d'éléments fluorescents sans que ces derniers aient été sectionnés préalablement (observation « in toto »). Si l'on utilise un microscope à lumière conventionnelle, la fluorescence du spécimen entier interfère avec la résolution et les structures présentes au sein des tissus ne peuvent être observées qu'après une section préalable de ces derniers au microtome. Avec le microscope confocal, seule la fluorescence émise par la portion du spécimen mise au point nous est projetée (le reste étant éliminé par un système de diaphragme), augmentant considérablement la résolution des images (Figure 16). Par ailleurs, une série de sections d'un élément peut être réalisée via ce procédé et enregistrée numériquement, autorisant par la suite la reconstitution d'images en trois dimensions, sans altérer la structure ni la viabilité des tissus. D'autre part, le microscope confocal offre d'autres avantages tels que la possibilité d'observer une image recomposée et présentant des fluorescences de couleurs différentes (détection simultanée de plusieurs antigènes). Enfin, ces images étant obtenues par scanner, la fluorescence est de ce fait protégée d'une trop forte illumination et donc d'une diminution trop importante du signal émis qui est très sensible à toute exposition prolongée aux rayons lumineux.

Figure 16 : Représentation schématique du fonctionnement du microscope confocal (d'après Reynaud *et al.*, 2001).



La source lumineuse utilisée en microscopie confocale se compose d'un laser et non plus d'une lampe à mercure, ce qui a l'avantage de procurer une source lumineuse intense et monochromatique. Plusieurs combinaisons de lasers peuvent néanmoins être utilisées pour chaque appareil, autorisant ainsi la détection simultanée de plusieurs types de fluorescences.

Après avoir traversé le spécimen observé, la lumière réfléchie est ensuite déviée par un miroir dichroïque alors que la lumière fluorescente émise traverse ce même miroir en direction du détecteur (un miroir dichroïque réfléchit la lumière à courte longueur d'onde alors qu'il est perméable aux lumières présentant de grandes longueurs d'ondes). Un diaphragme est situé juste en avant du détecteur ; ces deux diaphragmes n'autorisent le passage que des informations issues du plan focal mis au point vers le détecteur, éliminant la fluorescence émise par les autres portions du spécimen. Parfois, des filtres sont ajoutés, affinant encore plus la qualité des images en ne laissant passer que certaines longueurs d'ondes, et en évitant ainsi le bruit de fond.

Dans le cadre de notre étude, la microscopie confocale (microscope CLSM 310, Karl Zeiss, Allemagne) présente plusieurs intérêts. En effet, le cytoplasme des ovocytes de chienne est très sombre du fait de la présence d'une très grande quantité de globules lipidiques, ce qui gêne la visualisation du stade nucléaire. Le microscope confocal permet d'éviter ce problème. En conséquence, la microscopie confocale permet de réduire considérablement le taux d'ovocytes de stade nucléaire non déterminé après observation par rapport à l'utilisation du colorant Hoechst 33342 couplé à la fluorescence conventionnelle (Saint-Dizier *et al.*, 2004).

6 - Détermination du stade de maturation des ovocytes

Au stade de la vésicule germinative, les ovocytes présentent généralement un seul large nucléole (quelques fois plusieurs) situé au sein d'un amas de chromatine d'aspect plutôt diffus. L'organisation des microtubules à ce stade n'est pas visible mais cependant, en région sous-corticale de même qu'en région périnucléaire, la tubuline est détectable permettant souvent de visualiser les contours cellulaires et nucléaires.

Au stade de la rupture de la vésicule germinative (GVBD), un réseau de microtubules apparaît dans le cytoplasme ovocytaire et de petits asters sont visibles avec généralement un aster de microtubules situé à proximité de la chromatine condensée. La chromatine, quant à elle, commence à se condenser et le nucléole persiste parfois bien que ses contours soient moins définis qu'au stade vésicule germinative.

Au stade de la métaphase I (MI), les chromosomes sont très condensés et sont organisés en plaque dite métaphasique ou en ligne selon l'axe d'observation de ces chromosomes. Les microtubules sont organisés quant à eux en fuseau. Ces fuseaux sont symétriques, d'aspect cylindrique, avec néanmoins une base élargie (située au niveau des chromosomes). Avant ce stade MI, on distingue parfois du matériel génétique très condensé (chromosomes) mais non organisé en plaque, c'est ce que nous avons appelé un stade prémétaphase (Saint-Dizier *et al.*, 2004).

Au stade métaphase II, l'organisation est identique à celle décrite précédemment avec en plus un globule polaire (de petite taille) contenant du matériel génétique et entouré de microtubules situé à la périphérie de l'ovocyte. Le deuxième fuseau est cependant plus petit que le premier et reste à proximité du globule polaire (Tableau 6).

Dans les ovocytes dégénérés, soit la chromatine est présente mais condensée à l'extrême tel un noyau picnotique, soit aucun matériel génétique n'est visible. Dans les deux cas, aucun réseau de microtubules n'est observable. Souvent la zone pellucide apparaît discontinue et la membrane cytoplasmique lysée. Remarquons cependant que ces ovocytes semblent être plus marqués par la coloration (bruit de fond du second anticorps).

Enfin, certains ovocytes présentent un matériel génétique qui ne ressemble à aucun de ceux décrits ci-dessus et que nous avons classés dans un groupe dit « non déterminés ».

Tableau 6 : Critères de détermination du stade de maturation de l'ovocyte au microscope confocal.

Stades	ADN	Chromosomes	Zone nucléaire	Nucléoles	Microtubules
GV	décondensé	non visibles	visible	visibles	répartis dans le cytoplasme
GVBD	début de condensation	non visibles	visible	visibles	début polymérisation (formation asters)
Pré métaphase	condensé	visibles, non alignés	absente	absents	
Métaphase	condensé	alignés	absente	absents	fuseau présent cytoplasme noir

B - Résultats

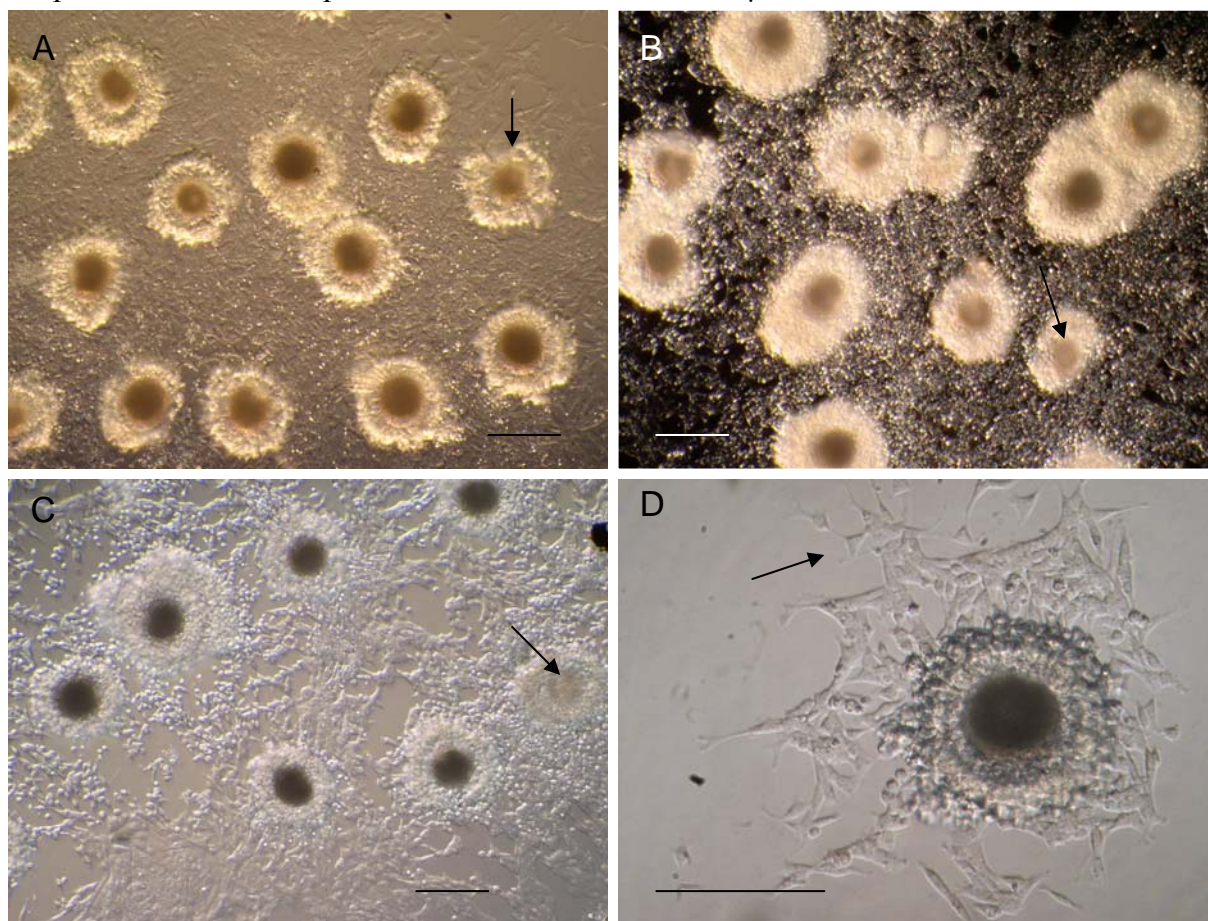
1 - Effectifs - difficultés de manipulation

Un total de mille neuf cent trente-sept (1937) ovocytes fut obtenu à partir de trente-quatre chiennes (soit en moyenne 28,5 ovocytes mis en maturation par ovaire). Parmi ces ovocytes, mille six cent quatre-vingt-dix-sept (1697) ovocytes furent sélectionnés et mis en culture (Figure 14, Annexe 6). Les ovocytes non sélectionnés possédaient un cytoplasme plus clair, moins homogène ou un contour cytoplasmique moins net et moins circulaire, étaient de taille inférieure au seuil fixé ou encore n'étaient pas en nombre suffisant pour constituer un autre groupe de culture.

La répartition des ovocytes dans les cinq groupes de culture fut homogène avec respectivement quatre cent vingt ovocytes pour le lot témoin (420), trois cent vingt ovocytes pour le lot additionné de dbAMPc (320), deux cent quatre-vingt-dix-huit ovocytes pour le lot additionné de forskoline (298), trois cent trente-neuf ovocytes pour le lot additionné de RpAMPc (339) et enfin trois cent vingt ovocytes pour le lot des ovocytes dénudés (320). Un lot témoin était réalisé à chaque mise en culture d'où le nombre d'ovocytes témoins plus élevé. Nous avons réalisé vingt séances de mis en culture.

Après les soixante-douze heures de culture, les complexes cumulo-ovocytaires étaient, pour la grande majorité, accolés au fond de la boîte quatre-puits et une légère « expansion » du cumulus était parfois aussi observée (Figure 17). Par ailleurs, aucune différence n'était observable macroscopiquement entre les cinq lots ; les ovocytes dans la plupart des cas présentaient un cytoplasme uniformément noir et la couche de cellules de granulosa quant à elle tendait à s'étendre autour des ovocytes formant un réseau. Dans certains cas, des cellules de granulosa se détachaient même de cette couche et s'affinaient allant jusqu'à ressembler à des fibroblastes (Figure 17 D). Certains ovocytes avaient un aspect différent, avec un cytoplasme clair (Figure 17 B), voire absent (Figure 17 C). D'autres ovocytes étaient éclatés (totalement ou partiellement) ou recroquevillés malgré la sélection rigoureuse réalisée préalablement à la mise en culture. Ces ovocytes dégénérés ou lysés correspondent à une dégénérescence en cours de maturation *in vitro*. Le taux de dégénérescence obtenu lors de ces manipulations a été de 2 %.

Figure 17 : Ovocytes après soixante-douze heures de culture (microscopie optique). Quelque soit le lot d'appartenance, les ovocytes ont tous le même aspect. Quelquefois selon l'incidence de la lumière leur cytoplasme apparaît plus clair (flèche ; A, B et C). On peut observer une expansion de leur cumulus conduisant à la formation d'un réseau entre les ovocytes (C). La photo D représente un ovocyte dont les cellules externes de granulosa se sont détachées, différenciées puis attachées au fond sous forme fibroblastique. La photo B a été prise en contraste de phase. Une barre d'échelle = 100µm.



La dénudation des ovocytes après la maturation *in vitro* de soixante-douze heures s'avéra plus ou moins difficile à réaliser selon les groupes de culture. Ainsi les groupes d'ovocytes mis en culture avec du dbAMPC ou avec de la forskoline ont constitué les deux groupes dont les pertes à l'issue de cette dénudation ont été élevées. En effet, les ovocytes semblaient souvent reliés entre eux par des petits filaments formant un grand réseau et rendant la manipulation individuelle des ovocytes délicate et conduisant malheureusement à la destruction de certains ovocytes à l'occasion de cette dénudation. Il fut remarqué par ailleurs que les ovocytes présentant un aspect anormal après les soixante-douze heures de maturation *in vitro* étaient souvent plus difficiles à dénuder.

Les pertes lors de la fixation et de la coloration ont été très faibles et s'expliquaient soit par l'aspiration trop forte de l'ovocyte avec la pipette à bouche avec comme conséquence l'éclatement de l'ovocyte ou bien la perte de l'ovocyte dans la pipette.

Au bilan, la morphologie nucléaire a été évaluée pour mille cinq cent cinquante-cinq (1555) ovocytes (Tableau 7).

Tableau 7 : Nombre d'ovocytes mis en maturation *in vitro*, observés après la maturation *in vitro*, dégénérés lors de la maturation, observés après la dénudation et la fixation et enfin observés au microscope confocal en fonction des cinq lots étudiés.

Ovocytes groupe	Mis en MIV	Après la MIV	Nombre dégénérés	Après dénudation	Après fixation	Observés au microscope
Témoin	420	416	7	398	393	388
dbAMPc	320	314	14	278	268	260
Forskoline	298	292	7	268	267	267
RpAMPc	339	339	6	330	327	322
Dénudés	320	320	0	320	319	318
Total	1697	1681	34	1594	1574	1555

2 - Images de méiose ovocytaire canine obtenues

Dix configurations de l'ADN et des microtubules furent observés ;

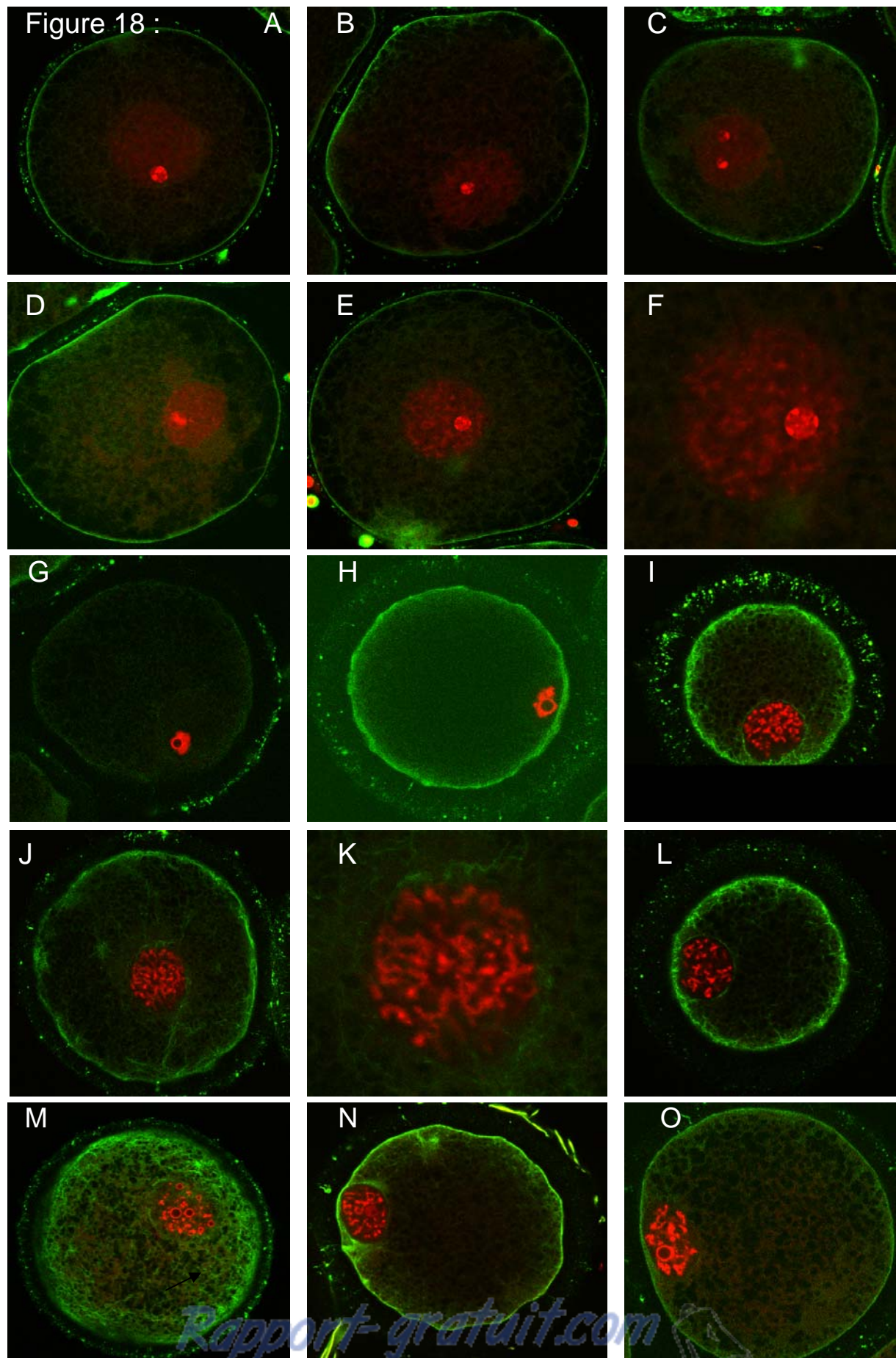
- vésicule germinative (Figure 18 A, B, C, D, E, F),
- vésicules germinatives de petite taille (Figure 18 G et H),
- GVBD (Figure 18 I, J, K, L, M, N, O),
- prémétaphase I (Figure 19 A et B),
- métaphase I (Figure 19 C à N),
- télophase I (Figure 19 O, P, Q, R),
- anaphase I (Figure 19 S et T),
- métaphase II (Figure 19 U, V, W et X),
- et enfin ovocytes sans matériel génétique ou avec de l'ADN picnotique
- ovocytes non classables (matériel génétique non déterminé).

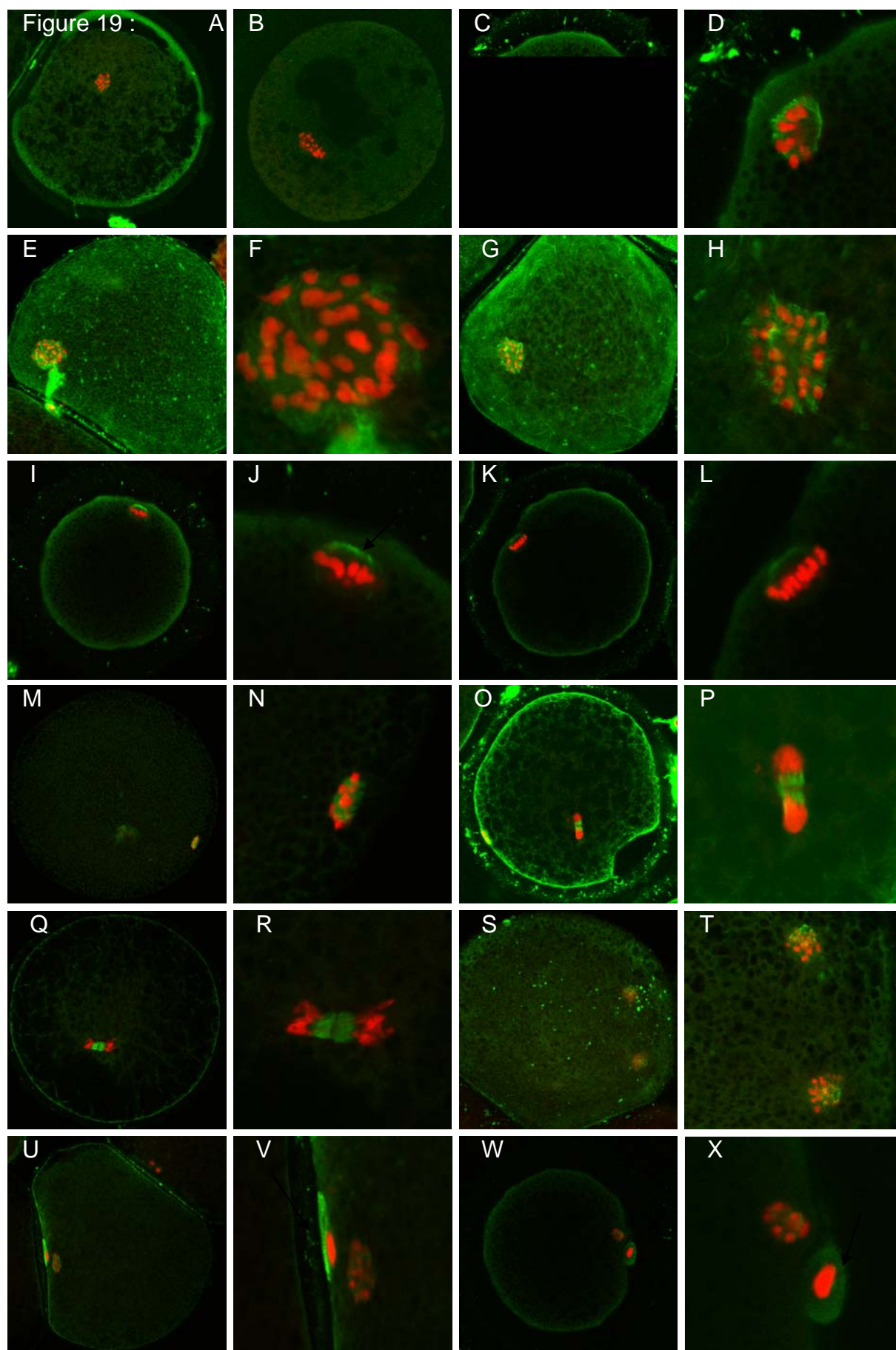
Deux personnes observèrent en même temps les ovocytes au microscope confocal et réalisèrent un premier classement (Annexe 7). Ce classement fut vérifié dans un deuxième temps par deux autres personnes indépendamment l'une de l'autre. Ainsi les résultats obtenus résultent de l'observation collective de quatre membres de l'équipe.

Les ovocytes aux stades nucléaires depuis le stade GVBD jusqu'au stade Métaphase II furent considérés comme ayant repris leur méiose et les ovocytes au matériel génétique non classifié ou invisible furent considérés comme dégénérés (Tableau 8 et 9). L'effet du traitement a été analysé par Chi 2.

Figure 18 : Ovocytes canins au stade vésicule germinative ou GVBD (en rouge : ADN ; en vert : α -tubuline ; observation en microscopie confocale ; p49). Nous pouvons observer un cercle de couleur verte correspondant au réseau tubulaire sous membranaire des ovocytes ainsi que le matériel génétique coloré en rouge. Sur les photos **A, B, C, D, E** ce matériel est diffus, seul des ronds opaques de couleur rouge se détachent (les nucléoles) ; ce sont des images caractéristiques de **vésicules germinatives**. La photo **F** est un agrandissement du noyau d'un ovocyte (**E**). Les photos **G et H** représentent également des **vésicules germinatives** mais de petite taille. Les photos **I, J, L, M, N, O** sont caractéristiques de **GVBD** : le contour cellulaire reste visible mais en plus nous pouvons observer un réseau tubulaire intra cellulaire dense qui entoure la chromatine plus condensée. La photo **K** représente un agrandissement du noyau d'un ovocyte bloqué au stade **GVBD**.

Figure 19 : Ovocytes au stade prémétaphase et métaphase II (p50). Les photos **A et B** représentent deux ovocytes dont le matériel génétique est condensé et presque organisé en plaque : ovocytes en **pré métaphase**. Les photos **C, D, E, F, G, H**, représentent des ovocytes au matériel génétique condensé et organisé en plaque. Ces plaques sont observées de face, il s'agit d'ovocytes bloqués en **métaphase I** (aucun globule polaire n'est observable). Les photos **I, J, K, L, M et N** représentent également des ovocytes bloqués en **métaphase I** mais cette fois ci la plaque métaphasique est vue de profil. Les photos **O, P, Q, R** représentent des ovocytes au matériel génétique condensé mais en train de se séparer : il s'agit d'ovocytes bloqués en **télophase I**. Les fuseaux méiotiques (en vert) sont très nettement visibles. Les photos **S et T** représentent des ovocytes dont le matériel génétique condensé vient de se séparer. Chaque morceau est organisé en plaque, il s'agit d'une **anaphase I**. Les photos **U, V, W, X** représentent quant à elles des ovocytes bloqués en **métaphase II**. Les globules polaires sont nettement visibles et localisés à proximité du matériel génétique de l'ovocyte. Sur la photo **X**, les contours cellulaires sont bien distincts et visualisables.





3 - Effets des traitements sur la reprise de méiose

Le taux de dégénérescence est en moyenne de 30,4 %, variant de 26,3 % pour le lot témoin à 36,3 % pour le lot additionné de RpAMPc (Tableau 8 et 9). Il ne présente pas de différence significative entre les lots ($p>0,05$). Nous avons donc ensuite étudié uniquement les ovocytes non dégénérés.

On observe une répartition significativement différente des ovocytes en fonction de leurs différents stades nucléaires selon les lots de traitement ($p<0,001$) : un pourcentage important d'ovocytes est resté bloqué au stade vésicule germinative (de 19,8 % à 43,9 % selon le groupe) et les taux de reprise de méiose varient entre 56,1 % et 80,2 % (Tableau 8 et 9).

Tableau 8 : Effets des différents traitements sur la maturation nucléaire des ovocytes après 72 heures de culture. GV : vésicule germinative ; GVBD : rupture de la vésicule germinative ; Méta I/II : métaphase I ou II ; Télo/Ana : télophase ou anaphase. Les pourcentages sont donnés par rapport au nombre d'ovocytes observés au microscope confocal.

<u>Stade</u> <u>Lots</u>	GV	GVBD	Méta I	Télo/Ana	Méta II	sans ADN	dégénérés
Témoins	107	150	21	2t 1a	5	73	29
%	37,4	52,4	7,3	1,1	1,8	18,81	7,47
dbAMPc	80	92	9	1a	0	55	23
%	44	50,5	4,9	0,6	0	21,15	8,85
Forskoline	51	132	8	1	0	44	31
%	26,6	68,8	4,2	0,5	0	16,48	11,61
RpAMPc	77	94	32	1a	1	87	30
%	37,6	45,9	15,6	0,5	0,5	27,01	9,32
Dénudés	43	154	18	0	2	54	47
%	19,8	71	8,3	0	0,9	16,98	14,78
Total	358	622	88	6	8	313	160

Tableau 9 : Bilan des taux de dégénérescence et de l'effet des traitements. Le groupe intitulé dégénérés regroupe les ovocytes ne comportant pas de matériel génétique ou comportant un élément non identifiable. GV : vésicule germinative ; GVBD : rupture de la vésicule germinative ; Pré MI-MII : lot regroupant tous les ovocytes classés depuis le stade pré métaphase jusqu'au stade métaphase II ; a : $p < 0,05$; b : $p < 0,001$.

Nombre d'ovocytes Lots	nombre total	dégénérés	non dégénérés	GV	GVBD	Pré MI-MII		
Témoin	388	102 26,3%	286 73,7%	107 37,4%	150 52,4%	29 10,2%		
				37,4%	62,60%			
dbAMPc	260	78 30,0%	182 70,0%	80 43,9%	92 50,5%	10 5,6%		
				43,9%	56,1%		a	
Forskoline	267	75 28,1%	192 71,9%	51 26,6%	132 68,7%	9 4,7%		
				26,6%	73,4%			b
Dénudés	318	101 31,8%	217 68,2%	43 19,8%	154 71,0%	20 9,2%		
				19,8%	80,2%		a	
RpAMPc	322	117 36,3%	205 63,7%	77 37,6%	94 45,8%	34 16,6%		
				37,6%	62,4%			
Total	1555	473 30,4%	1082 69,6%	358 23,0%	622 40,0%	102 6,6%		

Nous avons, par la suite, distingué deux points :

- le taux de reprise de méiose qui correspond au pourcentage d'ovocytes ayant été observés à des stades avancés (au-delà de la vésicule germinative). C'est ce taux qui varie de 56,1 % à 80,2 % selon les lots (Tableau 9, chiffres rouges).
- Et le taux de méiose avancée. Parmi les ovocytes ayant repris leur méiose (stade avancé par rapport à la vésicule germinative), il s'agit de déterminer le pourcentage d'ovocytes qui sont allés au-delà du stade GVBD (Tableau 10).

Tableau 10 : Taux de méiose avancée (pourcentage d'ovocytes ayant été observés à un stade plus avancé que le stade GVBD) en fonction du traitement.

Lots Stade	Témoin	dbAMPc	Forskoline	Dénudés	RpAMPc
GVBD	150	92	132	154	94
Au-delà de GVBD	29	10	9	20	34
% d'ovocytes observés à un stade au-delà de GVBD	16,2%	9,8%	6,4%	11,5%	26,6%

Lorsque l'effet des traitements est analysé, on constate que :

- Seule la dénudation augmente nettement la reprise de la méiose (80,2 % contre 62,6 % dans le groupe témoin, $p < 0,001$).
- Le lot traité au RpAMPc, visant à bloquer l'action de l'AMPc sur la PKA, n'a aucun effet significatif. Le taux de reprise de méiose est similaire au témoin, mais les ovocytes ayant repris leur méiose semblent atteindre les stades avancés (pré métaphase à métaphase II) en quantité importante (26,6 %, $p < 0,05$ par rapport au lot témoin, Tableau 10).
- Les traitements à la forskoline et au dbAMPc, pourtant prévus tous deux pour augmenter les niveaux d'AMPc, n'induisent pas les mêmes résultats ($p < 0,05$) et seule la forskoline semble avoir un effet positif ($p < 0,05$). Elle influence la reprise de méiose. Le dbAMPc quant à lui ne modifie pas cette reprise de méiose en comparaison avec le lot témoin.
- La dénudation ainsi que la forskoline ont un rôle dans la reprise de méiose mais n'améliorent pas la poursuite de méiose lorsque celle-ci est redémarrée (Tableau 10).
- Dans les groupes forskoline et dbAMPc, les taux d'ovocytes observés à des stades nucléaires plus avancés que la GVBD se sont révélés être plus faibles que dans le lot témoin (Tableau 10).

La modulation artificielle du niveau intra ovocytaire d'AMPc a montré que la dénudation mécanique avant culture avait un effet positif significatif sur les taux de reprise de méiose. L'utilisation du composé RpAMPc visant à bloquer l'action de l'AMPc sur la PKA n'a pas eu d'effet sur la reprise de méiose. Néanmoins, le composé RpAMPc semble avoir une influence sur l'avancée de la méiose lorsque celle-ci se poursuit.

Discussion

Discussion

Dans cette étude, nous avons cherché à approfondir les connaissances fondamentales concernant le contrôle de la reprise de méiose de l'ovocyte canin. Le but était de savoir si la modulation (positive ou négative) des niveaux d'AMPc pouvait améliorer les taux de maturation *in vitro* de la reprise de méiose jusqu'à la progression au stade métaphase II).

Les ovaires utilisés pour cette expérience sont issus de chiennes ovariectomisées alors qu'elles étaient en période de repos sexuel (anœstrus) ou bien en métœstrus. Nos ovocytes étaient donc *a priori* extraits de petits follicules, non préovulatoires, et leur compétence nucléaire de ce fait limitée. Cependant, afin de remédier partiellement à ce problème, nous avons choisi les ovocytes ayant atteint le diamètre minimal connu chez la chienne pour correspondre à l'acquisition de la compétence nucléaire (110 μm ; Otoi *et al.*, 2000).

Trois raisons principales expliquent qu'il soit difficile d'obtenir des ovocytes de follicules préovulatoires en grande quantité pour tester les milieux de culture : tout d'abord, le cycle de la chienne est long (avec un interœstrus d'au moins six mois) et des follicules préovulatoires ne sont présents que pendant trois à quatre jours par cycle. Ensuite, les chiennes répondent très mal aux différents traitements hormonaux visant à produire des superovulations, contrairement aux bovins par exemple. D'autre part, la récolte d'ovocytes sous échographie (ovum pick-up) est délicate du fait de la bourse ovarique très adipeuse qui entoure les ovaires dans cette espèce. Cette ponction folliculaire échoguidée des ovocytes reste encore à mettre au point chez la chienne.

Le nombre d'ovocytes que nous avons récoltés par ovaire a été très variable d'une chienne à l'autre. En moyenne une vingtaine d'ovocytes ont été récupérés par ovaire (de 10 à 100) mais seuls 30 à 50% de ces ovocytes se sont avérés être de bonne qualité. Par ailleurs nous avons travaillé sur des ovocytes de plus de 100 μm de diamètre et cette population d'ovocytes provient de follicules antraux dont les ovocytes ont déjà atteint 80% de leur taille finale (taille préovulatoire de 110 à 120 μm ; Reynaud *et al.*, 2004). Cette taille est également la taille minimale permettant une maturation *in vitro* (Hewitt et England, 1998 ; Otoi *et al.*, 2000).

La maturation ovocytaire *in vitro* n'est pas au point chez la chienne. Les rendements moyens (taux de métaphase II) sont de 10 % environ, contre 80 à 90 % chez les bovins par exemple (Hewitt et England, 1999 ; Yamada *et al.*, 1993 ; Saint-Dizier *et al.*, 2001). Afin d'améliorer les taux de maturation ovocytaire *in vitro*, de nombreuses études ont été réalisées. Les effets de plusieurs suppléments des milieux de culture ont été testés chez la chienne tels que différentes concentrations de sérum de veau fœtal (SVF ; Hewitt et England, 1998), de sérum de chienne en chaleur, des supplémentations en BSA, en gonadotrophines (FSH ou LH) ou encore en stéroïdes (œstradiol et/ou progestérone ; Hewitt et England, 1997, 1998 ; Nickson *et al.*, 1993). Plusieurs types de milieux de culture ont été également étudiés (SOF, TYH ; Yamada *et al.*, 1993). Cependant, étant donné le nombre de paramètres variant d'une expérience à l'autre (cycles naturels ou induits, supplémentations, milieux) il est difficile d'évaluer séparément l'importance de la qualité des milieux par rapport aux effets de l'origine des ovocytes.

Dans notre étude, nous avons travaillé avec un milieu de base (M199 additionné de 20% de SVF) déjà utilisé lors d'expériences précédentes au sein de notre équipe (Saint-Dizier *et al.*, 2001 et 2004). Ce milieu permet une bonne survie de l'ovocyte et des cellules de

granulosa et permet d'obtenir des taux de maturation comparables à ceux obtenus dans d'autres équipes internationales.

D'autre part la maturation *in vitro* chez la chienne est longue par rapport à ce qui est pratiqué dans d'autres espèces : le temps de culture ne doit pas être inférieur à quarante-huit heures (temps minimal *in vivo* pour que les ovocytes subissent leur maturation). De plus, les études menées précédemment présentent des taux de maturation nettement améliorés lorsque les cultures sont poursuivies pendant au moins quarante-huit à soixante-douze heures (Robertson *et al.*, 1992 ; Yamada *et al.*, 1992 ; Hewitt *et al.*, 1998) d'où notre choix de mettre nos ovocytes en culture pendant soixante-douze heures. Par ailleurs, aucune amélioration des résultats n'est observée si on allonge le temps de culture (Saint-Dizier *et al.*, 2001 ; Hewitt *et al.*, 1998). Cette lenteur de la maturation de l'ovocyte canin (les meilleurs pourcentages de maturation sont obtenus pour quarante-huit à quatre-vingt-seize heures de culture ; Robertson *et al.*, 1992 ; Yamada *et al.*, 1992 ; Hewitt *et al.*, 1998) apparaît surprenante quand il suffit de vingt-quatre heures chez la plupart des mammifères (Echegaray *et al.*, 1997).

Certains auteurs ont réalisé leur culture sous des gouttelettes lipidiques prévenant ainsi toute déshydratation des cultures ainsi que toute contamination de ces dernières (Luvoni *et al.*, 2003). Dans notre cas, nous avons opté pour une solution différente qui consiste à déposer un à deux millilitres d'eau pure entre les puits de nos boîtes afin de limiter cette déshydratation. Par ailleurs nous travaillons sous la hotte à flux laminaire dans des conditions stériles afin de limiter au maximum tout risque de contamination.

Après la phase de maturation *in vitro*, les ovocytes ont été dénudés, colorés puis observés au microscope confocal. 7,5 % des ovocytes ont été perdus pendant ces phases de dénudation, fixation et coloration. Les pertes pendant la dénudation s'expliquent en partie par le fort attachement du cumulus aux cellules ovocytaires via les jonctions communicantes traversant la zone pellucide. De nombreux va-et-vient des complexes ovocyte-cumulus sont nécessaires au sein des pipettes à bouche afin de dénuder les ovocytes, d'où un risque de lyse. Cependant, au contraire des complexes des autres espèces, la dénudation par pipetage est la seule solution disponible pour les complexes de l'espèce canine car une digestion enzymatique de la zone pellucide ne permet pas de détacher toutes les cellules de granulosa de l'ovocyte. L'utilisation de hyaluronidases, traitement classiquement utilisé chez les souris et les lapins, ne produit aucun détachement de ces cellules chez le chien ou transforme le cumulus en une masse gélatineuse encore plus délicate à manipuler.

Après la dénudation, les ovocytes ont dû être colorés puis observés au microscope confocal. Cette technique est indispensable à la détermination du stade nucléaire chez le Chien. En effet, dans l'ovocyte canin, la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques sombres dans le cytoplasme rend l'observation de la chromatine délicate. La microscopie conventionnelle couplée à la coloration au Hoechst, préalablement utilisée pour déterminer le stade de la maturation des ovocytes, comme cela est classiquement pratiqué pour les ovocytes d'autres espèces conduisait à l'obtention d'un fort pourcentage d'ovocytes au matériel nucléaire non identifiable (10-40% ; Hewitt *et al.*, 1998 ; Saint-Dizier *et al.*, 2004). Ce manque de précision dans la détermination des stades de maturation introduisait de ce fait un biais important. La microscopie confocale constitue donc un atout considérable puisqu'elle permet la détermination du stade nucléaire pour 98,6% des ovocytes contre seulement 69,5% pour le Hoechst couplé à la microscopie conventionnelle (Saint-Dizier *et al.*, 2004).

Après les phases de maturation et d'observation, les taux de dégénérescence et de maturation ont été analysés. Notre étude a montré un taux de dégénérescence en cours de

culture de l'ordre de 30 %. Ce taux, qui est assez élevé par rapport aux taux observés dans les autres espèces (0 % chez les bovins par exemple), est classiquement obtenu chez la chienne (Cinone *et al.*, 1992 ; Nickson *et al.*, 1993 ; Hewitt *et al.*, 1998 ; Saint-Dizier *et al.*, 2001). Cette dégénérescence forte est encore inexpliquée mais pourrait être la conséquence de conditions de culture suboptimales. Il est également possible qu'une partie des ovocytes sélectionnés soit trop immatures pour pouvoir reprendre leur méiose et survivre en culture. Il est par contre étonnant de constater que la dénudation des ovocytes avant la mise en maturation n'augmente pas le taux de dégénérescence des ovocytes. Les cellules du cumulus jouent en effet un rôle trophique capital dans les autres espèces (Brower et Schultz, 1982). Les taux de méiose *in vitro* obtenus chez la chienne sont faibles. Dans le groupe témoin de notre étude, nous avons obtenu 10,2 % de prémétaphases I-métaphases II. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus par plusieurs équipes (Saint-Dizier *et al.*, 2001 ; Yamada *et al.*, 1993 ; Hewitt *et al.*, 1998 ; Hewitt et England, 1999 ; Otoi *et al.*, 2002). Ce taux varie en effet selon les auteurs de 6,4 (Cinone *et al.*, 1992) à 40% (Nickson *et al.*, 1993) au bout de soixante-douze heures de culture *in vitro* alors que ce taux atteint 90% chez les bovins (Echegaray *et al.*, 1997).

Il résulte de ces faibles taux de maturation qu'il est nécessaire de travailler sur un grand nombre d'ovocytes pour obtenir des résultats interprétables.

Notre étude *in vitro* avait pour but d'évaluer le rôle de l'AMPC dans le contrôle de la reprise de la méiose chez la chienne, celui-ci étant une molécule-clé pour l'ovocyte de nombreuses espèces. Nous avons donc cherché à moduler les niveaux d'AMPC présents dans l'ovocyte canin pendant la maturation. Nous avons testé quatre traitements différents. Deux traitements (dbAMPC et forskoline), qui ont été testés à des concentrations précédemment utilisées dans d'autres espèces, avaient comme conséquence d'induire une augmentation de l'AMPC intra ovocytaire. Le troisième traitement (RpAMPC) visait à bloquer l'action de l'AMPC sur la PKA intra ovocytaire soit mimer une chute du niveau de l'AMPC en supposant que l'AMPC n'activait pas une autre voie métabolique. En effet, il est envisageable qu'un tel traitement est comme conséquence une augmentation de la concentration de l'AMPC. Quant au dernier, la dénudation, le but était de déterminer si les ovocytes pouvaient survivre en maturation sans leurs cellules de granulosa et si le fait d'enlever les cellules entourant l'ovocyte, et donc d'enlever un éventuel signal inhibiteur, pouvait stimuler la reprise méiotique.

Nous avons utilisé les substances à des doses dont l'efficacité a déjà été montrée lors d'autres études.

La dose de dbAMPC (2mM) est cohérente avec les doses précédemment testées et ayant induit des effets ovocytaires dans d'autres espèces (souris : Salustri et Siracusa, 1983 ; vache : Guixue, 2001 ; Sirard, 1990) et chez le chien (Hanna *et al.*, 2002 ; Songsasen *et al.*, 2003). Ce composé avait déjà été testé sur l'ovocyte canin mais les résultats rapportés dans la littérature sur les complexes cumulo-ovocytaires de chiens concernaient des nombres plus faibles d'ovocytes traités et à des temps de culture permettant difficilement d'appréhender correctement les taux de maturation avancée (métaphase notamment ; Hanna *et al.*, 2002 ; Songsasen *et al.*, 2003).

De même, la dose de forskoline (100mM) que nous avons utilisée dans notre étude avait déjà été testée dans d'autres espèces, notamment le rat (Dekel *et al.*, 1984) et les bovins (Bilodeau *et al.*, 1993).

La dose de RpAMPC (1mM) quant à elle, avait déjà été utilisée chez la souris (Eppig en 1991, Leonardsen *et al.*, 2000) et avait montré une amélioration du taux de reprise de méiose à la dose que nous avons utilisée.



Ces composés ont donc été ajoutés au milieu de maturation. Nous nous sommes placés dans les meilleures conditions pour qu'ils provoquent des variations de la concentration d'AMPc intraovocytaire. Cependant, il reste à valider leur efficacité intraovocytaire réelle : il est prévu d'effectuer des dosages de l'AMPc intraovocytaire chez les ovocytes cultivés en présence de dbAMPc, forskoline et RpAMPc et dans le milieu de base non supplémenté (méthode développée dans Bornslaeger et Schultz, 1985).

Le lot des ovocytes dénudés présente un taux d'ovocytes ayant repris leur méiose significativement supérieur à celui du lot témoin. Les cellules de granulosa ont donc un rôle dans l'inhibition de la reprise de méiose. Celui-ci ne semble pas passer par l'AMPc puisque le traitement par le RpAMPc n'a aucun effet sur le taux de reprise de la méiose. On ne peut écarter la possibilité selon laquelle l'action mécanique même de dénudation de l'ovocyte à la pipette puisse constituer un stimulus à part entière, en induisant par exemple une entrée de calcium.

Néanmoins, la dénudation des ovocytes a probablement induit des modifications de l'organisation de la zone pellucide et peut-être induit un durcissement de la zone pellucide ("zona hardening"). Ce type de changement a des inconvénients importants. En effet, les ovocytes maturés sont normalement destinés à être mis en fécondation *in vitro*. Or le phénomène de "zona hardening" peut compromettre le processus normal de fécondation et la dénudation ne peut donc pas être retenue comme un bon moyen de maturation *in vitro*.

Deux traitements visant quant à eux à augmenter le niveau d'AMPc ont été testés : dbAMPc ou forskoline. Nous avons voulu tester l'influence d'une augmentation de la concentration d'AMPc car lors d'une étude préalablement menée dans notre laboratoire, nous avons mis en évidence chez la chienne un rôle positif de la pénétration de spermatozoïdes dans la reprise de la méiose. Or ce type d'effet est également observable chez certains mollusques tels que *Spisula solidissima* (Yi *et al.*, 2002), chez lesquels, contrairement aux autres mammifères habituellement étudiés, l'augmentation de l'AMPc a un effet positif sur la reprise de méiose. Il était donc possible que nos traitements augmentant l'AMPc induisent un taux de reprise plus important. C'est effectivement le cas pour la forskoline, mais pas pour le dbAMPc, qui n'a eu aucun effet. Or il semblerait que la forskoline agisse non seulement en activant l'adénylate cyclase (d'où l'augmentation du niveau d'AMPc) mais également sur le niveau de calcium intra ovocytaire (Sigma, Annexe 5). L'amélioration du taux de reprise de la méiose par la forskoline pourrait donc ne pas passer par l'AMPc mais par l'activation d'une voie calcique.

La comparaison des taux de poursuite de la méiose (ovocytes observés aux stades au-delà de la GVBD par rapport à ceux observés en GVBD) montre que l'apport de RpAMPc améliore considérablement le nombre d'ovocytes observés à des stades avancés. Le RpAMPc n'influence donc pas la reprise de la méiose (passage VG-GVBD) mais une fois que celle-ci est redémarrée, alors il agit sur la poursuite de celle-ci. Le lot des ovocytes dénudés montre l'inverse, à savoir que ce traitement influence la reprise de méiose mais n'apporte rien de plus que le lot témoin en matière de poursuite de la méiose une fois celle-ci entamée. Les cellules de la granulosa semblent donc ne contrôler que l'entrée en méiose elle-même. Le traitement à base de forskoline montre quant à lui une diminution significative de la poursuite de méiose par rapport au lot témoin (6,4 % d'ovocytes observés à des stades plus avancés que la GVBD contre 16,2 % pour le lot témoin). Cette diminution peut s'expliquer par le rôle exercé par la forskoline sur le niveau d'AMPc : en effet, en augmentant la synthèse d'AMPc, la forskoline agirait via la protéine kinase AMPc dépendante (PKA) sur le MPF en maintenant la phosphorylation de ce dernier gênant de ce fait la poursuite de la méiose et ce malgré son effet positif du départ. La même explication peut être émise pour le traitement par le dbAMPc.

Conclusion

La lutéinisation préovulatoire ainsi que l'ovulation d'ovocytes bloqués en prophase de la première division méiotique, et non en métaphase II comme c'est le cas pour la plupart des mammifères, font des chiennes des modèles particuliers en matière de reproduction animale. Cependant, à l'heure actuelle nous n'avons que peu de connaissances de la physiologie reproductrice de cette espèce. Par ailleurs, les difficultés rencontrées jusqu'à présent au cours de la maturation ovocytaire *in vitro* rendent d'autant plus délicate l'acquisition de nouvelles données dans ce domaine.

Le but à long terme de l'étude que nous avons menée était d'améliorer les conditions de maturation *in vitro* avec pour objectif l'augmentation du pourcentage d'ovocytes prêts à être fécondés (bloqués en métaphase de la deuxième division méiotique). Plus particulièrement, il s'agissait de mieux comprendre la régulation de la méiose ovocytaire canine, afin de choisir ensuite de façon pertinente des complémentations du milieu de maturation. Notre travail a exploré le rôle des cellules de granulosa et de l'AMPc dans la méiose canine, compte-tenu de leur importance centrale connue dans les autres espèces mammifères.

Globalement, notre étude a montré que l'AMPc n'a pas l'effet majeur observé chez les autres mammifères. Si ce résultat était confirmé par des dosages, cela suggérerait donc que l'AMPc ne serait pas la molécule régulatrice centrale de la méiose chez la chienne.

Nos résultats suggèrent un rôle possible du calcium dans la reprise de méiose canine. Il serait donc intéressant de réaliser d'autres investigations qui permettraient de mieux comprendre l'action du calcium dans cette reprise (en modulant notamment le niveau intra ovocytaire de ce dernier via des ionophores calciques (Sedmikova *et al.*, 2003), des chélateurs calciques, et en contrôlant des pulses calciques en chambre micro-fluidique (Ozil, 1990). Il serait aussi intéressant d'essayer de coupler l'action du calcium à celle du RpAMPc qui semble intervenir plus tardivement dans cette cascade de réactions aboutissant au blocage des ovocytes en métaphase II.

Afin de préciser le rôle des communications entre l'ovocyte et les cellules du cumulus, et notamment des jonctions gap, il serait enfin intéressant d'envisager l'étude de l'effet inhibiteur de l'heptanol (par exemple) sur les jonctions.

Enfin, le fait que la maturation *in vitro* de l'ovocyte canin ait lieu pendant une période longue et surtout que certains stimuli puissent induire une reprise de méiose sans permettre la progression, tandis que d'autres traitements (RpAMPc) aideraient la progression suggère finalement le besoin probable de recourir à des milieux séquentiels variant selon le stade de maturation.

La poursuite du travail réalisé ici permettra nous l'espérons à une meilleure compréhension des mécanismes régulant la méiose ovocytaire chez la chienne et ainsi l'amélioration du rendement de maturation *in vitro*. Cette étape sera décisive pour réaliser ensuite efficacement la fécondation *in vitro* et la production d'embryons *in vitro*, biotechnologie de la reproduction ouvrant de nombreuses perspectives en reproduction canine.

Références bibliographiques

- ARAKI K, NAITO H, HARAGUCHI S, SUZUKI R, YOKOYAMA M, INOUE M, AIZAWA S, TOYODA Y, SATO E. (1996) Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes : activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol. Reprod.*, **55**,1315-24.
- BILODEAU S, FORTIER MA, SIRARD MA. (1993) Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and cumulus-enclosed bovine oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **97**, 5-11.
- BORNSLAEGER EA, SCHULTZ RM. (1985) Regulation of mouse oocyte maturation : effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biol. Reprod.*, **33**, 698-704.
- BROWER PT, SCHULTZ R. (1982) Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev. Biol.*, **90**, 144-153.
- CAMPBELL NA. (1995) La méiose et les cycles de développement sexués, *In : N.A. Campbell, Biology*. 3rd ed. Philadelphia : The Benjamin/Cummings, 1190.
- CARROLL J, SWANN K, WITTINGHAM D, WHITAKER M. (1994) Spatiotemporal dynamics of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development*, **120**, 3507-3517.
- CECCONI S, COLONNA R. (1996) Influence of granulosa cells and of different somatic cell types on mammalian oocyte development *in vitro*. *Zygote*, **4**, 305-307.
- CHEN L, RUSSELL PT, LARSEN WJ. (1993) Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.*, **34**, 87-93.
- CHESNEL F, EPPIG JJ. (1995) Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Mol. Reprod. Dev.*, **40**, 503-508.
- CINONE M, GHNEIM A, CAIRA M, DELL'AQUILA M, MINOIA P. (1992) Collection and maturation of oocytes in the bitch. *In : Proc. 12th Inter. Congress Anim. Reprod.*, The Hague, Netherlands, August 1992, **4**, 1767-1769.
- CONCANNON PW, McCANN JP, TEMPLE M. (1989) Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **39**, 3-25.
- CONTI M, ANDERSEN CB, RICHARD F, MEHATS C, CHUN SY, HORNER K, JIN C, TSAFRIRI A. (2002) Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **187**, 153-159.

- DEDIEU T, GALL L, CROZET N, SEVELLEC C, RUFFINI S. (1996) Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol. Reprod. Dev.*, **45**, 351-358.
- DEKEL N, ABERDAM E, SHERIZLY I. (1984) Spontaneous maturation *in vitro* of cumulus-enclosed rat oocytes is inhibited by forskolin. *Biol. Reprod.*, **31**, 244-250.
- DE SMEDT V, CROZET N, GALL L. (1994) Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J. Exp. Zool.*, **269**, 128-139.
- DOAK RL, HALL A, DALE HE. (1967) Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *J. Reprod. Fertil.*, **13**, 51-58.
- DONAHUE R. (1968) Maturation of the mouse oocyte *in vitro*. 1. Sequence and timing of nuclear progression. *J. Exp. Zool.*, **169**, 237-250.
- DOWNS SM, HUNZICKER-DUNN M. (1995) Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. *Dev. Biol.*, **172**, 72-85.
- DOWNS SM, DANIEL SA, BORNSLAEGER EA, HOPPE PC, EPPIG JJ. (1989) Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines : modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete Res.*, **23**, 323-34.
- ECHEGARAY A, MARTINEZ F, GIL L. (1997) La maturation *in vitro* des ovocytes chez les ruminants. *Rec. Med. Vet.*, **173**, 19-33.
- EPPIG JJ. (1991) Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed *in vitro* from preantral follicles. *Biol. Reprod.*, **45**, 824-830.
- EVANS EI. (1933) The transport of spermatozoa in the dog. *Am. J. Phys.*, **105**, 287-293.
- FOOTE WD, THIBAUT C. (1969) Recherches expérimentales sur la maturation *in vitro* des ovocytes de truie et de veau. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **9**, 329-349.
- GALL L, DE SMEDT V, CROZET N, RUFFINI S, SEVELLEC C. (1996) Meiotically incompetent and competent goat oocytes : timing of nuclear events and protein phosphorylation. *Theriogenology*, **46**, 825-835.
- GALLICANO GI, McGAUGHEY RW, CAPCO DG. (1994) Ontogeny of the cytoskeleton during mammalian oogenesis. *Microsc. Res. Tech.*, **27**, 134-144.
- GIER HT. (1950) Early embryology of the dog. *Anat. Rec.*, **108**, 561-564.

- GOREN S, DEKEL N. (1994) Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated p34cdc2 is independent of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *Biol. Reprod.*, **51**, 956-962.
- GOREN S, ORON Y, DEKEL N. (1990) Rat oocyte maturation : role of calcium in hormone action. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **72**, 131-138.
- GUIXUE Z, LUCIANO AM, COENEN K, GANDOLFI F, SIRARD MA. (2001) The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. *Theriogenology*, **55**, 1733-1743.
- HANNA CB, LONG CR, WESTHUSIN, KRAEMER DC. (2002) Arresting canine oocytes in the germinal vesicle phase of meiosis. *Theriogenology*, **57**, 722.
- HASHIMOTO N, KISHIMOTO K. (1988) Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.*, **126**, 242-252.
- HEWITT DA, ENGLAND GC. (1997) Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **51**, 83-91.
- HEWITT DA, ENGLAND GC. (1998) The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology*, **49**, 957-966.
- HEWITT DA, ENGLAND GC. (1999) Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. *Vet. Rec.*, **144**, 237-9.
- HEWITT DA, WATSON PF, ENGLAND GC. (1998) Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, **49**, 1083-1101.
- HOLST PA, PHEMISTER RD. (1971) The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biol. Reprod.*, **5**, 194-206.
- HOMA ST. (1991) Neomycin, an inhibitor of phosphoinositide hydrolysis, inhibits the resumption of bovine oocyte spontaneous meiotic maturation. *J. Exp. Zool.*, **258**, 95-103.
- HOMA ST. (1995) Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol. Reprod. Dev.*, **40**, 122-134.
- HOMA ST, CARROLL J, SWANN K. (1993) The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum. Reprod.*, **8**, 1274-1280.
- HUARTE J, BELIN D, VASSALLI A, STRICKLAND S, VASSALLI JD. (1987) Meiotic maturation of mouse oocytes triggers the translation and polyadenylation of dormant tissue-type plasminogen activator mRNA. *Genes Dev.*, **1**, 1201-1211.

- HUE I, DEDIEU T, HUNEAU D, RUFFINI S, GALL L, CROZET N. (1997) Cyclin B1 expression in meiotically competent and incompetent goat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, **47**, 222-228.
- JOHNSTON SD, KUSTRITZ MVR, OLSON PN. (2001) Canine and feline theriogenology. Eds W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 16-31.
- KIDDER GM, MHAWI AA. (2002) Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, **123**, 613-620.
- KOTSUJI F, KUBO M, TOMINAGA T. (1994) Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, **100**, 151-156.
- LEONARDBSEN L, WIERSEMA A, BALTSSEN M, BYSKOV AG, YDING ANDERSEN C. (2000) Regulation of spontaneous and induced resumption of meiosis in mouse oocytes by different intracellular pathways. *J. Reprod. Fert.*, **120**, 377-383.
- LONERGAN P, KHATIR H, CAROLAN C, MERMILLOD P. (1997) Bovine blastocyst production *in vitro* following inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *J. Reprod. Fertil.*, **109**, 355-365.
- LUCIANO AM, MODINA S, VASSENA R, MILANESI E, LAURIA M, GANDOLFI F. (2004) Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. *Biol. Reprod.*, **70**, 465-72.
- LUVONI GC, CHIGIONI S, ALLIEVI E, MACIS D. (2003) Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod. Dom. Anim.*, **38**, 410-414.
- MAHI CA, YANAGIMACHI R. (1976) Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, **196**, 189-96.
- MARO B, KUBIAK J, GUETH C, DE PENNART H, HOULISTON E, WEBER M, ANTONY C, AGHION J. (1990) Cytoskeleton organization during oogenesis, fertilization and preimplantation development of the mouse. *Int. J. Dev. Biol.*, **34**, 127-137.
- MARSELOO N, FONTBONNE A, BASSU G, RIVIERE S, LEBLANC B, RAULT D, BIOURGE V, CHASTANT-MAILLARD S. (2004) Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. In: *Proc. 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. Sao Paulo, Brasil, 75-77.
- MASUI Y, MARKERT CL. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, **177**, 129-146.

- MC GAUGHEY RW, RACOWSKY C, RIDER V, BALDWIN K, DEMARAIS AA, WEBSTER SD. (1990) Ultrastructural correlates of meiotic maturation in mammalian oocytes. *J. Electron Microsc. Tech.*, **16**, 257-280.
- MERMILLOD P, LE LANNOU D. (1999) Maturation ovocytaire *in vivo* et *in vitro* chez les mammifères. In : HAMAMAH S., MENEZO Y., editors. *Ovocyte et embryon de la physiologie à la pathologie*. 2nd ed. Paris : ellipses/édition marketing S.A., 94-122.
- MOTLIK J, FULKA J, FLECHON JE. (1986) Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, **76**, 31-7.
- MURRAY A. (1995) Cyclin ubiquitination : the destructive end of mitosis. *Cell*, **81**, 149-152.
- NICKSON DA, BOYD JS, ECKERSALL PD, FERGUSON JM, HARVEY MJ, RENTON JP. (1993) Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **47**, 231-240.
- OTOI T, FUJII M, TANAKA M, OOKA A, SUZUKI T. (2000) Oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*, **54**, 535-542.
- OTOI T, WILLINGHAM L, SHIN T, KRAEMER DC, WESTHUSIN M. (2002) Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction*, **124**, 775-81.
- OZIL JP. (1990) The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, **109**, 117-127.
- PARRISH JJ, KIM CI, BAE IH. (1992) Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. *Theriogenology*, **38**, 277-296.
- PEARSON OP, ENDERS RK. (1943) Ovulation, maturation and fertilization in the fox. *Anat. Rec.*, **85**, 69-83.
- PINCUS G, ENZMANN EV. (1935) The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.*, **62**, 665-675.
- REYNAUD K. (2003) Le dialogue ovocyte-granulosa au cours de la folliculogénèse. *Med. Ther. Endocrinol. Reprod.*, **5**, 85-93.
- REYNAUD K, NOGUIERA D, CORTVRINDT R, KURZAWA R, SMITZ J. (2001) Confocal microscopy : principles and applications to the field of reproductive biology. *Folia Histochem. Cytobiol.*, **39**, 75-85.

- REYNAUD K, SAINT-DIZIER M, CHASTANT-MAILLARD S. (2004) *In vitro* maturation and fertilization of canine oocytes. In : H. Schatten (eds.), *Methods Mol. Biol.*, Germ Cell Protocols, 53. Humana Press, 255-272.
- REYNAUD K, FONTBONNE A, MARSELOO N, DUMASY M, CHASTANT-MAILLARD S. (2005) *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*. (soumis)
- RICHARD F, SIRARD MA. (1993) The effect of co-culture of follicular components with bovine oocytes on meiotic resumption. *Biol. Reprod.*, **48**, 123.
- ROBERTSON J, SRSEN V, KING W. (1992) Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured *in vitro*. *12th Int. Congress Anim. Reprod*, The Hague, Netherlands, August 1992, **4**, 1808-1810.
- SAINT-DIZIER M, RENARD JP, CHASTANT-MAILLARD S. (2001) Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction.*, **121**, 97-105.
- SAINT-DIZIER M, REYNAUD K, CHASTANT-MAILLARD S. (2004) Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, **68**, 205-212.
- SALUSTRI A, SIRACUSA G. (1983) Metabolic coupling, cumulus expansion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured *in vitro* in the presence of FSH or dbAMPC, or stimulated *in vivo* by hCG. *J. Reprod. Fert.*, **68**, 335-341.
- SALUSTRI A, HASCALL VC, CAMAIONI A, YANAGISHITA M. (1993) Oocyte-granulosa cell interactions. In : "The Ovary" EY Addashi and PCK Leung (eds), Raven Press Ltd, New York, p209.
- SATO E. (1992) Inhibition of germinal vesicle breakdown of isolated cumulus-free mouse oocytes in culture by a calcium inhibitor, TMB-8. *J. Vet. Med. Sci.*, **54**, 605-607.
- SEDMIKOVA M, BURDOVA J, PETR J, ETRYCH M, ROZINEK J, JILEK F. (2003) Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. *Theriogenology*, **60**, 1609-1620.
- SIMON AM, GOODENOUGH DA, LI E, PAUL DL. (1997) Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, **385**, 525-929.
- SIRACUSA G, DE FELICI M, SALUSTRI A. Meiotic maturation of the mammalian oocyte. *J. Reprod. Fert.*, **68**.
- SIRARD MA. (1990) Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. *Theriogenology*, **33**, 757-767.

- SONGSASEN N, YU I, GOMEZ M, LEIBO SP. (2003) Effects of meiosis-inhibiting agents and equine chorionic gonadotropin on nuclear maturation of canine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, **65**, 435-445.
- SORENSEN RA, CYERT MS, PEDERSEN RA. (1985) Active maturation promoting factor is present in mature mouse oocytes. *J. Cell. Biol.*, **100**, 1637-1640.
- SORENSEN RA, WASSARMAN PM. (1976) Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.*, **50**, 531-6.
- STRICKLAND S, HUARTE J, BELIN D, VASSALLI A, RICKLES RJ, VASSALLI JD. (1988) Antisense RNA directed against the 3' noncoding region prevents dormant mRNA activation in mouse oocytes. *Science*, **241**, 680-684.
- SUTOVSKY P, FLECHON JE, FLECHON B, MOTLIK J, PEYNOT N, CHESNE P, HEYMAN Y. (1993) Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol. Reprod.*, **49**, 1277-1287.
- SZOLLOSI D, CALARCO PG, DONAHUE RP. (1972) The nuclear envelope : its breakdown and fate in mammalian oogonia and oocytes. *Anat. Rec.*, **174**, 325-340.
- TSAFRIRI A, CHUN SY, ZHANG R, HSUEH AJW, CONTI M. (1996) Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells : studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev. Biol.*, **178**, 393-402.
- TSUTSUI T. (1975) Studies on the reproduction in the dog. V. On cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct. *Jpn. J. Anim. Reprod.* **21**, 70-75.
- TSUTSUI T. (1989) Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **39**, 269-275.
- VAN DER STRICHT O. (1923) Etude comparée des ovules de mammifères aux différentes périodes de l'ovogenèse. *Arch. Biol.*, **33**, 229-300.
- VERLHAC MH, DE PENNART H, MARO B, COBB MH, CLARKE HJ. (1993) MAP kinase becomes activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.*, **158**, 330-340.
- WASSARMAN PM, LETOURNEAU GE. (1976) RNA synthesis in fully-grown mouse oocytes. *Nature*, **261**, 73-74.
- WIESEN J, MIDGLEY A. (1994) Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia. *Biol. Reprod.*, **50**, 336-348.
- WRIGHT C, BECKER D, LIN J, WARNER A, HARDY K. (2001) Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary : connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction*, **121**, 77-88.

- YAMADA S, SHIMAZU Y, KAWAJI H, NAKAZAWA M, NAITO K, TOYODA Y. (1992) Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.*, **46**, 853-858.
- YAMADA S, SHIMAZU Y, KAWANO Y, NAKAZAWA M, NAITO K, TOYODA Y. (1993) In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **47**, 227-9.
- YI JH, LEFIEVRE L, GAGNON C, ANCTIL M, DUBE F. (2002) Increase of cAMP upon release from prophase arrest in surf clam oocytes. *J. Cell Sci.*, **115**, 311-320.
- ZERNICKA-GOETZ M, VERLHAC MH, GERAUD G, KUBIAK JZ. (1997) Protein phosphatases control MAP kinase activation and microtubule organization during rat oocyte maturation. *Eur. J. Cell Biol.*, **72**, 30-38.
- ZHANG L, JIANG S, WOZNIAK PJ, YANG X, GODKE RA. (1995) Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development. *Mol. Reprod. Dev.*, **40**, 338-344.

Annexes

Annexe 1

Composition du PBS (Sigma)

Solution Saline Avec Tampon Phosphate (PBS) ¹					
	Réf.	20012 1X liquide g/L	10010 1X liquide g/L	70013 10X liquide g/L	70011 10X liquide g/L
Composants					
SELS INORGANIQUES :					
KH ₂ PO ₄		0,21	0,144	2,10	1,44
NaCl		9,00	9,00	90,00	90,00
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O		0,726	0,795	7,26	7,95

Annexe 2

Composition du milieu de base M199 (Sigma)

Milieu 199 ¹						
	Réf.	31153 1X Liquide mg/L	21183 10X Liquide mg/L	31150 1X Liquide mg/L	21180 10X Liquide mg/L	41150 1X Liquide mg/L
SELS INORGANIQUES :	Composants					
	CaCl ₂ • 2H ₂ O	264,00	2640,00	264,00	2640,00	264,00
	Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	0,70	7,00	0,70	7,20	0,70
	KCl	400,00	4000,00	400,00	4000,00	400,00
	MgSO ₄ • 7H ₂ O	200,00	2000,00	200,00	2000,00	200,00
	NaCl	6800,00	68000,00	6800,00	68000,00	6800,00
	NaHCO ₃	1250,00	—	2200,00	—	2200,00
	NaH ₂ PO ₄ • 2H ₂ O	140,00	1400,00	158,00	1580,00	158,00
AUTRES COMPOSANTS :	Sulphate d'Adénine	10,00	100,00	10,00	100,00	10,00
	Adénosine-5-triphosphate	1,00	10,00	1,00	10,00	1,00
	Adénosine-5-phosphate	0,20	2,00	0,20	2,00	0,20
	Cholestérol	0,20	2,00	0,20	2,00	0,20
	2-désoxy-D-ribose	0,50	5,00	0,50	5,00	0,50
	D-Glucose	1000,00	10000,00	1000,00	10000,00	1000,00
	Glutathione (réduit)	0,05	0,50	0,05	0,50	0,05
	Guanine	0,30	3,00	0,30	3,00	0,30
	Hypoxanthine	0,30	3,00	0,30	3,00	0,30
	Rouge de Phénol	20,00	200,00	20,00	200,00	20,00
	Ribose	0,50	5,00	0,50	5,00	0,50
	Acétate Sodium • 3H ₂ O	83,00	830,00	83,00	830,00	83,00
	Thymine	0,30	3,00	0,30	3,00	0,30
	Tween 80 ^a	20,00	200,00	20,00	200,00	20,00
	Uracil	0,30	3,00	0,30	3,00	0,30
	Xanthine	0,30	3,00	0,30	3,00	0,30
ACIDES AMINES :	L-Alanine	25,00	250,00	25,00	250,00	25,00
	L-Arginine • HCl	70,00	700,00	70,00	700,00	70,00
	Acide L-Aspartique	30,00	300,00	30,00	300,00	30,00
	L-Cystéine HCl	0,10	1,00	0,10	1,10	0,10
	L-Cystine	20,00	200,00	20,00	200,00	20,00
	Acide DL-Glutamique	133,00	1330,00	133,00	1330,00	133,00
	L-Glutamine	100,00	1000,00	100,00	1000,00	—
	L-Alanyl-L-Glutamine	—	—	—	—	148,50
	Glycine	50,00	500,00	50,00	500,00	50,00
	L-Histidine HCl • H ₂ O	21,88	218,80	21,88	218,00	21,88
	L-Hydroxyproline	10,00	100,00	10,00	100,00	10,00
	L-Isoleucine	40,00	400,00	40,00	400,00	40,00
	L-Leucine	60,00	6000,00	60,00	6000,00	60,00
	L-Lysine • HCl	70,00	700,00	70,00	700,00	70,00
	L-Méthionine	15,00	150,00	15,00	150,00	15,00
	L-Phénylalanine	25,00	250,00	25,00	250,00	25,00
	L-Proline	40,00	400,00	40,00	400,00	40,00
	L-Sérine	25,00	250,00	25,00	250,00	25,00
	L-Thréonine	30,00	300,00	30,00	300,00	30,00
	L-Tryptophane	10,00	100,00	10,00	100,00	10,00
	L-Tyrosine	40,00	400,00	40,00	400,00	40,00
	L-Valine	25,00	250,00	25,00	250,00	25,00
VITAMINES :	Acide Ascorbique	0,05	0,50	0,05	0,50	0,05
	Phosphate-d'α-Tocophérol (sel disodique)	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01
	D-Biotine	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01
	Calciférol	0,10	1,00	0,10	1,00	0,10
	Pantothénate de Calcium D	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01
	Chlorure de Choline	0,50	5,00	0,50	5,00	0,50
	Acide Folique	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01
	D-Inositol	0,05	0,50	0,05	0,50	0,05
	Ménadione	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01
	Niacine	0,025	0,25	0,025	0,30	0,025
	Niacinamide	0,025	0,25	0,025	0,30	0,025
	Acide Para-aminobenzoïque	0,05	0,50	0,05	0,50	0,05
	Pyridoxal HCl	0,025	0,25	0,025	0,30	0,025
	Pyridoxine HCl	0,025	0,25	0,025	0,30	0,025
	Riboflavine	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01
	Thiamine HCl	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01
	Vitamine A (acétate) ¹	0,10	1,00	0,10	1,00	0,10

1. Morgan, Morton and Parker (1950) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 1.

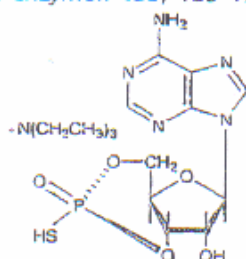
a. Valeurs établies par le "Tissue Culture Standards Committee".

Tween 80^a est une marque déposée de I.C.I. Americas Inc.

Annexe 3

Caractéristiques physiques, chimiques et biologiques du RpAMPc (Sigma)

A-165 -20°C	Rp-Adenosine 3',5'-cyclic mono-	1 mg	100.70	€
	phosphorothioate triethy-	5 mg	354.20	
	lammonium salt	10 mg	664.20	
Rp-cAMPS triethylammonium salt; Rp-Cyclic 3',5'-hydrogen phosphorothioate adenosine triethylammonium salt [161308-33-4] C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₅ PS-C ₆ H ₁₆ N FW 446.5 solid				
Rp-Diastereomer of adenosine-3',5'-cyclic monophosphothioate. Specific membrane-permeable inhibitor of activation by cAMP of cAMP-dependent protein kinase I and II; resistant toward cyclic nucleotide phosphodiesterases; blocks cAMP-mediated effects in numerous systems. Extremely hygroscopic. Store desiccated.				
Color. white				
Solubility				
water. 10 mg/ml				
λ_{max} 258 nm				
Ref.: 1. Rothermel et al., Inhibition of glucagon-induced glycogenolysis in isolated rat hepatocytes by the Rp diastereomer of adenosine cyclic 3'5'-phosphorothioate. <i>J. Biol. Chem.</i> 259 , 8151-8155 (1984)				
2. Wang et al., Regulation of kainate receptors by cAMP-dependent protein kinase and phosphatases. <i>Science</i> 253 , 1132-1135 (1991)				
3. Parker Botelho et al., cAMP analog antagonists of cAMP action. <i>Meth. Enzymol.</i> 159 , 159-172 (1988)				



Annexe 4

Caractéristiques physiques, chimiques et biologiques du dbAMPc (Sigma)

N⁶,2'-O-Dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt

Buccladesine sodium-potassium salt; Dibutyryl cAMP sodium-potassium salt; Dibutyryl cyclic-AMP sodium-potassium salt

[16980-89-5] C₁₈H₂₃N₅O₈Na FW 509.4

Cell-permeable cAMP analog that activates cAMP dependent protein kinase (PKA) affecting cell growth and differentiation by altering gene expression. Can inhibit cell proliferation and induce apoptosis, yet reported to improve the survival of dopaminergic neurons in culture. Shown to block free radical production in response to parathyroid hormone, pertussis toxin or ionomycin. Relaxing effect on some smooth muscle may not involve activation of PKA. Loses 2'-O-buteryl group at pH 8.5

Solubility

water. 50 mg/ml

Ref.: 1. Ikeda, K., et al., Transcription of the gene for parathyroid hormone-related peptide from the human is activated through a cAMP-dependent pathway by prostaglandin E1 in HTLV-I-infected T cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 1174 (1993)

2. Ma, D., et al., Phosphodiesterase 4B gene transcription is activated by lipopolysaccharide and inhibited by interleukin-10 in human monocytes. *Mol. Pharmacol.* **55**, 50-57 (1999)

3. Imamura, M., Ozawa, E., Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6139 (1998)

4. Leszczynski, D., et al., Apoptosis of vascular smooth muscle cells. Protein kinase C and oncoprotein Bcl-2 are involved in regulation of apoptosis in non-transformed rat vascular smooth

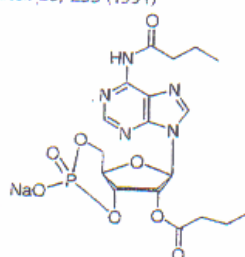
muscle cells. *Am. J. Pathol.* **145**, 1265-1270 (1994)

5. Krett, N.L., et al., Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate-mediated cytotoxicity in steroid sensitive and resistant myeloma. *Clin. Cancer Res.* **3**, 1781-1777 (1997)

6. Branton, R.L., cAMP included during cell suspension preparation improves survival of dopaminergic neurons *in vitro*. *Neuroreport* **9**, 3223 (1998)

7. Berger, C.E., et al., cAMP-dependent inhibition is dominant in regulating superoxide production in the bone-resorbing osteoclasts. *J. Endocrinol.* **158**, 311 (1998)

8. Hei, Y.J., et al., Lack of correlation between activation of cyclic AMP-dependent protein kinase and inhibition of contraction of rat vas deferens by cyclic AMP analogs. *Mol. Pharmacol.* **39**, 233 (1991)



D 0627
-20°C

min. 96% (HPLC), powder

Cyclic AMP	25 mg	28.10
monobutyryl derivatives	100 mg	77.50
Color	250 mg	146.10
	1 g	437.80



Annexe 5

Caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de la forskoline (Sigma)

Forskolin

from *Coleus forskohlii*

Coleonol; Colforsin; 7 β -Acetoxy-1 α ,6 β ,9 α -tri-hydroxy-8,13-epoxy-labd-14-en-11-one; 7 β -Acetoxy-8,13-epoxy-1 α ,6 β ,9 α -trihydroxylabd-14-en-11-one [66575-29-9] C₂₂H₃₄O₇ FW 410.5

A cell-permeable diterpenoid that possesses anti-hypertensive, positive inotropic and adenylyl cyclase activating properties. Many of its biological effects are due to its activation of adenylyl cyclase and the resulting increase in intracellular cAMP concentration. Forskolin effects calcium currents and inhibits MAP kinase.

Ref.: 1. Huang, R.D., Inhibition of forskolin-activated adenylyl cyclase by ethanol and other solvents. *J. Cyclic Nucl. Res.* **8**, 385 (1982)

2. de Souza, N.J., Forskolin: a labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory, and adenylyl cyclase activating properties. *Med. Res. Rev.* **3**, 201 (1983)

3. Seamon, K. B., Daly, J. W., Forskolin: its biological and chemical properties. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **20**, 1 (1986)

4. Galli, C., Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action. *J. Neurosci.* **15**, 1172 (1995)

5. Li, X., Inhibition of MAP kinase by prostaglandin E2 and forskolin in rat renal mesangial cells. *Am. J. Physiol.* **269**, 986 (1995)

6. Siddhanti, S.R., Forskolin inhibits protein kinase C-induced mitogen activated protein kinase activity in MC3T3-E1 osteoblasts. *Endocrinology* **136**, 4834 (1995)

R: 21 S: 22-36/37

F 6886	min. 98% (HPLC), powder	10 mg	139.90
	Color.	off-white 25 mg	300*50
	Solubility	50 mg	524.00
	ethanol.	soluble	
	DMSO.	5 mg/ml, stable at least 6 months at room temperature	

Annexe 6

Tableau récapitulatif des âges des chiennes, du type d'intervention chirurgicale réalisée sur chaque chienne et de la répartition des ovocytes pour la mise en culture.

Date de MIV	Informations sur les chiennes donneuses			Nombre d'ovocytes mis dans chaque groupe				
	n°dossier	âge	opération	groupe témoin	dbc AMP	Forskoline	Rp-cAMP	dénudés
02/03/2004	A04-1964	20/05/2002	OVH	20	40			
	A04-1836	14/07/1997	OVH					
09/03/2004	A04-2312	20/07/2002	ovario				19	
16/03/2004	A04-2767	06/07/2003	ovario	40	20	20	40	
	A04-2845	!	OVH					
22/03/2004	A03-12002	!	ovario	20		18		20
	A04-3160	30/08/2002	ovario					
23/03/2004	A03-3282	27/11/2000	ovario	40	20	20	40	
	A04-2640	08/03/2003	ovario					
30/03/2004	A04-3466	01/05/2000	ovario	20	20	20	40	20
	A04-3334	!	ovario					
13/04/2004	A04-2674	28/07/2001	ovario	20	40	20		20
26/04/2004	A04-3634	01/03/1998	ovario	20		20		
27/04/2004	A04-4667	05/02/2002	ovario	20	20	20	40	20
	A03-6700	04/04/2003	ovario					
03/05/2004	A04-3138	12/06/0,	ovario	20	40	20	20	40
	A03-3721	15/04/2002	ovario					
10/05/2004	A00-2827	08/09/1999	OVH	20				20
11/05/2004	A04-5526	22/05/2003	ovario	20	20	20	40	
	A03-7912	15/03/2003	ovario					
17/05/2004	A04-5510	18/04/2000	ovario	20	20	20	20	40
	A04-5329	01/06/2002	ovario					
24/05/2004	A04-5766	!	ovario	20		20	20	20
	A04-3620	24/11/2002	ovario					
25/05/2004	A04-5797	02/06/2003	ovario	20	20	20	20	
	A04-6110	28/02/1999	ovario					
01/06/2004	A03-9051	25/11/1999	ovario	20	20			
02/06/2004	A03-6401	02/09/2000	ovario	20	20	20		40
	A03-6969	01/08/1999	ovario					
07/06/2004	A04-1751	01/05/2003	ovario	20				40
	A04-6305	27/12/1996	ovario					
08/06/2004	A04-6675	22/10/2000	ovario	20	20	40	40	20
	A04-7163	03/03/2003	ovario					
10/06/2004	!	!	OVH	20				20
			Total	420	320	298	339	320

Annexe 7

Feuilles utilisées lors de l'observation microscopique des ovocytes afin de noter les stades d'observation des ovocytes.

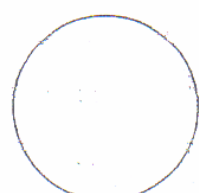
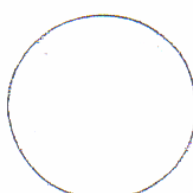
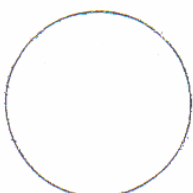
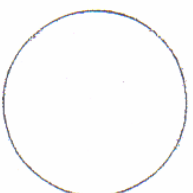
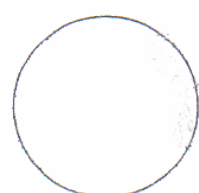
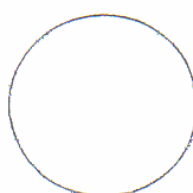
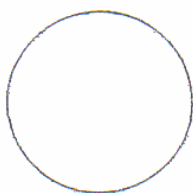
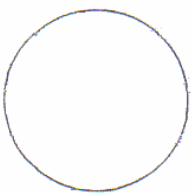
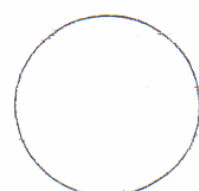
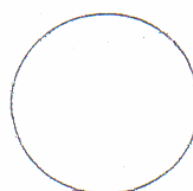
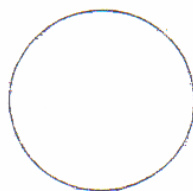
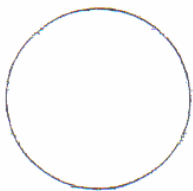
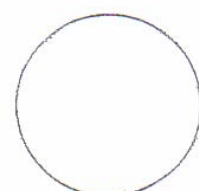
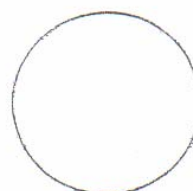
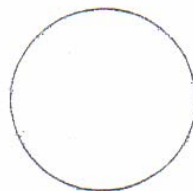
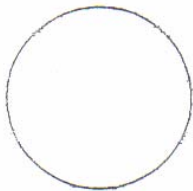
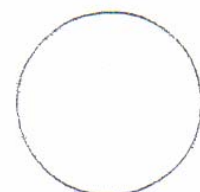
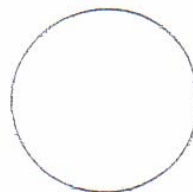
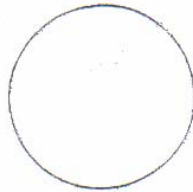
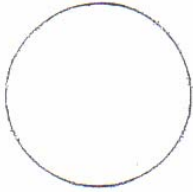
Date d'observation :

Durée de MIV : 72h

Date de mise en culture :

Traitement :

Colorés le :



ETUDE DU ROLE DE L'AMPc DANS LA REPRISE DE LA MEIOSE OVOCYTAIRE CHEZ LA CHIENNE

TANGUY DEZAUX Cécile

RESUME :

Chez toutes les femelles mammifères, les ovocytes sont bloqués dans les follicules ovariens au stade prophase I. Alors que l'ovulation et le pic de LH provoquent la reprise de la méiose dans la majorité des espèces, les ovocytes restent bloqués en prophase I chez la chienne et mettront quarante-huit à soixante heures à reprendre la méiose.

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre les mécanismes contrôlant la reprise de la méiose dans cette espèce et en particulier de tester le rôle de l'AMPc et celui des cellules de la granulosa. Mille six cent quatre-vingt-dix-sept (1697) ovocytes collectés chez trente-quatre chiennes ovariectomisées ont été mis en maturation *in vitro* pendant soixante-douze heures. Le milieu de maturation a été additionné de composés augmentant (dbAMPc, forskoline) ou diminuant (RpAMPc) l'effet de l'AMPc ovocytaire sur la PKA. Un lot d'ovocytes a également été cultivé après dénudation.

Notre étude montre que l'absence des cellules de la granulosa ne provoque pas la dégénérescence des ovocytes, mais que ces cellules inhibent la reprise de la méiose. L'AMPc ne joue pas un rôle central dans cette reprise, qui semblerait peut être plutôt contrôlée par une voie calcique.

Mots-clés : ovocyte, méiose, AMPc, maturation ovocytaire, culture *in vitro*, carnivore, chienne.

JURY :

Président : Pr.
Directeur : Dr CHASTANT-MAILLARD
Assesseur : Dr TIRET
Invitée : Karine REYNAUD

Adresse de l'auteur :

TANGUY DEZAUX Cécile
3, Sente d'Etaux, 78470 Saint-Rémy-lès-Chevreuse.

THE IMPORTANCE OF THE cAMP IN THE MEIOTIC RESUMPTION OF THE BITCHES

TANGUY DEZAUX Cécile

SUMMARY :

In all mammalian females, oocytes are blocked at the prophase stage of the first meiotic division in the ovarian follicles. Whereas ovulation and LH peak provoke the resumption of meiosis for a large majority of species, the canine oocytes remain at prophase I and will require forty eight to sixty hours before their meiotic resumption.

The aim of this study was to identify the mechanisms responsible for meiotic resumption in this species and especially to test the importance of cAMP and the one of meiotic granulosa cells. One thousand six hundred and ninety seven oocytes collected from thirty four spayed bitches were cultured *in vitro* for seventy two hours. Substances increasing (dbcAMP, forskolin) or decreasing (RpAMPc) the effects of cAMP on the PKA were added to the maturation medium. Some oocytes were also cultured after having been stripped of their granulosa cells.

Our study shows that the absence of granulosa cells does not provoke the degeneration of the oocytes, but that these cells inhibit the meiotic resumption. It seems that cAMP does not play a central part in such resumption, which would rather be controlled by a calcic pathway.

Key words : oocyte, meiosis, cAMP, *in vitro* culture, oocyte maturation, carnivore, bitch.

JURY :

President : Pr.
Director : Dr CHASTANT-MAILLARD
Assessor : Dr TIRET
Guest : Karine REYNAUD

Author's address :

TANGUY DEZAUX Cécile
3, Sente d'Etaux, 78470 Saint-Rémy-lès-Chevreuse.